

Том 88, Номер 5

ISSN 0320-9725

Май 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 5, 2023

Глюкокортикоиды — регуляторы пластичности взрослого гиппокампа: точки роста и трансляционные аспекты (обзор) <i>Н.В. Гуляева</i>	693
Рекомбинантный циклофилин А человека в комбинации с адаптивной Т-клеточной терапией усиливает эффективность противоопухолевой иммунотерапии в экспериментальных моделях <i>in vivo</i> <i>А.А. Калинина, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых</i>	725
О-Ацетилгомосеринсульфгидрилаза из <i>Clostridioides difficile</i> : роль остатков тирозина активного центра <i>В.В. Куликова, С.В. Ревтович, А.Д. Лыфенко, Е.А. Морозова, В.С. Коваль, Н.П. Бажулина, Т.В. Демидкина</i>	737
Влияние нейродегенеративных мутаций в гене <i>NEFL</i> на тепловую денатурацию белка лёгкой цепи нейрофиламентов <i>В.В. Нефёдова, Д.С. Ямпольская, С.Ю. Клейменов, Н.А. Чеботарева, А.М. Матюшенко, Д.И. Левицкий</i>	748
Профили оксипиринов в крови как маркеры патогенеза онкологических заболеваний (мини-обзор) <i>Д.В. Чистяков, Л.В. Коваленко, М.Ю. Донников, М.Г. Сергеева</i>	761
Прогнозирование неблагоприятных эффектов межлекарственных взаимодействий на сердечно-сосудистую систему на основе анализа связей «структура—активность» <i>В.С. Сухачёв, С.М. Иванов, А.В. Дмитриев</i>	773
Нуклеоид-ассоциированные белки HU и IHF: олигомеризация в растворе и гидродинамические свойства <i>Л.А. Дадина, М.В. Петухов, А.М. Гордиенко, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев, Т.В. Ракитина, А.А. Можжаев, Г.С. Петерс, Э.В. Штыкова</i>	785
Использование биохимических особенностей сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, для их разделения на клетки одного типа (обзор) <i>Д.В. Поздышев, Н.А. Комбарова, В.И. Муронец</i>	803
Глутаредоксин 1 эволюционно древней гидры: свойства фермента и его возможные внутриклеточные функции <i>N. Perween, K. Pekhale, G. Haval, G.S. Bose, S.P.K. Mittal, S. Ghaskadbi, S.S. Ghaskadbi</i>	817
Обнаружение специфических РНК-мишеней с помощью мультимеризации <i>А.Р. Сахабутдинова, А.В. Чемерис, Р.Р. Гарафутдинов</i>	832
Механизм ингибирования D-цикосерином трансаминазы D-аминокислот из <i>Haliscomenobacter hydrossis</i> <i>А.К. Бакунова, И.О. Матюта, А.Ю. Николаева, К.М. Бойко, В.О. Попов, Е.Ю. Безсуднова</i>	841

Адсорбция ацилгидроперокси-производных фосфолипидов биомембран липопротеидами плазмы крови <i>В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, В.Я. Косач, Г.Г. Коновалова</i>	854
Фемтосекундная экситонная релаксация в хлоросомах фотосинтезирующей зелёной бактерии <i>Chloroflexus aurantiacus</i> <i>А.Г. Яковлев, А.С. Таусова, З.Г. Фетисова</i>	861
Дисплей олиго- α -1,6-гликозидазы <i>Exiguobacterium sibiricum</i> на поверхности клеток <i>Escherichia coli</i> <i>Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, Е.А. Крюкова, С.Ш. Гапизов, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников</i>	875

CONTENTS

Vol. 88, Issue 5, 2023

Glucocorticoids Orchestrate Adult Hippocampal Plasticity: Growing Points and Translational Aspects (Review) <i>N. V. Gulyaeva</i>	693
Recombinant Human Cyclophilin A in Combination with Adoptive T Cell Therapy Improves the Efficacy of Cancer Immunotherapy in Experimental Models <i>in vivo</i> <i>A. A. Kalinina, D. B. Kazansky, and L. M. Khromykh</i>	725
<i>O</i> -Acetylhomoserine Sulfhydrylase from <i>Clostridioides difficile</i> : the Role of Tyrosine Residues of the Active Center <i>V. V. Kulikova, S. V. Revtovich, A. D. Lyfenko, E. A. Morozova, V. S. Koval, N. P. Bazhulina, and T. V. Demidkina</i>	737
Effect of Neurodegenerative Mutations in <i>NEFL</i> Gene on Thermal Denaturation of the Neurofilament Light Chain Protein <i>V. V. Nefedova, D. S. Yampolskaya, S. Y. Kleymenov, N. A. Chebotareva, A. M. Matyushenko, and D. I. Levitsky</i>	748
Blood Oxylin Profiles as a Marker of the Pathogenesis of Oncological Diseases (Mini-Review) <i>D. V. Chistyakov, L. V. Kovalenko, M. Y. Donnikov, and M. G. Sergeeva</i>	761
Prediction of Adverse Effects of Drug–Drug Interactions on the Cardiovascular System Based on the Analysis of Structure–Activity Relationships <i>V. S. Sukhachev, S. M. Ivanov, and A. V. Dmitriev</i>	773
Nucleoid-Associated Proteins HU and IHF: Oligomerization in Solution and Hydrodynamic Properties <i>L. A. Dadinova, M. V. Petoukhov, A. M. Gordienko, V. A. Manuvera, V. N. Lazarev, T. V. Rakitina, A. A. Mozhaev, G. S. Peters, and E. V. Shtykova</i>	785
Biochemical Features of X or Y Chromosome Bearing Spermatozoa for Sperm Sexing (Review) <i>D. V. Pozdyshev, N. A. Kombarova, and V. I. Muronetz</i>	803
Glutaredoxin 1 from Evolutionary Ancient <i>Hydra</i> : Characteristics of the Enzyme and Its Possible Functions in Cell <i>N. Perween, K. Pekhale, G. Haval, G. S. Bose, S. P. K. Mittal, S. Ghaskadbi, and S. S. Ghaskadbi</i>	817
Detection of Specific RNA Targets by Multimerization <i>A. R. Sakhabutdinova, A. V. Chemeris, and R. R. Garafutdinov</i>	832
Mechanism of D-Cycloserine Inhibition of D-Amino Acid Transaminase from <i>Haliscomenobacter hydroxsis</i> <i>A. K. Bakunova, I. O. Matyuta, A. Yu. Nikolaeva, K. M. Boyko, V. O. Popov, and E. Yu. Bezsudnova</i>	841
Adsorption of Acylhydroperoxy-Derived Phospholipids from Biomembranes by Blood Plasma Lipoproteins <i>V. Z. Lankin, A. K. Tikhaze, V. Y. Kosach, and G. G. Konovalova</i>	854

Femtosecond Exciton Relaxation in Chlorosomes of the Photosynthetic
Green Bacterium *Chloroflexus aurantiacus*

A. G. Yakovlev, A. S. Taisova, and Z. G. Fetisova

861

Display of Oligo- α -1,6-Glycosidase from *Exiguobacterium sibiricum*
at the Surface of *Escherichia coli* Cells

*L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, E. A. Kryukova, S. S. Gapizov,
D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov*

875

ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ – РЕГУЛЯТОРЫ ПЛАСТИЧНОСТИ ВЗРОСЛОГО ГИППОКАМПА: ТОЧКИ РОСТА И ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ*

Обзор

© 2023 Н.В. Гуляева^{1,2}

¹ ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485 Москва, Россия; электронная почта: nata_gul@ihna.ru

² ГБУЗ Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева Департамента здравоохранения города Москвы, 115419 Москва, Россия

Поступила в редакцию 27.03.2023

После доработки 10.04.2023

Принята к публикации 10.04.2023

В обзоре проанализированы современные представления о контроле глюкокортикоидами различных механизмов пластичности гиппокампа взрослых млекопитающих и человека. Глюкокортикоидные гормоны обеспечивают согласованное функционирование ключевых компонентов и механизмов гиппокампальной нейропластичности: нейрогенеза, глутаматергической нейротрансмиссии, микроглии и астроцитов, систем нейротрофических факторов, нейровоспаления, протеаз, метаболических гормонов, нейростероидов. Регуляторные механизмы многообразны: наряду с прямым действием глюкокортикоидов через специфические рецепторы, описаны опосредованные глюкокортикоид-зависимые воздействия, а также многочисленные взаимодействия между различными системами и компонентами, опосредующими нейропластичность. Несмотря на то что многие связи в этой сложной регуляторной схеме до сих пор не установлены, изучение рассмотренных в работе факторов и механизмов формирует точки роста в области исследований регулируемых глюкокортикоидами процессов в мозге и в первую очередь в гиппокампе. Эти исследования принципиально важны для трансляции в клинику и потенциального лечения/предупреждения распространенных заболеваний эмоциональной и когнитивной сфер и коморбидных им состояний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейропластичность, гиппокамп, глюкокортикоиды, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось, синаптическая пластичность, стресс, нейрогенез, нейровоспаление, глутаматергическая трансмиссия, протеазы, BDNF, инсулинорезистентность, депрессия, болезнь Альцгеймера, старение.

DOI: 10.31857/S0320972523050019, EDN: AXHRHM

ВВЕДЕНИЕ. ГИППОКАМП – МИШЕНЬ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Пластичность нейронов и глиальных клеток играет жизненно важную роль в передаче и интеграции сигналов в центральной нервной системе. Нейропластичность, адаптивное

изменение нервной системы в ответ на изменение внешних сигналов, охватывает множество процессов и механизмов их реализации, от рождения, выживания, миграции и интеграции новых нейронов, роста нейритов, синаптогенеза и модуляции зрелых синапсов до формирования и трансформации нейронных сетей. Фундаментальным механизмом пластичности взрослого мозга является зависимость

Принятые сокращения: АСТН – аденокортикотропный гормон; AMPAR – рецепторы α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA); APP – белок-предшественник амилоида; BACE1 – β-секретаза 1; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; CRH – кортикотропин-релизинг-гормон; GR – глюкокортикоидные рецепторы; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; mGluR – метаболитные глутаматные рецепторы; MMP – металлопротеиназы; MR – минералокортикоидные рецепторы; NMDAR – N-метил-D-аспарататные рецепторы; TrkB – тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор B; БА – болезнь Альцгеймера; ГНО – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось; ГК – глюкокортикоиды.

* Статья опубликована в рамках специального выпуска «Биохимические аспекты разных уровней нейропластичности: молекулы, гены, синапсы, клетки, когнитивные процессы» (том 88, №№ 3–4, 2023).

от активности нейронов реорганизация существующей структуры, и именно пластичность мозга взрослого человека позволяет ему учиться на протяжении всей жизни. Исследования последних десятилетий позволили охарактеризовать не только пластические структурно-функциональные перестройки мозга, но и несколько форм синаптической пластичности, определив их как ключевые процессы, которые позволяют мозгу работать динамично и осуществлять обучение, запоминание и использование памяти [1]. Нейропластичность является основой адаптации мозга к изменяющимся условиям внешней и внутренней среды, а aberrантные изменения пластичности ассоциированы с патологическими состояниями.

Глюкокортикоиды (ГК), оказывая влияние согласованно с катехоламинами, контролируют поведенческую адаптацию к стрессу и улучшают сохранение значимой эмоциональной информации; они динамично регулируют синаптическую функцию и синаптическую пластичность, лежащие в основе формирования эмоциональной памяти [2]. Формирование и использование памяти – сложный процесс, в котором участвуют несколько структур мозга, такие как гиппокамп, миндалевидное тело и прилегающие области коры, обычно определяемые как медиальные структуры височной доли. Считают, что после обучения многие формы памяти первоначально кодируются в гиппокампе, но впоследствии энграммы длительно сохраняются и в других областях мозга, таких как неокортекс (этот процесс известен как консолидация системной памяти). Синаптическая пластичность является основным клеточным механизмом, лежащим в основе обучения и памяти, и поэтому считается ключевой в этом процессе [3]. Во взрослом гиппокампе, лимбической структуре, отвечающей как за когнитивные функции, так и за эмоции, синаптическая пластичность важна для обработки информации, обучения и кодирования памяти. Зубчатая извилина взрослого гиппокампа постоянно генерирует когорты нейронов, часть из которых выживает, созревает и интегрируется в существующие нейронные цепи, и этот процесс регулируется как глобальной, так и локальной нейронной активностью, обеспечивая уникальную клеточную и синаптическую пластичность гиппокампа. По-видимому, возникновение новых нейронов гиппокампа на протяжении всей жизни позволяет постоянно «омолаживать» мозг взрослых млекопитающих, включая человека, и поддерживать адаптивные пластические свойства мозга [4].

Стресс как адаптивная реакция на изменяющиеся условия окружающей среды необходим для выживания организма. ГК, стероидные «гормоны стресса», секретируемые фасцикулярной зоной коры надпочечников, имеют решающее значение для успешной адаптации к стрессорам, и в реализации этой важной для выживания организма функции ГК ключевое место принадлежит именно способности этих гормонов регулировать быструю и долговременную пластичность мозга. Воздействие стресса вызывает активацию ключевой нейрогуморальной системы организма, гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО) и связанных с ней нейрохимических реакций после высвобождения ГК из надпочечников, что и лежит в основе быстрых физиологических реакций. Стимуляция ГГНО приводит к активации определенных областей мозга, включая гиппокамп, миндалевидное тело и префронтальную кору, в которых высокая плотность рецепторов ГК [5].

Действуя через специфические внутриклеточные рецепторы в головном мозге и на периферии, ГК регулируют поведение, а также метаболическую, сердечно-сосудистую, иммунную и нейроэндокринную активности. ГК связываются с двумя подтипами рецепторов: минералокортикоидными рецепторами (MR) и глюкокортикоидными рецепторами (GR), отличающимися по своей аффинности к ГК. Как MR, так и GR могут быть локализованы внутриклеточно или на мембране. MR и GR активируются под действием ГК и опосредуют их эффекты, в т.ч. на быстрые и долговременные события синаптической пластичности. GR присутствуют в каждой клетке нервной системы, но уровень экспрессии варьируется, поэтому разные типы клеток по-разному реагируют на активацию GR [6]. Классически ГК оказывают свое влияние на мозг через геномные механизмы, включающие внутриклеточные MR и GR, непосредственно связывающиеся с ДНК. В последние годы было показано наличие мембранных MR и GR, связанных с G-белками, активация которых запускает сигнальные каскады и, как полагают, реализует быстрые эффекты ГК также через негеномные механизмы [7] (рис. 1).

Эффекты ГК могут сильно различаться в зависимости от типа рецептора, а также от области мозга, типа клеток и физиологического контекста. Эти различия в конечном счете зависят от дифференциальных взаимодействий MR и GR с другими белками, которые определяют связывание лиганда, ядерную транслокацию и транскрипционную активность.

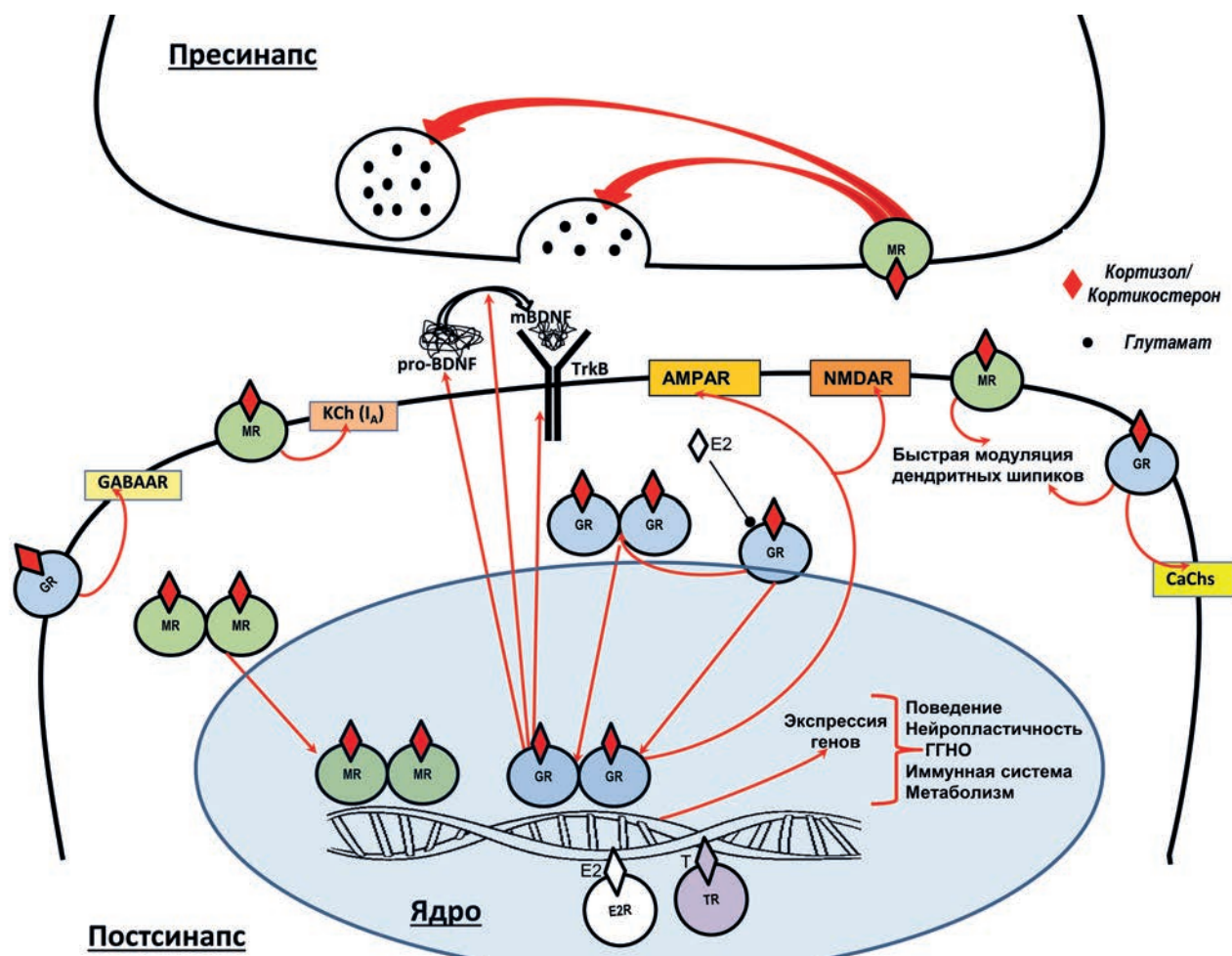


Рис. 1. Рецепторы глюкокортикоидов (ГК) в глутаматергическом синапсе (схема составлена по данным, представленным в опубликованных недавно работах [7–11]). Кортикостерон (у грызунов) или кортизол (у человека) высвобождаются из надпочечников в кровоток. Как липидорастворимые молекулы, ГК могут свободно проникать через клеточную мембрану. Когда ГК связывается с цитозольными глюкокортикоидными рецепторами (GR) и минералокортикоидными рецепторами (MR), это приводит к высвобождению регуляторных комплексов, таких как HSP90, FKBP5 и BAG1, с последующей димеризацией рецепторов и транслокацией их в ядро. Связывание димеризованных GR (MR) с предполагаемыми элементами глюкокортикоидного ответа (GRE), присутствующими в промоторных областях, индуцирует активацию факторов транскрипции. Половые стероидные гормоны эстрадиол (E2) и тестостерон (T) могут модулировать экспрессию GR-зависимых генов (E2R, TR – рецепторы эстрадиола и тестостерона соответственно). Контролируемые ГК гены регулируют экспрессию ионотропных рецепторов глутамата (NMDAR, AMPAR), системы трофических факторов (BDNF), включая синтез про-BDNF (pro-BDNF), протеолитическое превращение его в зрелый BDNF (mBDNF), и синтез рецептора BDNF TrkB. Экспрессия ГК-зависимых генов контролирует функционирование гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (ГГНО), нейропластичность, поведение, иммунную систему и метаболизм. В отличие от классических цитозольных/ядерных рецепторов, мембранные GR и MR реализуют быстрые эффекты ГК, модулируя высвобождение глутамата в пресинапсе, а в постсинаптической мембране – активность рецепторов γ -аминомасляной кислоты (GABAAR), катионных каналов: нескольких типов кальциевых (CaCh) и калиевого KCh (IA), а также быстрые изменения дендритных шипиков. Эстрадиол (E2) конкурирует с кортикостероном за ингибирование передачи сигналов GR

MR и GR головного мозга могут опосредовать очень разные, а иногда и противоположные эффекты. Экспрессия MR в мозге гораздо более ограничена в сравнении с GR. MR наиболее распространен в гиппокампе грызунов и человека, где экспрессия MR равна или превышает экспрессию GR в пирамидных клетках CA3 [8]. Известно, что MR и GR перемещаются между цитоплазматическими и ядерными компартментами, а внутриклеточ-

ное распределение MR и GR зависит от равновесия между ядерным импортом и экспортом. Это равновесие, по-видимому, зависит от типа клеток [9, 10].

ГК взаимодействуют (как геномно, так и негеномно) с нейромедиаторами, нейротрофическими факторами, половыми гормонами и другими медиаторами стресса, формируя настоящие и будущие реакции организма на стресс. В гиппокампе и других стресс-реактивных

областях мозга аллостатическая перегрузка, возникающая в результате хронического стресса, может изменить функционирование ГГНО и посредством эпигенетической модификации [7]. В многочисленных экспериментах на животных показано, что в базовых условиях с низкой секрецией ГК занятость MR близка к насыщению. Когда уровни ГК повышаются во время стресса или пика циркадианного цикла этих гормонов, MR становится полностью занятым, и связывание ГК происходит главным образом с GR. Важная роль ГК в нейропластичности была постулирована несколько десятилетий назад [12], однако конкретные механизмы регуляторной функции ГК до конца не расшифрованы. Широкая распространенность GR в различных популяциях нервных и глиальных клеток также за пределами классических областей мозга, отвечающих за реализацию стресс-реакции, подтверждают представление о том, что в ЦНС ГК могут действовать как дирижер, организующий и контролирующий мозговой оркестр, состоящий из различных клеток, включенных в специфические сети. Плейотропность эффектов ГК непосредственно связана с множественными механизмами, которые они запускают и/или контролируют на всех уровнях от молекулярного до сетевого и организменного.

Стресс посредством ГК индуцирует структурную пластичность нейронов, шванновских клеток, микроглии, олигодендроцитов и астроцитов, а также влияет на нейротрансмиссию, изменяя высвобождение и обратный захват глутамата. Воздействие стрессоров вызывает спектр реакций, которые варьируются от потенциально адаптивных до дезадаптивных последствий на структурном, клеточном и физиологическом уровнях. Эти ответы особенно выражены в гиппокампе, где они также влияют на гиппокамп-зависимую когнитивную функцию и эмоциональность [13]. В отличие от хронически повышенных уровней, циркадианные и острые стресс-индуцированные периоды увеличения ГК необходимы для выживания нейронов гиппокампа, приобретения и консолидации памяти, облегчения глутаматергической нейротрансмиссии и образования возбуждающих синапсов, индукции немедленных ранних генов и образования дендритных шипиков. Отрицательная обратная связь со стороны ГК включает несколько механизмов, ведущих к ограничению активации ГГНО и предотвращению вредных эффектов чрезмерной генерации ГК. Адекватная секреция ГК регулируется нервной системой, контролирующей секрецию гипоталамического кортикотропин-

рилизинг-гормона (CRH) вазопрессина, основных регуляторов гипофизарного адренокортикотропного гормона (АСТН). Механизмы быстрой обратной связи, включающие негеномные действия ГК, опосредуют немедленное ингибирование гипоталамической секреции CRH и АСТН, а более медленные механизмы, опосредованные геномом, включают модуляцию лимбических сетей и периферических метаболических мессенджеров [14].

Избыток ГК может иметь негативные эффекты особенно в гиппокампе, в котором высока плотность MR и GR [15]. Эти эффекты включают нарушение синаптической пластичности, атрофию дендритов, нарушение способности нейронов выживать при действии различных повреждающих факторов и в конечном итоге гибель нейронов [16]. Избирательная уязвимость гиппокампа к стрессу, опосредованная рецепцией выделяемых при стрессе ГК, является ценной функциональной пластичности и плейотропности этой лимбической структуры [17]. Общие молекулярные и клеточные механизмы нарушения пластичности гиппокампа включают дисфункцию GR, систем нейротрансмиттеров и нейротрофических факторов, развитие нейровоспаления, приводящее к нейродегенерации и гибели нейронов гиппокампа, а также нарушения нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише и формирование aberrантных нейронных сетей.

Нормальная пластичность нервной системы необходима для адаптации, обучения и памяти, а пластичность, вызванная стрессом, часто является неадекватной и способствует развитию нейропсихических расстройств и других патологий мозга [18]. Структурная пластичность гиппокампа играет ключевую роль в этиопатогенезе нейродегенеративных заболеваний [19]. Влияние ГК на мозг имеет решающее значение для поддержания гомеостаза, поэтому эти гормоны вовлечены и в процесс старения, которое определяется как период онтогенеза со сниженной способностью поддерживать гомеостаз, повышенной лабильностью ГГНО после стресса и нарушением поведенческой адаптации [20]. По-видимому, дисфункция ГК-зависимых процессов ассоциирована практически со всеми патологиями мозга, поэтому неполное понимание соответствующих механизмов не позволяет в полной мере использовать потенциальные возможности предотвращения и терапии заболеваний мозга.

В данном обзоре проанализированы современные представления о ключевых механизмах

гиппокампальной нейропластичности, находящихся под контролем ГК. Это механизмы, изучение которых формирует точки роста в области изучения регулируемых посредством ГК процессов в мозге, принципиально важные для трансляции в клинику и потенциального лечения/предупреждения распространенных заболеваний эмоциональной и когнитивной сфер, в том числе депрессивных расстройств, болезней Альцгеймера (БА) и других.

НЕЙРОГЕНЕЗ КАК ФОРМА РЕГУЛИРУЕМОЙ ГЛЮКОКОРТИКОИДАМИ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА

Нервная система взрослого организма не статична; она подвергается морфологическим и физиологическим изменениям на различных уровнях. Такой пластический механизм гарантирует, что поведенческая регуляция нервной системы адаптируется к различным раздражителям окружающей среды. Принято считать, что в гиппокампе млекопитающих процесс образования и развития функционально интегрированных нейронов происходит на протяжении всей жизни и вносит существенный вклад в высокопластичную природу зрелой центральной нервной системы. Зубчатая извилина гиппокампа — одна из основных нейрогенных ниш во взрослом организме, содержащая стволовые клетки, клетки-предшественники и новые нейроны, часть которых созревает и включается в нейронные сети [4]. Нейрогенез во взрослом гиппокампе представляет собой динамический процесс, связанный с когнитивными функциями, такими как обучение и память. При этом ряд исследователей считает, что нейрогенез не является механизмом замены клеток во взрослом мозге, а вместо этого поддерживает пластическую нейронную сеть гиппокампа за счет непрерывного добавления незрелых, новых нейронов с уникальными свойствами и структурной пластичностью, а также изменения пластичности зрелых нейронов, индуцированные новыми нейронами [21].

Принято считать, что у людей и других млекопитающих воспоминания о событиях кодируются ансамблями нейронов (энграммами) в гиппокампе. Мнемоническая информация, хранящаяся в этих энграммах, может затем использоваться для управления будущим поведением, включая прогнозирование и принятие решений в динамичной среде. Некоторые энграммы гиппокампа могут храниться

постоянно, другие со временем изменяются, и это позволяет предположить, что представленные воспоминания также могут быть преобразованы. Наиболее вероятно, что нейрогенез во взрослом гиппокампе представляет собой один из процессов, который постоянно перестраивает нейронные сети гиппокампа, предположительно, включая сохраненные энграммы [22]. Считают, что нейронные цепи зубчатой извилины — области СА3 взрослого гиппокампа постоянно модифицируются за счет интеграции рожденных в результате нейрогенеза гранулярных клеток зубчатой извилины. Эти клетки проходят длительный период созревания, в течение которого они проявляют повышенную синаптическую пластичность, эффективные электрофизиологические свойства и коннективность. Предполагается, что нейрогенез взрослого гиппокампа позволяет генерировать библиотеку событий/нового опыта, каждое из которых регистрируется в физиологических свойствах и коннективности зрелых гранулярных клеток зубчатой извилины [23]. По-видимому, нейрогенез обеспечивает гибкость зубчатой извилины, позволяющую быстро генерировать специфичное для контекста распределенное представление важных сенсорных стимулов, таких как пространственные сигналы, что в конечном итоге приводит к их различению на поведенческом уровне [24]. При этом большая часть результатов, положенных в основу концепций о роли нейрогенеза взрослого гиппокампа в нейропластичности, получена на млекопитающих животных, в основном грызунах, а ряд методических ограничений вызывает непрекращающиеся дебаты об интенсивности (и вообще наличии) нейрогенеза в гиппокампе взрослого человека [25]. Однако, несмотря на методические трудности исследования нейрогенеза у человека, большинство специалистов принимает, что зубчатая извилина гиппокампа эволюционно законсервирована как один из немногих участков нейрогенеза у взрослых млекопитающих, хотя и остается до конца не ясным, интегрируются ли новые нейроны в существующие сети гиппокампа наравне с нейронами, рожденными в процессе развития, или же они представляют собой дискретную клеточную популяцию с уникальными функциями [26]. Возможно, в результате нейрогенеза во взрослом гиппокампе создается специализированная субпопуляция нейронов, которая может играть ключевую роль в функциях гиппокампа, таких как эпизодическая память.

Добавление новых нейронов во взрослом возрасте происходит в рамках последователь-

ного многоступенчатого процесса. Нейрогенные стадии включают пролиферацию, дифференцировку, миграцию, созревание/выживание и интеграцию новых нейронов в существующую нейронную сеть. Большинство исследований, оценивающих влияние экзогенных (например, ГК, стресса) или эндогенных (например, нейротрофинов и их рецепторов) факторов на нейрогенез у взрослых на разных уровнях, были сосредоточены на пролиферации, выживании и дифференцировке нейронов [27]. Взаимодействие между внешними и внутренними факторами играет фундаментальную роль в регуляции нейрогенеза. За последние десятилетия несколько исследований «внутренних» путей, включая факторы транскрипции, выявили их фундаментальную роль в регуляции каждого этапа нейрогенеза. Однако вполне вероятно, что регуляция транскрипции является частью более сложной регуляторной сети, которая включает эпигенетические модификации, некодирующие РНК и метаболические пути [28]. Важно, что гормоны, в первую очередь стероидные, осуществляют многогранное влияние на все стадии нейрогенеза во взрослом гиппокампе: имеются доказательства гормональной стимуляции (через гормоны гонад — эстрогены и андрогены, а также тиреоидные гормоны), ингибирования (через ГК) и нейропротекции, опосредованной нейротрофинами и нейромодуляторами [29].

Нейрогенез во взрослом гиппокампе в последние годы все чаще рассматривается через призму реакции мозга на стресс. Предполагается, что нейрогенез играет ключевую роль в формировании адаптации к изменениям окружающей среды, что и лежит в основе его роли в реакции на стресс (избыток ГК). Гиппокамп с его высокой конвергенцией на входе и дивергенцией на выходе представляет собой своеобразный вычислительный центр, идеально расположенный в мозге для обнаружения сигналов и контекстов, связанных с прошлым, текущим и прогнозируемым опытом стресса, а также для контроля реакции на стресс на когнитивном, аффективном, поведенческом и физиологическом уровнях. Нейрогенез во взрослом гиппокампе, по-видимому, способствует контекстуальной дискриминации и когнитивной гибкости, снижая упреждение и обобщение переживаний стресса до безопасного уровня. Таким образом, нижележащие области мозга получают более точную и контекстуальную информацию, что позволяет более точно реагировать на стресс в конкретных контекстах [30]. Тем не менее конкретная роль

нейрогенеза во взрослом гиппокампе в опосредовании поведенческого ответа на хронический стресс остается не до конца изученной, и вопрос о том, действуют ли новорожденные нейроны как своеобразный буфер или, наоборот, повышают восприимчивость к вызванной стрессом эмоциональной дезадаптации, остается спорным [31].

В начале 2000-х гг. было подтверждено, что ГК/хронический стресс/нейровоспаление являются одними из самых важных отрицательных регуляторов нейрогенеза у взрослых. Хотя воздействие острого и умеренного стресса на нейрогенез, как правило, кратковременно и может быть быстро преодолено, хроническое воздействие или более тяжелые формы стресса могут вызывать более продолжительное угнетение нейрогенеза, которое лишь частично может быть преодолено последующим воздействием физических упражнений, приемом адаптогенных препаратов и некоторых антидепрессантов [32]. Не вызывает сомнения, что опосредованные ГК нарушения нейрогенеза у взрослых способствуют возникновению болезней мозга, включая когнитивные и аффективные нарушения, нейродегенеративные заболевания. Кроме того, воздействие стресса, особенно в критические периоды раннего детства, нарушая процессы нейрогенеза на длительный период, может перепрограммировать пластичность гиппокампа, увеличивая риск развития в дальнейшем когнитивных нарушений или симптомов тревоги, общих для ряда церебральных патологий, таких как деменция и депрессия, ассоциированных с хроническими изменениями пластичности гиппокампа. В обзоре Podgorny и Gulyaeva [33] подробно проанализировано влияние ГК на механизмы и физиологические особенности нейрогенеза во взрослом гиппокампе и изменения нейрогенеза при церебральных патологиях. Нервно-психические расстройства, как правило, ГК-зависимы, являясь результатом хронического стресса или боли с последующим (нейро)воспалением; все эти состояния ассоциированы с нарушением нейрогенеза и когнитивным дефицитом. Восприимчивость к стрессу и возможность адаптироваться к новым условиям с помощью механизмов устойчивости имеет прямое отношение к особенностям нейрогенеза взрослого гиппокампа и регуляции его ГК [34].

Скорость клеточного цикла и добавления новых нейронов к существующим нейронным цепям гиппокампа, несомненно, уменьшаются с возрастом. Тем не менее нейральные стволовые клетки/клетки-предшественники, которые сохраняются в гиппокампе стареющего

мозга, могут активироваться и продуцировать значительное количество новых функциональных нейронов, которые демонстрируют повышенную выживаемость и интеграцию при оптимальном наборе условий [35]. В зубчатой извилине новорождённые нейроны сосуществуют с возникшими в процессе развития зрелыми гранулярными нейронами, и связь между этими двумя типами клеток регулируют как кооперативные, так и конкурентные процессы. Можно предположить, что новые нейроны в стареющем гиппокампе обладают заметным потенциалом оптимизации процессов на уровне нейронных цепей и поведения, что делает нейрогенез потенциальной мишенью для терапии. Как гиппокамп, так и основная область, иннервирующая эту структуру, энторинальная кора, демонстрируют выраженную атрофию у пациентов с БА, наиболее распространенной формой деменции у пожилых людей [25, 36]. Важно, что наряду с ГК, киназа гликогенсинтазы GSK-3 β и гиперфосфорилированный тау-белок, две основных молекулы, значимые для патогенеза БА, являются мощными негативными регуляторами нейрогенеза взрослого гиппокампа [37].

При таких состояниях, как снижение памяти с возрастом, нейродегенерация и психические заболевания, зрелые нейроны погибают или становятся дефектными, поэтому стимуляция нейрогенеза у взрослых может обеспечить терапевтическую стратегию для преодоления этих состояний. Обучающие задачи, зависящие от гиппокампа, обогащенная среда, физические упражнения и зависимость от активности синаптическая пластичность мощно активируют пролиферацию предшественников нервных клеток в гиппокампе [21]. Для объяснения активации нейрогенеза такими воздействиями рассматривают механизмы усиления нейротрофических и других влияний, которые в норме являются положительными регуляторами нейрогенеза (например, уровни BDNF). Интересно, что физические упражнения связаны с повышением уровня ГК, однако отсутствие негативного эффекта этих гормонов на нейрогенез объясняется не чрезмерным и продолжительным, а «умеренным» и кратковременным их выбросом, так что их концентрации остаются в стимулирующей нейрогенез зоне. В одной из новых гипотез рассматривается влияние лактата, накопленного при физической нагрузке, на пластичность нейронов. Лактат, по-видимому, является одним из существенных факторов, поскольку участвует в метаболизме и передаче сигналов в большинстве, если не во всех, клетках центральной нервной

системы, включая различные типы клеток в нейрогенной нише [38].

ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКАЯ ТРАНСМИССИЯ И ГИПЕРГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ ЗАВИСЯТ ОТ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Хранение и обработка информации на синаптическом уровне обеспечивается способностью синапсов постоянно изменять свою эффективность. Считается, что это явление, ключевое событие синаптической пластичности, лежит в основе множественных форм долговременной памяти у млекопитающих. Именно возбуждающие глутаматергические синапсы играют решающую роль в синаптической передаче, синаптической пластичности и поведенческой адаптации. Почти три десятилетия назад было сделано предположение о том, что ГК и половые стероиды регулируют нейробиохимическую и структурную пластичность гиппокампа посредством клеточных механизмов, опосредованных N-метил-D-аспарататными глутаматными рецепторами (NMDAR) [39], и с тех пор это было подтверждено многочисленными экспериментальными результатами. Синаптическая пластичность гиппокампа, зависящая от глутаматных рецепторов, как считают многие ученые, является основой процессов обучения и поведенческой адаптации. Глутамат известен как основной возбуждающий нейромедиатор в центральной нервной системе, а функционирование глутаматергической системы обеспечивается многочисленными рецепторами, включающими ионотропные и метаботропные подтипы. Первый обеспечивает прохождение катионов через постсинаптическую мембрану, тогда как метаботропный подтип активирует сигнальные каскады через вторичные мессенджеры.

Ионотропные рецепторы глутамата опосредуют синаптические и метаболические действия глутамата. Наряду с NMDAR, к ионотропным глутаматным рецепторам относятся семейства функциональных рецепторов α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислоты (AMPA) и каинатные рецепторы. Функционирование ионотропных рецепторов в гиппокампе зависит от их субъединичного состава, аминокислотной последовательности белковых доменов и каркасных белков в синаптических мембранах. Эти рецепторы реактивно пластичны и перестраиваются посредством регуляции субъединиц (количественно и качественно). Именно

перестройки ионотропных рецепторов и изменение их субъединичного состава могут превращать нейроны в «патологические» клетки, определяя состояния пластичности или патологии гиппокампа [40]. Например, предполагается, что субъединица GluN2B может быть особенно важна для пластичности и формирования памяти, и ее роль связана со взаимодействием с кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназой II [41]. Считают, что NMDAR обеспечивают ключевой триггер для индукции долговременной пластичности, приводящей к изменениям экспрессии AMPAR. AMPAR, одни из самых быстродействующих рецепторов нейротрансмиттеров, расположены в возбуждающих синапсах, активируются за сотни микросекунд, деактивируются за миллисекунды из-за их низкого сродства к глутамату, а также способны к глубокой десенситизации [42]. Третий тип ионотропных рецепторов, каинатные, вносят вклад в критические постсинаптические сигналы, а также функционируют как пресинаптические ауторецепторы [43]. Каинатные рецепторы рассматриваются как гомеостатические модуляторы высвобождения нейромедиаторов, способные двунаправленно регулировать пластичность в зависимости от «функциональной истории» синапса [44]. Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR), группа рецепторов, связанных с G-белком, оказывают широкий спектр модулирующих действий на возбуждающие синапсы центральной нервной системы. В гиппокампе избирательная активация различных mGluR модулирует внутреннюю возбудимость, силу синаптической передачи и индуцирует множественные формы долговременной пластичности [45]. Эти рецепторы критически необходимы как для устойчивых форм памяти, так и для устойчивой синаптической пластичности. На основе связывания с G-белком и сродства к агонистам mGluR подразделяются на несколько отдельных групп, которые выполняют разные функции в регуляции гиппокамп-зависимых долговременной пластичности и долговременной памяти [46].

Как было упомянуто выше, гиппокамп является одной из наиболее важных мишеней стероидных гормонов в мозге. Стероидные гормоны и нейротрансмиттеры функционируют согласованно, и эта согласованность регулируется многочисленными механизмами. В обзоре Gulyaeva [11] приведена подробная схема известных к настоящему времени геномных и негеномных механизмов прямой модуляции различных типов глутаматных рецепторов, осуществляемой ГК через MR и GR

в глутаматергическом пресинапсе и постсинапсе. ГК быстро настраивают синаптические NMDAR посредством мембранной динамики и передачи сигналов через MR и вызывают долговременные изменения и сохранение «настроек» через механизмы, опосредованные GR. Тем самым ГК модулируют передачу глутаматергических сигналов и зависимую от NMDAR синаптическую пластичность гиппокампа, способствуя реализации адекватных поведенческих реакций на факторы окружающей среды. При этом ГК специфически контролируют динамику субъединицы GluN2B NMDAR и состояния синапса, настраивая NMDAR-зависимую синаптическую адаптацию [47].

Наряду с прямым действием на глутаматергический синапс, регуляторное действие ГК осуществляется и на иные критические процессы, обеспечивающие синаптическую пластичность, например, нейрогенез. Известно, что нейрогенез во взрослой и развивающейся зубчатой извилине «ограничивается» ГК, а также возбуждающими аминокислотами (в первую очередь глутаматом), и в обоих случаях механизмы задействуют NMDAR. Эти результаты не только указывают на высокую степень взаимозависимости между некоторыми нейротрансмиттерами и ГК, но также подчеркивают, насколько важным аспектом действия стероидных гормонов является структурная пластичность [48]. Новые нейроны постоянно генерируются из резидентных пулов нервных стволовых клеток и клеток-предшественников во взрослом гиппокампе, при этом NMDAR участвуют в регуляции пролиферации клеток-предшественников. Агонисты и антагонисты NMDAR модулируют пролиферацию как *in vivo*, так и *in vitro*, а в клетках-предшественниках нейронов показано наличие NMDAR.

Поглощение глутамата — это процесс, опосредованный натрий-зависимыми транспортерами глутамата, предотвращающий распространение глутамата из синапса. Как правило, астроциты отвечают за большую часть поглощения глутамата, экспрессируя переносчики глутамата, однако нейроны также могут экспрессировать эти переносчики, хотя и в меньших количествах. Эти транспортеры активно вовлечены в реализацию наиболее изученных феноменов долговременной синаптической пластичности — длительной потенциации и длительной депрессии [49]. Недостаточный обратный захват глутамата приводит к развитию гиперактивации глутаматергической системы, состояниям, которые в последнее время называют гиперглутаматергическими [50], и к опосредованной глутаматной

эксайтотоксичностью гибели нейронов. Показано, что кортикостерон ингибирует экспрессию микроглиального транспортера глутамата GLT-1 [51], модулирует экспрессию астроцитарного транспортера глутамата GLT-1 [52, 53], снижает активность транспортера глутамата типа 3 (EAAC1 или EAAT3) [54].

Учитывая важность глутаматергической передачи сигналов в синаптической пластичности, обучении и памяти, реализации движений, считают, что именно особенности глутаматергической нейротрансмиссии являются ключевыми для пластичности гиппокампа, а глутамат служит связующим звеном и основой баланса между состояниями когнитивного здоровья и болезни [55]. Глутаматергическая трансмиссия в значительной степени определяет функциональные свойства гиппокампа в конкретных ситуациях, обеспечивая ему соответствующее положение в континууме «пластичность—патология» [56]. Избыток внеклеточного глутамата вызывает чрезмерную стимуляцию ионотропных глутаматных рецепторов, вызывая гиперглутаматергические состояния с характерными для них эксайтотоксичностью, окислительным стрессом, структурно-функциональным повреждением клеток мозга [50]. Эти процессы играют решающую роль при развитии различных патологий головного мозга, ассоциированных с нарушениями нейропластичности, таких как инсульты, эпилепсия и нейродегенеративные заболевания [57].

Основной причиной возрастного снижения когнитивных функций долгое время считалась потеря нейронов, но в настоящее время эти изменения в большей степени связывают с постепенной синаптической дисфункцией, вызванной кальциевым дисгомеостазом и изменениями в ионотропных/метаботропных рецепторах. NMDAR играют центральную роль в механизмах, опосредующих старение синапсов. Области мозга, уязвимые для старения, проявляют самые ранние патологические изменения при БА. В гиппокампе, селективно уязвимой к неблагоприятным факторам и старению области мозга, нарушение синаптической функции при старении ассоциировано со сдвигами Ca^{2+} -зависимой синаптической пластичности, что, как полагают, способствует раннему когнитивному дефициту, связанному с развитием деменции, в т.ч. альцгеймеровского типа [58]. Изменения внутриклеточного окислительно-восстановительного состояния сопровождаются нарушениями регуляции Ca^{2+} , включая гипофункцию NMDAR и повышенное высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов, что изменяет синаптическую пластичность.

При БА β -амилоид и мутированный пресенилин-1 могут также ухудшать функцию NMDAR, способствуя высвобождению Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и усиливая окислительный стресс. Контроль mGluR5-зависимой активации NMDAR и последующей дисфункции Ca^{2+} при старении осуществляют аденозиновые рецепторы A2A [59]. При старении также наблюдаются изменения экспрессии и функциональности других метаботропных глутаматных рецепторов, в т.ч. в синапсах мшистых волокон — CA3 гиппокампа [45].

Поскольку ГК регулируют состояние глутаматергической системы мозга как непосредственно через рецепторы на глутаматергических синапсах, так и опосредованными путями [11], нарушение функционирования ГГНО и ее неспособность оптимально регулировать глутаматергическую синаптическую пластичность приводят к развитию нейропсихических заболеваний, в патогенезе которых ключевую роль играют гиперглутаматергические состояния. Нарушение контроля глутаматергических процессов посредством ГК лежит в основе когнитивных и эмоциональных расстройств, эпилепсии и ряда других церебральных патологий, являясь общим базовым механизмом развития многих болезней мозга и их коморбидностей [50]. В связи с этим исследование механизмов взаимодействия ГГНО и глутаматергической системы мозга имеет приоритетное трансляционное значение.

ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ И BDNF СОГЛАСОВАННО РЕГУЛИРУЮТ ПЛАСТИЧНОСТЬ ГИППОКАМПА

Семейство небольших секретируемых белков, называемых нейротрофинами, включает мощные молекулярные медиаторы центральной синаптической пластичности. В частности, нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), а также нейротрофин 3 (NT3) играют ключевую роль в нейробиологических механизмах, связанных с обучением и памятью. Влияние BDNF и NT3 на синаптическую пластичность может иметь перmissive характер, устанавливая условия, при которых могут происходить пластические изменения, или может быть инструктивным, непосредственно модифицирующим коммуникации и морфологию синапсов. BDNF выделяется среди всех нейротрофинов высоким уровнем экспрессии в головном мозге, в частности в гиппокампе, и мощным воздействием на синапсы [60]. BDNF оказывает плеiotропное

действие на морфологию нейронов и синаптическую пластичность, которое лежит в основе развития нервных цепей гиппокампа и когнитивной функции. BDNF способствует стабилизации и созреванию уже существующих синапсов, а также генерации новых синаптических контактов. Поскольку BDNF модулирует как электрические свойства, так и структурную организацию синапсов, он считается важным биологическим маркером процессов обучения и памяти [61].

Функция BDNF контролируется и диверсифицируется с помощью молекулярных и клеточных механизмов, включающих доставку и субклеточную компартиментализацию различных видов мРНК BDNF, пре- и постсинаптическое высвобождение BDNF, контроль передачи сигналов BDNF с помощью рецепторов TrkB (киназы рецептора тропомиозина В) и превращение про-BDNF в зрелый BDNF и BDNF-пропептид. Разнообразные эффекты BDNF на возбуждающие синапсы определяются активацией рецепторов TrkB и нижележащих сигнальных путей, а также противоположными в сравнении со зрелым BDNF функциями его незрелой формы (про-BDNF), активирующей рецепторы p75NTR. Нарушение этих регуляторных механизмов влияет на формирование дендритных шипиков и морфологию пирамидных нейронов, а также на синаптическую интеграцию [62]. Важнейшие аспекты биологии BDNF, такие как транскрипция, процессинг и секреция, регулируются синаптической активностью. Именно эти наблюдения привели к мысли о том, что BDNF может регулировать зависящие от активности нейронов формы синаптической пластичности, такие как долговременная потенция (LTP), устойчивое усиление возбуждающей синаптической эффективности в гиппокампе, которая, как считается, лежит в основе обучения и памяти [60]. BDNF высвобождается из пресинаптических окончаний возбуждающих нейронов (вероятно, дополнительно также из постсинаптических окончаний) и действует через рецептор TrkB на пре- и постсинаптических участках возбуждающих, в первую очередь глутаматергических нейронов, и на тормозных нейронах [63]. BDNF считают центральным регулятором пластичности нейронов во взрослом гиппокампе не только потому, что он опосредует морфологические корреляты пластичности нейронов — изменения на уровне дендритных шипиков, но по крайней мере в зубчатой извилине взрослого гиппокампа BDNF контролирует пластичность и на уровне нейрогенеза. Специфиче-

ские изменения дендритных шипиков, а также нейрогенеза взрослого гиппокампа можно наблюдать в контексте нескольких форм обучения и памяти [64].

«Поведенческие решения», принимаемые мозгом во время стресса, зависят от сигнальных путей ГК и BDNF, действующих синхронно в мезолимбической (вознаграждение) и кортиколимбической (эмоции) нейронных сетях. Нарушение регуляции экспрессии BDNF и GR в осуществляющих оценку внешних факторов зонах мозга, включая гиппокамп, может поставить под угрозу интеграцию сигналов. Фосфорилирование GR при передаче сигналов BDNF в нейронах представляет собой один из механизмов, лежащих в основе интеграции сигналов BDNF и ГК, который при дисбалансе может служить базисом для дезадаптации к стрессу. Взаимодействие между ГК и BDNF определяет реакцию на стресс: вызванное стрессом ремоделирование гиппокампа, префронтальной коры и миндалевидного тела совпадает с изменениями уровней BDNF [65]. Хронический стресс обычно связан со снижением уровня BDNF, хотя эффект воздействия определяется характером и серьезностью стимула, различается в разных областях мозга и изменяется со временем в период и после воздействия стрессора [66]. Эффекты ГК и BDNF на структурную и клеточную пластичность гиппокампа, как правило, имеют противоположный характер [13, 66, 67]. Взаимодействие между ГК и BDNF также может играть роль в острых, быстрых и адаптивных реакциях на стресс и является важной мишенью для передачи сигналов, опосредованных BDNF [68]. BDNF индуцирует фосфорилирование GR, что, обеспечивая скоординированные/парные действия BDNF и ГК, по-видимому, является необходимым звеном реакции нейропластичности на стресс. Таким образом, взаимодействие между ГК и BDNF на фоне влияния других молекул может способствовать пластичности в адаптивной реакции на стресс. Изменение этого взаимодействия в экстремальных условиях также может быть вовлечено в неадаптивные, патологические реакции на стресс, приводя к когнитивным нарушениям и болезненным состояниям. Согласованность между передачей сигналов TrkB и GR является определяющим фактором для адекватных клеточных ответов на стресс [60].

Как было отмечено ранее, хроническое воздействие ГК вызывает повреждение нейронов и атрофию дендритов, снижает нейрогенез в гиппокампе и ухудшает синаптическую пластичность. Поскольку ГК также изменяют

экспрессию и передачу сигналов BDNF, который способствует нейропластичности, повышает выживаемость клеток, увеличивает нейрогенез гиппокампа и клеточную возбудимость, было высказано предположение, что специфические побочные эффекты ГК могут быть опосредованы ослаблением экспрессии и передачи сигналов BDNF [13]. Глюкокортикоидная регуляция BDNF осуществляется на нескольких уровнях, от глюкокортикоид-индуцированных изменений в мРНК BDNF до изменений в передаче сигналов, опосредованной TrkB. Транскрипция *Bdnf* может модулироваться ГК либо путем прямого связывания с предполагаемыми элементами глюкокортикоидного ответа (GREs), присутствующими в промоторных областях, либо путем вмешательства в активность других факторов, способствующих транскрипции *Bdnf*, таких как комплекс активирующего белка-1 (AP-1) и транскрипционный фактор CREB (cAMP response element-binding protein) [69]. В дополнение к транскрипционной регуляции *Bdnf* ГК также потенциально могут изменять трансляцию гена *Bdnf* путем модуляции активности трансляционного механизма. Превращение секретированного pro-BDNF в зрелый BDNF опосредуется множеством внутриклеточных и внеклеточных протеаз, включая фуриновые и прогормон-пропротеиновые конвертазы внутри клетки, а также систему плазмин-тканевой активатор плазминогена (tPA) и матриксные металлопротеиназы (MMP) вне клеток. ГК могут модулировать уровни или активность внутриклеточных и внеклеточных протеаз и, таким образом, регулировать уровни доступного зрелого BDNF. Зрелый BDNF связывается с внутриклеточными шаперонами, которые позволяют сортировать BDNF по регулируемому секреторному пути или конститутивному пути. Про-BDNF и зрелый BDNF упаковываются и доставляются либо в дендриты, либо в аксоны. BDNF высвобождается в ответ на активность нейронов и постсинаптически взаимодействует со своим рецептором TrkB или низкоаффинным рецептором p75NTR для активации различных сигнальных каскадов. Связываясь с TrkB, BDNF активирует пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), фосфолипазы C (PLC) и фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3-киназа). Активация этих сигнальных путей осуществляет функциональную модуляцию нижележащих молекул-мишеней, участвующих в синаптической пластичности, выживании нейронов и клеточной возбудимости. ГК потенциально модулируют активность этих сигнальных пу-

тей на нескольких уровнях. ГК предотвращают взаимодействие TrkB со специфическими адаптерными белками, такими как Shp2, таким образом, нарушая активацию пути MAPK. Кроме того, ГК стимулируют транскрипцию белка-ингибитора MAPK, фосфатазы MAPK-1 (MKP-1), который служит для прекращения передачи сигналов MAPK. ГК также ухудшают взаимодействие TrkB и GR, тем самым ограничивая активацию фосфолипазного пути [69].

Роль BDNF, как трофического фактора и центрального регулятора синаптической пластичности, осуществляется в рамках тесного взаимодействия BDNF с другими системами. В первую очередь действие BDNF зависит от коактивации ГК и других факторов как детерминант окончательного клеточного ответа [66]. Возбуждающий нейротрансмиттер глутамат и BDNF являются наиболее важной «регуляторной парой» для синаптической пластичности во всей центральной нервной системе [70]. Система BDNF и глутаматергическая система тесно связаны и активно взаимодействуют в формировании пластичности гиппокампа. Связи между двумя системами многочисленны и двунаправлены, и именно сложная и хорошо координируемая природа этих связей обеспечивает оптимальную синаптическую и клеточную пластичность [71]. Обе системы находятся под контролем ГК, которые и обеспечивают их координацию и согласованное функционирование. Обе системы связаны с патогенезом депрессии, и нарушение тесных и хорошо сбалансированных связей между ними приводит к неблагоприятным изменениям нейронной пластичности, лежащим в основе депрессивных расстройств и других психических заболеваний.

Все нейротрофины сначала синтезируются как пронеуротрофины, а затем расщепляются внутриклеточно и внеклеточно. Все больше данных свидетельствует о том, что пронеуротрофины и зрелые нейротрофины играют противоположную роль в центральной нервной системе. Это представление касается участия фактора роста нервов (NGF), BDNF, нейротрофинов 3 и 4 (NT3, NT4) и их соответствующих форм в клеточных процессах, связанных с обучением и памятью. Среди механизмов «созревания» BDNF раскрыт полностью конкретный посттрансляционный механизм, а именно превращение предшественника BDNF в зрелый BDNF путем протеолитического расщепления [72]. В дополнение к активно изучаемой роли BDNF оказалось, что специфические биологические роли в синаптической пластичности играют также эндогенно секретируемые

нервными клетками белок-предшественник BDNF и продомен BDNF, названный пропептидом BDNF [73]. Первоначально считалось, что пронеуротрофины являются простыми неактивными предшественниками, ответственными только за обеспечение фолдинга зрелого домена и за регуляцию секреторного пути нейротрофинов. Однако оказалось, что пронеуротрофины являются биологически активными благодаря передаче сигналов через специфические рецепторы, в первую очередь p75NTR. Недавние исследования показывают, что пронеуротрофины могут секретироваться во внеклеточное пространство, связываться с высоким сродством со специфическими рецепторными комплексами и индуцировать активацию апоптотического механизма с последующей гибелью клеток различных популяций нейронов. В дополнение к очевидным патологическим ситуациям внеклеточные пронеуротрофины также играют ключевую роль во многих других клеточных механизмах в нервной системе [74]. Показано, что пронеуротрофины опосредуют синаптическую пластичность, а именно долговременную депрессию в нейронах гиппокампа, и важны для развития аксонов. Превращение пронеуротрофинов в соответствующую зрелую форму контролируется действием нескольких ферментов (протеиназ) и регуляторов. Сбой в этой регуляции в настоящее время считается одним из возможных механизмов, ответственных за патологическую гибель клеток, зависимость от пронеуротрофинов. По современным представлениям, различают нейробиологические действия трех различных подтипов BDNF, описанных выше, и сформулирована мультилигандная модель передачи сигналов факторов роста [75]. Эффекты BDNF на синаптический протеом реализуются либо путем воздействия на механизм синтеза белка, либо путем регуляции деградации белка кальпаинами и, возможно, убиквитин-протеасомной системой. Этот точно настроенный контроль синаптического протеома, а не просто активация синтеза белка, может играть ключевую роль в опосредованной BDNF синаптической потенциации [76].

Стресс, который, возможно, остается фактором риска «наименьшего общего знаменателя» для ряда психических и неврологических заболеваний, влияет на систему BDNF в областях и цепях мозга, селективно уязвимых к действию внешних факторов. Это представление основано как на экспериментальных, так и на клинических данных. Отмечается, что BDNF играет до сих пор недооцененную многофакторную роль как регулятора,

так и мишени передачи сигналов ГК/стресса в мозге [77]. Одной из гипотез, объясняющих возникновение и тяжесть психических и неврологических расстройств, является потеря трофической поддержки [13]. Действительно, изменения уровней и активности BDNF происходят при многочисленных нейродегенеративных и психоневрологических заболеваниях. Дефицит способствует уязвимости, тогда как усиление функции системы BDNF способствует восстановлению за счет повышения выживаемости, образования синапсов и синаптической пластичности. Нормальный уровень ГК поддерживает нормальную функцию мозга, избыточная секреция ГК ускоряет развитие аффективных расстройств, связанных со стрессом. Другая логика, приводящая к тем же выводам, основана на том, что синергические взаимодействия между активностью нейронов и синаптической пластичностью, опосредованной BDNF, делают его идеальным и важным регулятором клеточных процессов, лежащих в основе познания и других сложных форм поведения, а дефицит передачи сигналов BDNF способствует патогенезу ряда заболеваний мозга, таких как болезнь Гентингтона, БА и депрессия [78].

Представление о том, что нарушение передачи сигналов BDNF может быть связано с аффективными расстройствами, возникло в первую очередь из данных о противоположных эффектах антидепрессантов и стресса на опосредованную BDNF сигнализацию. Антидепрессанты усиливают передачу сигналов BDNF и синаптическую пластичность, а негативные факторы окружающей среды, такие как тяжелый стресс, подавляют передачу сигналов BDNF, нарушают синаптическую активность и снижают устойчивость к аффективным расстройствам [79]. Исследования на людях с полиморфизмом одного нуклеотида в гене, кодирующем BDNF, BDNF Val66Met, наличие которого влияет на регулируемое высвобождение BDNF, показали глубокий дефицит пластичности гиппокампа и префронтальной коры, а также когнитивной функции у носителей этой мутации. BDNF регулирует синаптические механизмы, ответственные за различные когнитивные процессы, включая ослабление аверсивных воспоминаний, что является ключевым процессом в регуляции аффективного поведения. Поэтому уникальная роль BDNF в когнитивных функциях и аффективном поведении предполагает, что когнитивный дефицит из-за измененной передачи сигналов BDNF может лежать в основе аффективных расстройств. Хронический

стресс и депрессия связаны с атрофией нейронов и уменьшением синаптических связей в областях мозга, таких как гиппокамп и префронтальная кора, и это способствует депрессивному поведению, а лечение антидепрессантами может обратить этот дефицит. Воздействие стресса и депрессии снижает экспрессию BDNF в этих областях мозга, а лечение антидепрессантами может активировать BDNF в мозге взрослого человека и нивелировать последствия стресса. Новые данные о механизмах действия быстродействующих антидепрессантов, в частности антагониста NMDAR кетамина, показали, что наблюдаемые быстрые синаптические и антидепрессивные поведенческие эффекты кетамина ассоциированы с зависимым от активности нейронов высвобождением BDNF [80].

BDNF действует как паракринный и аутокринный фактор на участках-мишенях, как пресинаптических, так и постсинаптических. Это имеет решающее значение для преобразования синаптической активности в долговременные синаптические изменения, ассоциированные с воспоминаниями. BDNF влияет на дендритные шипики и, по крайней мере в гиппокампе, на нейрогенез, а именно изменения скорости нейрогенеза и плотности шипиков могут влиять на некоторые формы обучения и памяти, с одной стороны, или способствовать депрессивному поведению — с другой. С учетом этого не удивительно, что BDNF, одна из ключевых молекул, модулирующих пластичность мозга и влияющих на когнитивный дефицит, ассоциирован со старением и нейродегенеративными заболеваниями. Снижение когнитивных функций с возрастом является основным фактором ряда заболеваний мозга, и изменения генерации и секреции BDNF, а также передачи сигналов BDNF/TrkB обнаружены при различных нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при БА и болезни Паркинсона, а также при расстройствах настроения, таких как депрессия, расстройства пищевого поведения и шизофрения [81, 82].

ГЛИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА: АСТРОЦИТЫ, МИКРОГЛИЯ, НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ

Астроциты, наиболее распространенные в головном мозге глиальные клетки, играют ключевую роль в регуляции синаптической пластичности гиппокампа. Ранее астроциты описывали как гомогенную клеточную по-

пуляцию, но в настоящее время показано, что во взрослом гиппокампе астроциты очень гетерогенны и могут по-разному реагировать на изменения активности нейронов в зависимости от субрегиона гиппокампа, активно модулируя синаптическую пластичность [83]. Изменения локальной активности нейронов регулируют взаимодействия между астроцитами и синапсами либо путем модуляции секреции глутрансмиттеров и синаптогенных белков, либо через сигнальные пути, запускаемые прямыми межклеточными контактами [84]. Такие специфические реакции, индуцированные в астроцитах, опосредуют взаимодействия между астроцитами и нейронами, тем самым формируя синаптическую коммуникацию во взрослом гиппокампе. Нарушение регуляции этих взаимодействий и передачи сигналов может вызывать дисфункцию нейронных сетей гиппокампа при патологических состояниях, приводя к когнитивным нарушениям и нейродегенерации. Показано, что в мозге пациентов с БА и у трансгенных мышей, моделей БА, происходит индукция реактивных астроцитов, у которых нарушена регуляция передачи сигналов, потенциально связанных с обучением и памятью [85].

Наряду с нейронами, астроциты являются стресс-реактивными клетками, а наличие астроцитарных GR обуславливает прямую регуляцию посредством ГК этих глиальных клеток, в т.ч. в стрессорных ситуациях. «Детский стресс» (неблагоприятные переживания в детстве, один из наиболее значимых факторов риска развития расстройств настроения и тревожных расстройств в более позднем возрасте) в настоящее время является одной из наиболее часто используемых и трансляционно валидных ГК-зависимых моделей стресса у грызунов. Особенно в лимбической системе стресс в раннем возрасте вызывает длительные изменения в нейронных сетях, системах нейротрансмиттеров, нейронной архитектонике и пластичности, и эти изменения в дальнейшем существенно влияют на обработку эмоциональной и когнитивной информации. Показано, что функции астроцитов, наряду с нейронами, также практически пожизненно изменяются после стресса в раннем возрасте [86]. Являясь компонентом трехстороннего синапса, астроциты взаимодействуют с нейронами несколькими способами, влияя на поглощение и метаболизм нейротрансмиттеров, секретирруя глутрансмиттеры и обеспечивая энергией нейроны в локальных сетях. Таким образом, астроциты осуществляют модуляцию пластичности нейронов, опосредуя

долгосрочные эффекты стресса в раннем возрасте, запускаемые ГК.

Как уже упоминалось, нейрогенез во взрослом гиппокампе является одной из самых ярких форм пластичности, и появляется все больше доказательств того, что этот процесс ассоциирован как с механизмами памяти, так и с развитием когнитивных и депрессивных расстройств. Астроциты являются частью нейрогенной ниши, которая обеспечивает структурный и молекулярный каркас для пролиферации стволовых клеток и дифференцировки, и функциональной интеграции новых нейронов [87]. Астроциты вносят существенный вклад в контроль нейрогенеза, а изменения в функции астроцитов могут нарушать регуляцию нейрогенеза у взрослых и способствовать развитию когнитивных нарушений, в т.ч. в контексте БА и расстройств эмоциональной сферы.

Центральная нервная система ранее считалась иммунно-привилегированным участком организма с отсутствием ответов иммунных клеток, но эта точка зрения к настоящему времени полностью пересмотрена. Микроглия представляет собой резидентные тканевые макрофаги, врожденные иммунные клетки головного мозга, ответственные за поддержку функционирования нейронов и иммунную защиту паренхимы головного мозга. Это первичные иммунные эффекторные клетки в ЦНС, которые регулируют широкое взаимодействие между нервной и иммунной системами в ответ на различные иммунологические, физиологические и психологические стрессоры. Поэтому микроглия способствует нормальной функции мозга, но и вовлечена в различные церебральные патологии [88]. Микроглия обладает высокой пластичностью и играет неотъемлемую роль в формировании структуры мозга, совершенствовании нейронных цепей и синапсов, активно способствуя пластичности нейронов в здоровом мозге. Недавние исследования выявили различные характеристики микроглии, специфичные для определенных областей мозга, и показали, что созревание и функция отдельных нейронных цепей могут быть потенциально связаны с молекулярной идентичностью микроглии в разных структурах мозга [89]. Микроглия может играть роль в физиологических и патологических состояниях, регулируя рост аксонов и дендритов, содействуя образованию, устранению и перемещению синапсов, модулируя функционирование возбуждающих синапсов, участвуя в функциональной синаптической пластичности. В конечном итоге в зависимости от

окружающих условий микроглия по-разному модулирует состояние гиппокампа и влияет на память [90]. Как было упомянуто выше, новые нейроны постоянно генерируются из стволовых клеток и интегрируются во взрослый гиппокамп, внося свой вклад в высший уровень нейропластичности, — функцию памяти. Получены данные, которые свидетельствуют о модулирующем участии микроглии как в образовании новых нейронов, так и в механизмах, управляющих их включением в цепи нейронов, связанных с реализацией памяти [90]. Микроглия гиппокампа взаимодействует с локальными факторами, например, BDNF, и внешними стимулами, которые способствуют нейрогенезу. Микроглия взаимодействует с серотонином, нейротрансмиттером, решающим образом участвующим в нейрогенезе у взрослых и известным своей ролью в антидепрессивном действии [91].

Стрессорные события вызывают, среди прочего, быстрое повышение уровня адреналина в мозге и более медленное повышение ГК. Микроглия, ключевой регулятор функции нейронов, содержит рецепторы адреналина и ГК, и поэтому потенциально может быть вовлечена в модуляцию воздействия стресса на функции нейронов, обучение и память [92]. Поскольку в зрелом мозге микроглия влияет на синаптическую передачу сигналов, обеспечивает трофическую поддержку и участвует в синаптической пластичности, эти клетки являются, наряду с нейронами, участниками реализации регуляторных эффектов ГК на различные формы пластичности мозга.

Гиперактивность ГГНО при хроническом стрессе и ряде психоневрологических заболеваний вызвана уменьшенным ингибированием ГК по обратной связи вследствие снижения передачи сигнала ГГНО и повышенной секреции CRH из гипоталамического паравентрикулярного ядра и внегипоталамических нейронов. Во время ингибирования системной обратной связи, вызванного хроническим стрессом, происходит повышение уровня цитокинов, секретируемых как иммунными, так и неиммунными клетками, при этом уровни цитозольных GR в гиппокампе и префронтальной коре изменяются. Продолжительные реакции на стресс и избыток цитокинов нарушают пластичность нейронов, а воспалительные реакции в мозге способствуют повреждению клеток [93]. Стресс, особенно хронический, вызывает увеличение количества микроглии, а также сдвиг в сторону провоспалительного фенотипа. В результате значимых стрессорных воздействий нарушается взаимодействие микро-

глии с нейронами и передача глутаматного сигнала; иммунные реакции микроглии после стресса изменяют метаболизм триптофана, активируя кинурениновый путь, в ходе которого образуются метаболиты, нарушающие глутаматную передачу (кинуреновая кислота — эндогенный антагонист NMDAR). Все эти эффекты могут лежать в основе нарушений памяти и синаптической пластичности, вызванных сильным или длительным стрессом разной природы. Например, психологический стресс может нарушать функцию микроглии, что вносит вклад в нарушение пластичности нейронов и развитие изменений эмоционального поведения. Вызванная стрессом дисфункция микроглии может лежать в основе дефицита нейропластичности, связанного со многими психическими заболеваниями [88].

Активация микроглии является отличительной чертой практически всех известных патологий головного мозга. Хроническая активация микроглии может, в свою очередь, вызывать повреждение нейронов за счет высвобождения потенциально цитотоксических молекул, таких как провоспалительные цитокины, кислородные радикалы, протеиназы и белки комплемента [94]. Острая воспалительная реакция микроглии на травму, стресс или инфекцию включает высвобождение цитокинов и фагоцитоз поврежденных клеток. Накапливающиеся данные указывают на хроническое воспаление, опосредованное микроглией, практически при всех заболеваниях центральной нервной системы, ассоциированных с эмоциональной и когнитивной сферами, и его связь с прогрессированием заболеваний. Гиппокамп особенно уязвим для нейровоспаления, хотя хемокины и цитокины активно участвуют в нормальном нейрогенезе, клеточной пластичности, обучении и памяти. Нейроиммунные взаимодействия и иммунные сигнальные молекулы, особенно хемокины, могут быть основным механизмом, объединяющим пластичность и уязвимость гиппокампа и переключающим эти состояния под действием внешних и внутренних факторов [95].

Микроглия осуществляет регуляцию нейроиммунных путей, влияющих на нейропластичность и потенциально ведущих к депрессивным расстройствам, патогенез которых прямо связан с избыточной секрецией ГК и нарушенной регуляцией ГГНО. Было предложено несколько гипотез о роли микроглии в возникновении депрессии, но все они так или иначе включают ключевые молекулярные пути, опосредующие нейровоспаление, связанное с микроглией, и дегенерацию нейро-

нов гиппокампа. Избыток ГК и связанные с ним изменения экспрессии генов нейротрофических факторов, а также нейроактивных веществ, секретируемых микробиотой кишечника, влияют на морфологию и фенотип микроглии [96]. Нейропсихические расстройства (например, расстройства настроения и шизофрения) и воспаление тесно переплетены и, возможно, усиливают друг друга; например, депрессия способствует воспалительным реакциям, а воспаление способствует депрессии и другим нервно-психическим расстройствам. У пациентов с нервно-психическими расстройствами обнаруживаются все основные признаки воспаления, в том числе повышенный уровень циркулирующих индукторов воспаления, активированные мишени и медиаторы воспаления, воздействующие на все ткани. Воспаление может способствовать патофизиологии и клиническому прогрессированию этих нарушений. Следует отметить, что избыток провоспалительных цитокинов негативно модулирует эмоциональное поведение и познание, снижая уровень моноаминов в мозге, активируя нейроэндокринные реакции, способствуя эксайтотоксичности и нарушая пластичность мозга. При этом изменения регуляции ГГНО выступают как важный триггер нейровоспаления [97].

Считается, что воспаление в центральной нервной системе играет ключевую роль и в процессах, ведущих к гибели нейронов при ряде нейродегенеративных заболеваний, включая болезнь Паркинсона, БА, прионные заболевания, рассеянный склероз и ВИЧ-деменцию. Повторяющееся воздействие стресса, опосредованное избыточной секрецией ГК и нарушением контроля ГГНО, повышает риск развития нейродегенеративных заболеваний, включая sporadическую БА. Показано, что микроглия причинно связана с накоплением β -амилоида, гиперфосфорилированием тау-белка, нейродегенерацией и потерей синапсов при БА, хотя и играет позитивную роль, особенно в элиминации избытка β -амилоидных пептидов фагоцитами. Участие измененной в результате хронического стресса микроглии ассоциировано, в частности, с появлением новых фенотипов микроглии, предположительно, связанных нейропротекцией при БА [98]. БА рассматривается как вариант патологического старения, но микроглия является ключевым клеточным элементом и в механизмах нормального старения. Пожилые люди часто испытывают снижение когнитивных функций после стрессорных событий, которые вызывают активацию иммунной системы (например,

инфекции или травмы). Это происходит отчасти потому, что старение повышает чувствительность реакции микроглии к иммунным сигналам. В стареющем мозге микроглия реагирует на эти сигналы, производя больше цитокинов и в течение более долгого периода. Хотя присутствие микроглии необходимо для реализации памяти, сверхактивированная иммунными сигналами микроглия избыточно вырабатывает воспалительные цитокины, что неблагоприятно для функции памяти в связи с мощным негативным воздействием цитокинов на синаптическую пластичность гиппокампа. BDNF помогает защитить нейроны от повреждения, вызванного инфекцией или травмой, и играет критическую роль в тех же процессах памяти и пластичности гиппокампа, которые изменены нарушением регуляции продукции интерлейкинов микроглией [99]. Избыточная воспалительная реакция мозга, возникающая при старении под действием вторичного иммунного вызова, может ослабить способность обеспечивать BDNF, необходимый для процессов пластичности, связанных с памятью, в синапсах гиппокампа. Нарушения ГГНО при старении, наиболее вероятно, являются ключевой причиной многоступенчатого каскада, который ассоциирован с изменением реактивности микроглии на действие стрессорных факторов.

ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ УЧАСТВУЮТ В ЗАВИСИМОЙ ОТ ПРОТЕАЗ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА

Поскольку все пластические перестройки в мозге так или иначе связаны с модификацией структуры белковых молекул и происходящими вследствие этого изменениями их функционирования, регуляция ферментов, катализирующих посттрансляционные модификации белков, несомненно, важна для реализации феноменов нейропластичности. Так, обучение и память требуют изменения числа и силы существующих синаптических связей, и внеклеточный протеолиз в синапсах играет ключевую роль в синаптической пластичности, определяя структуру, функцию и число синапсов. Ранняя фаза хорошо изученных феноменов синаптической пластичности, долговременной синаптической потенциации и депрессии, зависит от посттрансляционных модификаций синаптических белков. Имеются многочисленные доказательства роли различных типов протеаз в синаптической пластичности, что отражает разнообразие ме-

ханизмов, участвующих в регуляции уровней внутриклеточных и внеклеточных белков в разных клеточных и неклеточных компартментах [100]. Расщепление внеклеточных белков связано с изменениями постсинаптических внутриклеточных механизмов, а дополнительные изменения в этом компартменте являются результатом опосредованного протеазами расщепления внутриклеточных белков. Оба механизма способствуют инициации сигнальных каскадов, которые управляют нисходящими путями, связанными с синаптической пластичностью. В обзоре Salazar et al. [100] обобщены данные о роли в синаптической пластичности внеклеточных и внутриклеточных протеаз с различной специфичностью, локализации и регуляции этих ферментов. Комбинированные действия протеаз и механизмов трансляции обеспечивают жесткий контроль синаптического протеома, важного для долговременной пластичности. Тем не менее можно признать, что роль протеаз в нейропластичности недооценена в связи с недостаточным числом исследований.

Регулируемый внеклеточный протеолиз играет ключевую роль в структурном и функциональном ремоделировании синапсов во время развития мозга, обучения и формирования памяти. Синапсы мшистых волокон на пирамидных клетках СА3 гиппокампа демонстрируют несколько уникальных функциональных особенностей, включая кратковременную фасилитацию, пресинаптические механизмы долговременной потенциации, а также независимую от активации NMDAR и NMDA-зависимую метапластичность. Функциональная и структурная пластичность синапсов мшистых волокон опосредована внеклеточным протеолизом. Показано, что среди перисинаптических протеаз решающую роль в формировании пластических изменений играют тканевый активатор плазминогена (tPA)/система плазмина, расщепляющий белок-предшественник амилоида (APP), фермент β -секретаза 1 (BACE1) и металлопротеиназы [101]. Хотя общепризнано, что именно синаптическая пластичность возбуждающих синапсов гиппокампа играет решающую роль в формировании следов памяти, некоторые компоненты нейропластичности связаны с несинаптическими изменениями. Активность внеклеточных протеаз может влиять на обработку информации в нейронных сетях, воздействуя на мишени за пределами синапсов. Интересно, что внеклеточный протеолиз может изменять внутреннюю возбудимость нейронов и баланс возбуждения/торможения как кратковременно

(от минут до часов), так и в долгосрочной перспективе. Более того, оказалось, что путем расщепления компонентов внеклеточного матрикса протеазы могут модулировать функцию ионных каналов или изменять торможение и, следовательно, облегчать активное участие дендритов и начальных сегментов аксонов в регулировании функции нейронов. В целом, возникает картина, согласно которой как быстрый, так и длительный внеклеточный протеолиз могут влиять на некоторые аспекты обработки информации в нейронах, такие как инициация потенциала действия, адаптация частоты спайков, свойства потенциала действия и обратное распространение нервного импульса в дендритах [102].

Регуляторные эффекты ГК на активность важных для нейропластичности протеаз также недостаточно изучены, однако целый ряд данных свидетельствует о том, что эта группа ферментов находится под контролем ГК, хотя конкретные механизмы не всегда детально описаны. Тем не менее ряд данных об изменениях активности важных для нейропластичности протеаз под действием стресса, ГК или лигандов рецепторов ГК указывают на роль протеаз как одного из основных факторов регуляции нейропластичности под контролем ГК.

Прежде чем рассмотреть данные о регуляции ГК протеолитической активности протеаз мозга при реализации феноменов нейропластичности, напомним, что пагубное влияние хронически повышенных уровней ГК на структуру и функцию нейронов вплоть до их гибели многократно описано и может считаться общим местом. Проапоптотические эффекты ГК, приводящие к гибели нейронов, по определению, включают активацию апоптотических протеаз, в т.ч. каспаз и кальпаинов. Тем не менее даже такие «разрушающие» ферменты экспрессируются в норме и расщепляют белки, важные для нейропластичности. Например, ранее мы показали, что в норме каспаза-3 необходима для поддержания пластичности гиппокампа, поскольку среди ее субстратов немало белков (в т.ч. цитоскелетных), ограниченный протеолиз которых необходим для реализации нормальной синаптической пластичности [103, 104]. Кальпаины представляют собой семейство растворимых кальций-зависимых протеаз, которые участвуют во многих регуляторных путях, а также играют существенную роль в нейропластичности. Две изоформы кальпаина, кальпаин-1 и кальпаин-2, выполняют противоположные функции в головном мозге. Активация кальпаина-1 необходима для определенных форм синапти-

ческой пластичности и соответствующих типов обучения и памяти, в то время как активация кальпаина-2 ограничивает степень пластичности и обучения. Кальпаин-1 оказывает нейротрофическое действие как во время постнатального развития, так и у взрослых, тогда как кальпаин-2 стимулирует нейродегенерацию [105]. К сожалению, прямых данных о механизмах регуляции ГК «апоптотических» протеаз, каспаз и кальпаинов при реализации нормальной пластичности до сих пор немного. Показано, что в гиппокампе взрослых крыс Wistar 10-дневный иммобилизационный стресс приводил к значительному снижению числа нейрональных и астроглиальных клеток в областях CA1 и CA3, увеличению числа каспаза-3-позитивных клеток, повышению уровня мРНК гена, кодирующего GR, и снижению уровня мРНК гена, кодирующего MR (максимально в зубчатой извилине и области CA3) [106]. В данном эксперименте появление активной каспазы-3 было связано, по-видимому, с апоптотической гибелью клеток.

Исходя из плеiotропной функции протеаз, в основе которой лежит относительно низкая субстратная специфичность этих ферментов и большое число потенциальных субстратов каждого из них, можно предположить, что имеется много потенциальных мишеней протеаз при реализации синаптической пластичности в гиппокампе и что эти процессы ассоциированы с ГК. Например, ГК могут модулировать уровни или активность внутриклеточных и внеклеточных протеаз и, таким образом, регулировать уровни доступного зрелого BDNF [13]. Диффузный и структурированный внеклеточный матрикс составляет около 20% объема мозга и играет важную роль в развитии и пластичности взрослого мозга. Перинейронные сети, специализированные структуры внеклеточного матрикса, окружают определенные типы нейронов в мозге. Стресс влияет на диффузный матрикс, а также на перинейронные сети, причем эффекты стресса зависят от возраста и области мозга [107]. ММР являются компонентом внеклеточного матрикса и мишенями ГК/стресса. Активность ММР9, желатиназы, участвующей в процессах синаптической пластичности, обучения и памяти, повышена как в моделях на животных с хроническим стрессом, так и в образцах периферической крови пациентов с депрессией. В мышинной модели депрессии/тревожности с хроническим введением кортикостерона активность ММР9 и уровни белка были значительно повышены, а уровни субстрата ММР9 нектин-3 — снижены в гиппокампе,

в основном в областях CA1 и CA3 [108]. Активность MMP9 коррелировала с поведением отчаяния в этой модели депрессии. Ремоделирование гиппокампа при хроническом стрессе сопровождается гиперэкспрессией GR, протеасом и каспазы-3. В культивируемых крысиных астроцитах добавление глюкокортикоида дексаметазона снижало базальные уровни MMP3 и мРНК MMP9, однако предварительная обработка дексаметазоном уменьшала индуцированное эндотелином повышение мРНК MMP. Эффекты эндотелина-1 на высвобождение белков MMP3 и MMP9 ослаблялись предварительной обработкой дексаметазоном. Эти результаты показывают, что дексаметазон подавляет астроцитарные рецепторы эндотелина и снижает продукцию MMP, индуцированную эндотелином [109]. В первичных культурах эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга крысы дексаметазон частично ингибировал индуцированную цитокинами активацию MMP9 [110], а в мышинной линии эндотелия сосудов головного мозга сEND дексаметазон индуцировал экспрессию ингибитора металлопротеиназ TIMP-1, который эффективно подавляет активность MMP9 [111]. На рыбках *Danio rerio* также было показано, что экспрессия гена *Mmp13* в мозге является мишенью для ГК [112].

В большинстве случаев молекулярный механизм, лежащий в основе патогенеза спорадической БА, неизвестен. Повышенные базальные уровни кортизола у пациентов с БА позволяют предположить, что ГК могут способствовать развитию и/или поддержанию заболевания. Амилоидные бляшки являются отличительной чертой БА, и считается, что они играют роль на ранних стадиях БА. Однако мало известно о том, как их образование регулируется стрессом и ГК. В работе Wang et al. [113] показано, что ГК стимулируют образование астроцитарного β -амилоидного пептида за счет увеличения экспрессии APP и APP-расщепляющего фермента BACE1, а также снижение экспрессии β -амилоид-деградирующих протеаз. Накопление астроцитов является одним из самых ранних изменений при БА. Показано, что ГК повышают продукцию амилоида- β в первичных культурах астроцитов за счет увеличения экспрессии гена *App* и β -сайта BACE1. Примечательно, что введение ГК нормальным мышам среднего возраста способствовало экспрессии APP и BACE1 в астроцитах. ГК заметно снижали деградацию и клиренс β -амилоида астроцитами *in vitro*, тем самым ограничивая нейροпротекторные возможности астроцитов. Это могло быть свя-

зано со снижением активности нескольких протеаз, деградирующих β -амилоидные пептиды, таких как инсулин-деградирующий фермент и MMP9. Эти эффекты были опосредованы активацией рецепторов ГК. Таким образом, ГК могут усиливать накопление β -амилоида, уменьшать его деградацию в астроцитах и так формировать молекулярный механизм, связывающий стрессорные факторы с развитием БА. В первичных культурах нейронов неокортекса кортикостерон (1 мкМ) в зависимости от длительности применения ингибировал продукцию BACE1 (при однократном применении), что сопровождалось снижением уровней β -амилоида 1–42, или активировал экспрессию BACE1 и β -амилоида 1–42 (при длительном применении) [114]. По-видимому, таким образом ГК способны регулировать аккумуляцию β -амилоидного фрагмента 1–42 при БА.

УЧАСТИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ ГОРМОНАМИ

ГК, «гормоны стресса», относятся к гормонам, координирующим метаболизм и энергетический статус организма, они связаны с метаболизмом пищевых веществ. Например, циркадианный ритм секреции ГК регулируется временем приема пищи как у грызунов, так и у людей: уровни ГК повышаются перед употреблением пищи, а манипуляции с режимом приема пищи изменяют характер секреции ГК [115]. При этом низкие запасы энергии быстро стимулируют секрецию АСТН и ГК в ситуациях отрицательного энергетического баланса. Пациенты с избытком ГК либо эндогенного (синдром Кушинга), либо экзогенного (лечение кортикостероидами) происхождения характеризуются повышением аппетита и накоплением жира, а пациенты с дефицитом ГК (болезнь Аддисона) – снижением аппетита и потерей веса, при этом сходные закономерности получены и на животных [115]. Действительно, система, регулирующая реакции на стресс, ГГНО, также регулирует реакции на питание, поскольку нервные цепи, регулирующие потребление пищи, сходятся в паравентрикулярном ядре, которое содержит CRH- и урোকортин-содержащие нейроны. Учитывая одинаковую анатомию, системы, которые контролируют потребление пищи и реакцию на стресс, могут влиять друг на друга. Сложные механизмы такого взаимодействия включают уровни ГК (в зависимости

от тяжести стрессора), взаимодействие между ГК и связанными с питанием нейропептидами, в частности нейропептидом Y, агутиноподобным белком, меланокортинами и их рецепторами, CRH, урокортином и периферическими сигналами (лептином, инсулином, грелином) [116]. Гормоны, регулирующие пищевое поведение, регулируют и ГГНО, и контролируются этой осью.

На периферии инсулин играет критическую роль в регуляции метаболического гомеостаза, стимулируя поглощение глюкозы периферическими органами. На протяжении десятилетий мозг ошибочно считался нечувствительным к инсулину органом, однако в последнее время начато исследование механизмов, с помощью которых инсулин способствует критически важным функциям мозга, таким как метаболизм, познание и мотивированное поведение. Нет сомнений в существовании опосредованной инсулином синаптической пластичности в мозге как в норме, так и при патологиях [117]. В центральной нервной системе инсулин играет решающую роль в формировании нейронных цепей и синаптических связей и способствует нейропластичности взрослого мозга. Снижение активности рецепторов инсулина и передачи его сигналов в мозге (т.е. резистентность к инсулину), как показывают клинические и доклинические исследования, вызывает дефицит нейропластичности, приводя к снижению когнитивной функции и увеличению риска нервно-психических расстройств (в частности, это наблюдается при ожирении и сахарном диабете типа 2) [118]. Резистентность мозга к инсулину непосредственно связана с пластичностью гиппокампа, поскольку трансдукция сигналов инсулина влияет на молекулярные каскады в гиппокампе, лежащие в основе пластичности, обучения и памяти, а также модулирует нейрогенез в субгранулярной нейрогенной нише [119]. В настоящее время также стало очевидным, что метаболический гормон лептин выполняет в мозге множество функций, выходящих за рамки его установленной роли в гипоталамическом контроле энергетического баланса. Гиппокамп содержит области с высокой плотностью лептиновых рецепторов, которые, в частности, локализованы в синапсах поля CA1. Лептин оказывает прокогнитивное действие, поскольку он быстро изменяет синаптическую эффективность в возбуждающих коллатерали Шаффера-CA1 и височнo-аммонических-CA1 синапсах, повышая эффективность памяти в задачах, зависящих от гиппокампа. Чувствительность гиппокампа к

лептину с возрастом функционально снижается, в частности, при старении уменьшается модуляторный эффект лептина в синапсах обоего типа [120].

Гиппокамп экспрессирует высокие уровни как инсулиновых, так и лептиновых рецепторов, а также ключевых компонентов связанных с ними сигнальных каскадов, при этом оба гормона модулируют гиппокамп-зависимые когнитивные функции [121]. Как лептин, так и инсулин влияют на ключевые клеточные события в гиппокампе, лежащие в основе обучения и памяти, включая зависящую от активности синаптическую пластичность и транспорт глутаматных рецепторов в синапсы гиппокампа. Гиппокамп селективно чувствителен к нейродегенеративным процессам, в частности при БА, при которой функции лептина и инсулина нарушены. Таким образом, способность метаболических гормонов, лептина и инсулина, регулировать синаптическую функцию гиппокампа имеет важное значение для нормальной функции мозга, а также для развития заболеваний мозга. Резистентность мозга к инсулину может быть ключевым фактором, вызывающим когнитивные нарушения, наблюдаемые при метаболических и нейродегенеративных заболеваниях. Можно считать установленной критическую роль резистентности мозга к инсулину в коморбидностях между метаболическими и нейродегенеративными заболеваниями. Сахарный диабет типа 2 является фактором риска развития когнитивного дефицита и БА (у людей с диабетом риск развития деменции в 2,5 раза выше). При этом влияние на нейрогенез рассматривается как одна из важных мишеней патогенного действия инсулинорезистентности [122].

Общие нейробиологические пути, характерные для диабета типа 2 и депрессивных симптомов, в настоящее время широко обсуждаются с учетом полученных в последнее время морфологических и нейрокогнитивных данных. Клинические исследования показали частое сосуществование депрессии и диабета; оба заболевания связаны со сходными изменениями в мозге и поведении. Некоторые морфологические и функциональные изменения, возникающие при этих заболеваниях, по-видимому, являются результатом действия избытка провоспалительных цитокинов или глутамата. ГК, индуцированные стрессом, не только влияют на синаптическую пластичность, но и нарушают метаболизм глюкозы в мозге и снижают чувствительность к инсулину [123]. Сходное снижение нейропластичности в областях мозга, чувствительных

к стрессу, в первую очередь в гиппокампе, может быть связано как с диабетом типа 2, так и с депрессивными симптомами, при этом пациенты с диабетом демонстрируют снижение нейропластичности, включая морфологические аномалии и последующий нейрокогнитивный дефицит, подобные тем, которые характерны для пациентов с депрессивными симптомами [124]. Функциональные нейровизуализационные исследования продемонстрировали измененный метаболизм глюкозы в головном мозге пациентов с депрессией. Изменения уровней или активности ключевых метаболических ферментов и более низкая чувствительность рецепторов инсулина были обнаружены в мозге животных моделей обоих этих заболеваний. Очевидно, что избыток ГК может приводить к нарушению действия инсулина и метаболизма глюкозы, к ограничению энергоснабжения, необходимого для правильного функционирования нейронов и, как следствие, к нарушению синаптической пластичности [123, 125].

ПЛАСТИЧНОСТЬ ГИППОКАМПА ЗАВИСИТ ОТ ПОЛА: РОЛЬ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Многочисленные исследования продемонстрировали различия между мужчинами и женщинами в структуре, функции и пластичности гиппокампа. Половые различия в механизмах нейропластичности являются одной из важнейших, но явно недостаточно исследованных областей. Важность этой области исследований определяется не только очевидными фундаментальными вопросами, но и тем, что практически все заболевания, связанные с нарушениями нейропластичности (а это все церебральные патологии, затрагивающие как когнитивную, так и эмоциональную сферы), специфически зависят от пола. Существует множество данных о разной предрасположенности мужчин и женщин к заболеваниям, в которых важную роль играет гиппокамп, и, очевидно, что половые различия в функции гиппокампа имеют существенное значение для понимания механизмов когнитивных и психических нарушений в зависимости от пола [126]. Недостаточное число и качество экспериментальных исследований в этой области также имеет объективную причину — очевидные удобства и простота работы с самцами мелких экспериментальных животных. В результате преобладающее число исследований выполнено на самцах, минимальное —

на самках, а сравнительные исследования, в дизайн которых включены животные обоего пола, проводятся чрезвычайно редко. Тем не менее в последние годы получены данные, которые позволяют приблизиться к пониманию стероид-зависимых механизмов половых особенностей нейропластичности.

Половые различия в функции гиппокампа наблюдаются у многих видов млекопитающих. Однако величина, степень и специфичность этих различий неясны, поскольку они могут зависеть от таких факторов, как возраст, использованная методология и факторы окружающей среды [127]. Пирамидные клетки поля СА3 гиппокампа самцов и самок крыс различаются по структуре, функциям и пластичности, причем эти половые различия не удается объяснить просто действием циркулирующих гонадных гормонов [128]. К настоящему времени половые различия установлены для различных механизмов пластичности гиппокампа, когнитивных функций, а также для ряда патологических состояний, затрагивающих пластичность гиппокампа. Например, метаанализ показывает, что самцы превосходят самок в задачах, зависящих от гиппокампа, у грызунов и людей; кроме того, у женщин чаще наблюдается более выраженное снижение когнитивных функций при БА и депрессии, причем оба заболевания характеризуются дисфункцией гиппокампа. Гиппокамп — очень пластичная структура, важная для обработки информации высокого порядка и чувствительная к факторам окружающей среды, таким как стресс. Структура сохраняет способность производить новые нейроны, и этот процесс играет важную роль в разделении паттернов, упреждающем поведении и когнитивной гибкости. Интересно, что у грызунов обнаружены заметные половые различия в уровне нейрогенеза и активации новых нейронов в ответ на когнитивные задачи, зависящие от гиппокампа [126].

Ранее считалось, что половые стероидные гормоны синтезируются исключительно в гонадах (например, эстрогены — в яичниках) и вызывают транскрипционные изменения в период от нескольких часов до нескольких дней. Однако эстрогены также локально синтезируются в нейронных цепях (нейроэстрогены), где они быстро (в течение нескольких минут) модулируют ряд поведенческих реакций, включая пространственное обучение и контакты. Все больше экспериментальных данных свидетельствует о том, что половые нейроактивные стероиды (нейростероиды) необходимы для формирования памяти. Нейростероиды оказывают глубокое влияние на функцию

и структуру нервных цепей, и локальный синтез этих гормонов необходим для индукции как долговременной потенциации, так и долговременной депрессии синаптической передачи, а также для формирования нервных отростков в различных областях нервной системы. С определенной степенью упрощения можно заключить, что в гиппокампе 17β -эстрадиол (E_2) необходим для индукции длительной потенциации, а 5α -дигидротестостерон (DHT) важен для индукции длительной депрессии. Быстрое воздействие половых нейростероидов на долговременную синаптическую пластичность, в т.ч. формирование памяти, требует поддержания тонического или фазического локального синтеза стероидов, контролируемого нейронной активностью, но также может зависеть от циркулирующих гормонов, возраста и пола животного [129].

Влияние половых гормонов (эстрогенов, андрогенов и прогестерона) и ГК опосредовано различными типами задействованных стероидных рецепторов (мембранных или ядерных) и сопровождается локальными метаболическими преобразованиями. Половые особенности пластичности гиппокампа описаны для разных регионов этой структуры и касаются практически всех систем, реализующих механизмы пластичности. Например, хорошо исследованы изменения структурной пластичности гиппокампа в ответ на эстрогены у самок грызунов [130]. В частности, представление о том, что эстрадиол может действовать как локальный нейромодулятор в головном мозге, быстро влияя на синаптическую функцию, было подтверждено исследованиями, проведенными за последние 30 лет. Был продемонстрирован синтез эстрадиола *de novo* в головном мозге, а также сигнальные механизмы, опосредующие ответы на гормон, наряду с морфологическими данными, указывающими на быстрые изменения синаптического входа после увеличения локальных уровней эстрадиола [131]. Эстрогены опосредуют и модулируют образование шипиков и синапсов, клеточные и молекулярные реакции гиппокампа, а также нейрогенез. Дендритные шипики, постсинаптические структуры синапсов, необходимы для синаптической пластичности и обучения. Формирование и модуляция дендритных шипиков изменяются как быстрым (вероятно, негеномным), так и классическим (геномным) действием эстрогенов, и предполагается, что эти механизмы играют роль в эффектах эстрогенов на обучение и память. Описана быстрая негеномная модуляция дендритных шипиков в гиппокампе нейростероидами и андрогенами,

наряду с ГК [132]. Половые стероиды (дигидротестостерон, тестостерон, эстрадиол и прогестерон) и ГК модулируют синапсы гиппокампа за счет зависимых от киназ сигнальных механизмов, обеспечивая быструю негеномную модуляцию дендритного спиногенеза. Синаптические (классические) рецепторы половых стероидов также участвуют в запуске этих быстрых синаптических модуляций.

Исследования полового диморфизма в синаптических процессах кодирования, лежащих в основе обучения, систематически начали проводиться недавно. Исследования на самцах грызунов проводили на модели долговременной потенциации зависимого от активности нейронов увеличения синаптической силы. Эта модель используется для идентификации синаптических рецепторов и сигнальной активности, которые координируют ремоделирование субсинаптического актинового цитоскелета, решающе важного для стойкой потенциации и памяти. У самок для длительной потенциации и памяти задействованы те же механизмы, что и у самцов, но только у самок участие рецептора TrkB и синаптических сигнальных посредников, включая Src и ERK1/2, требуют эстрогена, синтезированного в нейронах, и передачи сигналов через ассоциированный с мембраной рецептор эстрогена α ($ER\alpha$). В связи с дополнительным участием $ER\alpha$ у самок наблюдается более высокий порог для длительной потенциации гиппокампа и пространственного обучения [133]. Данные о том, что эстроген способствует пластичности, связанной с обучением, модифицируя синаптический цитоскелет, и острые стимулирующие эффекты эстрогена на глутаматергическую передачу и долговременную потенциацию позволяют объяснить значительное влияние стероида на поведение. Недавняя работа определила механизмы, лежащие в основе этих синаптических эффектов [134]. 17β -Эстрадиол запускает полимеризацию актина в дендритных шипиках гиппокампа посредством сигнального каскада, начинающегося с GTPазы RhoA и заканчивающегося инактивацией белка кофилина, разрезающего филамент. Наряду с прямым действием, гормон активирует синаптические рецепторы TrkB BDNF секретируемого нейротрофина, который стимулирует путь от RhoA до кофилина. Поэтому, возможно, что 17β -эстрадиол действует через трансактивацию соседних рецепторов, модифицируя состав и структуру возбуждающих контактов.

Несколько десятилетий назад было высказано предположение, что BDNF опосредует некоторые эффекты эстрогена в гиппокампе

и что эти взаимодействия играют роль как в нормальном мозге, так и при некоторых заболеваниях. Например, в синапсах мшистых волокон гиппокампа грызунов показано взаимодействие между BDNF и эстрогеном: 17 β -эстрадиол изменяет функцию гиппокампа, влияя на экспрессию BDNF в этих синапсах. По-видимому, эстроген влияет на гиппокамп посредством механизмов, связанных не только со зрелой формой BDNF, действующей на рецепторы TrkB, но также и путем регуляции предшественника, про-BDNF, действующего на рецептор p75NTR. Предполагается, что взаимодействия между BDNF и 17 β -эстрадиолом в мшистых волокнах потенциально важны для нормальной функции гиппокампа и имеют значение для половых различий в функциях, зависящих от мшистых волокон, а также при заболеваниях, при которых предполагается, что пластичность мшистых волокон играет важную роль (БА, эпилепсии и наркомании) [135]. В целом, особый порог длительной потенциации у самок ассоциирован с половыми различиями в обработке информации и особенностями их обучения и памяти.

В последнее десятилетие наблюдается значительный рост исследований, изучающих роль фундаментальных нейроиммунных процессов как ключевых механизмов, которые могут образовывать естественный мост между нормальной физиологией и патологическими ситуациями. К настоящему времени получены данные о том, что стрессорные воздействия вызывают зависящие от времени и специфические для стрессора паттерны экспрессии цитокинов/хемокинов в мозге, а гены, связанные с воспалением, демонстрируют уникальные профили экспрессии у самок и самцов в зависимости от индивидуальных, кооперативных или антагонистических взаимодействий между рецепторами стероидных гормонов (в первую очередь рецепторами эстрогена и ГК) [136]. Таким образом, нейроиммунные механизмы стресса, в значительной степени ассоциированные с пластичностью гиппокампа, зависят от пола, и это имеет значение для фармакотерапии заболеваний, связанных со стрессом.

Как показано выше, нейроэстрадиол, синтезируемый в гиппокампе, играет важную роль в нейропластичности независимо от циркулирующего эстрадиола, который секретируется из половых желез. Реакция гипоталамо-гипофизарных областей на синтез нейроэстрадиола в гиппокампе открывает перспективы для новой научной концепции в когнитивной нейробиологии. Постулировано существование новой регуляторной оси гипоталамус-гипофиз-

гиппокамп [137]. Предполагается, что пластичность гиппокампа регулируется с помощью нейробластов, основной клеточной единицы функционального нейрогенеза во взрослом гиппокампе, а дефекты дифференцировки, интеграции и выживания нейробластов, по-видимому, являются основной причиной нейрокогнитивных расстройств. Было обнаружено, что рецепторы гонадотропина и стероидогенные ферменты экспрессируются в нейробластах гиппокампа. На основании имеющихся данных пересматриваются клеточная основа синтеза нейроэстрадиола, потенциальная связь между синтезом нейроэстрадиола и нейробластозом в гиппокампе, возможное участие аберрантной продукции нейроэстрадиола в митохондриальных дисфункциях и дислипидемии в менопаузе и у взрослых, патогенез нейродегенеративных расстройств; все эти феномены обсуждаются в рамках гипотезы о функционировании гипоталамо-гипофизарно-гиппокампальной оси во взрослом мозге. В конечном счете понимание регуляции нейрогенеза гиппокампа аномальными уровнями концентрации нейроэстрадиола по принципу обратной связи может дать дополнительный базис для разработки нейрорегенеративного терапевтического лечения эмоциональных расстройств, депрессии и снижения когнитивных функций в менопаузе, а также нейрокогнитивных расстройств [137].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА

*Просто сделать вещи сложными,
но сложно сделать вещи простыми*

3-й закон Мейера

Исследования на животных показали, что гиппокамп является особенно чувствительной и уязвимой областью мозга, которая реагирует на стресс и гормоны стресса. Гиппокамп — важная область мозга для реализации рабочей и пространственной памяти у животных и человека, а также уязвимая и пластичная структура в отношении ее чувствительности к эпилепсии, ишемии, черепно-мозговой травме, стрессу и старению. Понимание губительных последствий повышенных уровней ГК на функционирование селективно чувствительных к этим гормонам структур мозга, в первую очередь гиппокампа, стимулировало интерес к исследованиям влияния хронического ги-

перкортицизма на головной мозг. У пациентов с синдромом Кушинга отмечены нарушения памяти, связанной с гиппокампом, при этом функциональные нарушения гиппокампа предшествуют структурным аномалиям, обнаруженным нейровизуализационными методами. При синдроме Кушинга также наблюдаются нарушения исполнительных функций (включая принятие решений) и других функций, таких как зрительно-конструктивные навыки, речь, двигательные функции и скорость обработки информации. Ранняя диагностика и быстрая нормализация гиперкортицизма могут остановить и предотвратить прогрессирование поражения гиппокампа и нарушений памяти [138]. Среди пациентов с синдромом Кушинга наблюдается высокая распространенность психопатологии, в первую очередь депрессии и тревожности, также ассоциированных с избыточной секрецией ГК и изменениями гиппокампа.

Лечение критических заболеваний обычно фокусируется на кратковременном физическом восстановлении пациента, однако люди, пережившие тяжелое заболевание, имеют значительно повышенный риск развития стойких когнитивных нарушений и психических расстройств. В работе Hill и Spencer-Segal [139] подробно рассматривается роль эндогенных и экзогенных ГК в развитии психоневрологических патологий после критических заболеваний. Такие заболевания характеризуются резким повышением уровня свободного кортизола и подавлением уровня АСТН, которые обычно нормализуются после выздоровления, однако иногда может наблюдаться длительное нарушение регуляции ГГНО. Высокие уровни ГК могут вызывать длительные изменения пластичности и структурной целостности гиппокампа и префронтальной коры; этот механизм, вероятно, может способствовать развитию нарушений памяти и когнитивных способностей у выживших в критических состояниях, хотя строгие доказательства этого предположения до сих пор не получены. Тем не менее с повышенными уровнями ГК ассоциированы самые различные церебральные патологии, затрагивающие когнитивную и эмоциональную сферы, от депрессивных расстройств до эпилепсии [140], инсульта [141, 142] и черепно-мозговой травмы [143, 144]. Общие механизмы различных патологий мозга подтверждают не только частые коморбидности, но и развитие одних патологий на базе других. Например, депрессия является фактором риска и компонентом БА, она также может быть триггером начальной стадии БА [145, 146].

Избыток ГК нарушает функцию и ухудшает структуру гиппокампа, области мозга, ключевой для обучения, памяти и эмоций. Избирательная уязвимость гиппокампа к стрессу, опосредованная ГК, секретируемыми во время стресса, является платой за высокую функциональную пластичность и плеiotропные функции этой лимбической структуры. Общие для многих церебральных патологий молекулярные и клеточные механизмы включают дисфункцию GR, гиперглутаматергические состояния, нарушение систем нейротрофических факторов, развитие нейровоспаления, приводящего к нейродегенерации и потере нейронов гиппокампа, а также нарушения нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише и формирование aberrантных нейронных сетей [17, 147]. Эти ГК-зависимые процессы ассоциированы с измененной реакцией на стресс и развитием хронических сопутствующих патологий, вызванных стрессом.

За последние 50 лет концепция стресса значительно изменилась, и наше понимание лежащей в его основе нейробиологии резко расширилось [148]. Биология стресса актуальна не только в необычных и угрожающих условиях, но современное представление определяет ее, как непрерывный адаптивный процесс оценки окружающей среды, преодоления ее факторов и предоставления человеку возможности предвидеть будущие проблемы и справляться с ними. Фундаментальная нейросхема, лежащая в основе этих процессов, в общих чертах понятна, определены ключевые молекулярные процессы, установлено их влияние на нейропластичность. Однако все чаще рассматриваются концепции о механизмах патогенеза заболеваний мозга, которые учитывали роль какой-либо одной отдельной системы как ключевой. Это хорошо видно на примере эволюции понимания патогенеза депрессии. Существует несколько теорий депрессии, которые предполагают альтернативно нарушения регуляции ГГНО, модуляцию моноаминергической нейротрансмиссии, изменения нейротрофических факторов и изменения нейрогенеза в гиппокампе, однако ни одна из этих теорий не объясняет в достаточной мере этиопатологию и подходы к лечению депрессии. При этом концепции, основанные на нарушениях системы BDNF или нейрогенеза, подчеркивают важную роль пластичности при депрессии и тот факт, что гиппокамп является важной анатомической областью, связанной с депрессией. Исследования показали, что некоторые антидепрессанты могут купировать симптомы депрессии, изменяя пластичность

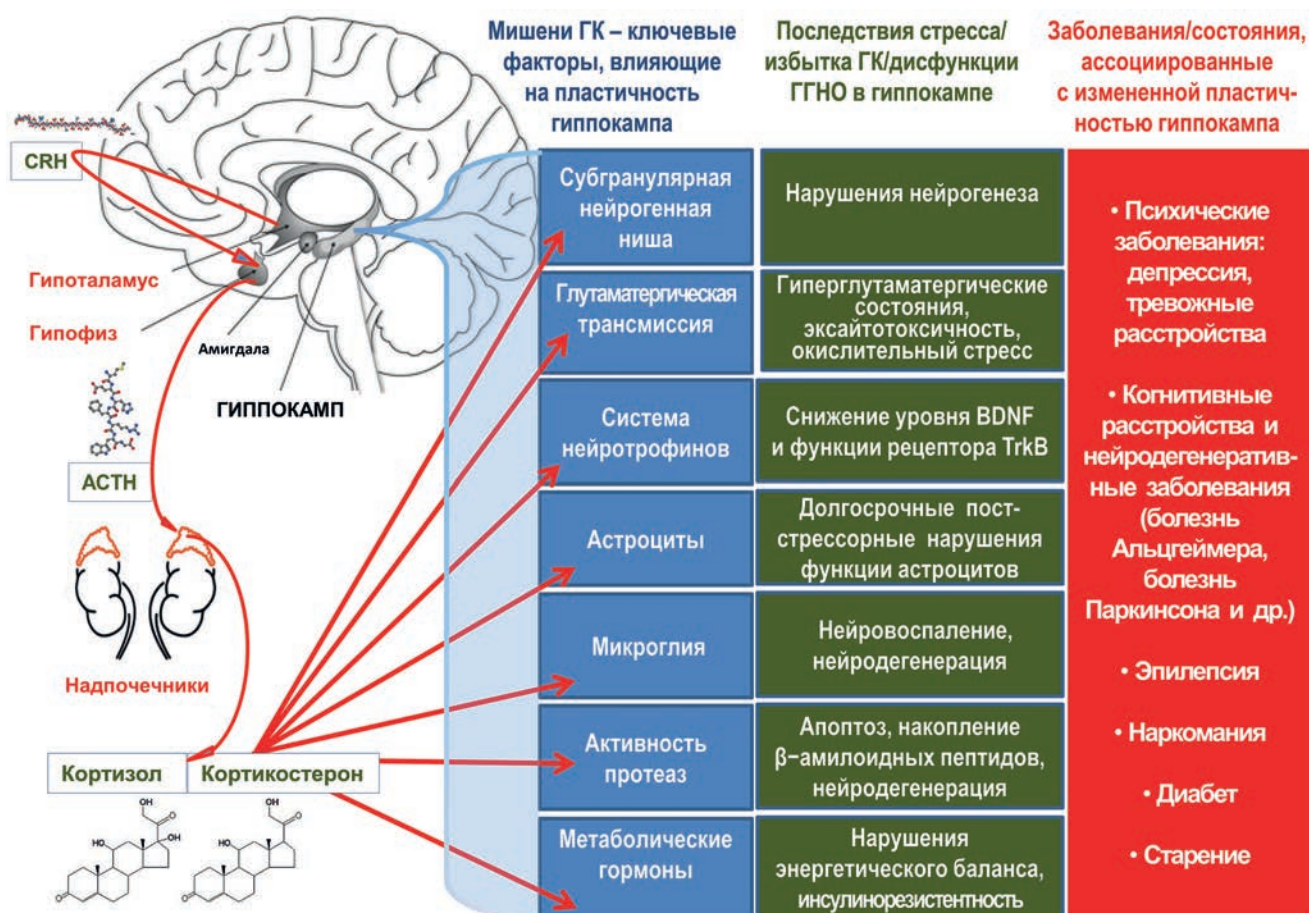


Рис. 2. Регуляция пластичности взрослого гиппокампа глюкокортикоидами. На сводной схеме представлены основные пути регуляции глюкокортикоидными гормонами (ГК) различных механизмов пластичности. Слева показана гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось (ГГНО), названия составляющих ее структур отмечены красным; названия основных гормонов в рамках: кортикотропин-рилизинг-гормон (CRH), аденокортикотропный гормон (АКТГ), кортизол (у человека) или кортикостерон (у грызунов). Указаны также остальные компоненты лимбической системы мозга, гиппокамп и миндалина. В левой колонке приведены ключевые системы гиппокампа, определяющие его пластичность и одновременно являющиеся мишенями ГК (голубой фон). В средней колонке (зеленый фон) отмечены основные патологические эффекты на эти системы избытка ГК, возникающего в результате нарушения регуляции ГГНО и/или стресса (сильного, хронического у взрослых или стресса в раннем периоде онтогенеза). В последней колонке (красный фон) представлены заболевания и состояния, для патогенеза которых ключевым является развитие патологических последствий ГК-зависимых нарушений пластичности гиппокампа. Следует учесть, что действие ГК на мишени, указанные в голубой колонке, не обязательно прямое. Кроме этого, одна красная стрелка может включать множественные механизмы, по которым ГК действуют на специфическую мишень. Подробные объяснения в соответствующих разделах текста

гиппокампа, и последние варианты теории постулируют, что именно синтез множественных механизмов пластичности мозга, включая изменения серотонинергической системы, ГГНО, нейрогенеза и системы BDNF, а также нейровоспаление может объединить многочисленные «монотеории» [149]. Вторым пример – признание роли стресса в механизме патогенеза БА, многофакторного нейродегенеративного заболевания [150]. Накапливающиеся клинические и экспериментальные данные свидетельствуют о ключевой роли стресса в развитии БА. Хронический стресс и сопровождающий его высокий уровень секреции ГК запускают, наряду со многими другими, два

основных патомеханизма БА: неправильный процессинг APP и образование β -амилоида, которые, наряду с гиперфосфорилированием и агрегацией тау-белка, связаны с изменениями нейропластичности. Учитывая, что депрессия прямо связана со стрессом, и доказательства того, что депрессия является фактором риска БА, общие для этих заболеваний нейробиологические механизмы и представляют собой описанные в данном обзоре изменения, приводящие к нарушению пластичности гиппокампа.

Основные данные, проанализированные в этом обзоре, суммированы на достаточно простой схеме (рис. 2). Показано, как каскадная

сигнализация по ГГНО за счет связывания ее конечных гормонов, ГК, с кортикостероидными рецепторами гиппокампа осуществляет контроль различных мишеней — ключевых компонентов сложной и многоуровневой системы пластичности гиппокампа. С одной стороны, эта схема показывает потенциальные ключевые мишени регуляции нейропластичности посредством ГК в соответствии с данными эксперимента и клиники, накопленными к настоящему моменту. С другой стороны, эта схема не содержит информации о десятках механистических связей *между* различными системами-мишенями ГК, влиянии каждой из этих систем на эффекты ГК, а также о регуляторном влиянии ГК на *взаимодействие* между этими системами. Эти данные приведены в тексте, но отображение их на этом рисунке оказалось практически невозможным, в полном соответствии с известным высказыванием Поля Валери (Paul Valéry): «Все простое теоретически ложно, а все сложное прагматически бесполезно» (“Everything that is simple is theoretically false, everything that is complicated is pragmatically useless”). Таким образом, анализируя схему, нужно иметь в виду, что практически все мишени, регулируемые ГК, связаны между собой многочисленными процессами на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях. С учетом вынесенного в качестве эпиграфа к заключению третьего закона Мейера, гласящего, что просто усложнять вещи, но сложно их упрощать, на этом этапе анализа мы оставляем простую схему, которая иллюстрирует роль ГК в качестве «дирижера» многокомпонентного оркестра, поддерживающего нейропластичность гиппокампа, но подразумеваем наличие контролируемых дирижером сложных взаимоотношений между оркестрантами и их обратных связей с дирижером.

При различных патологиях мозга, наряду с нарушениями регуляции ГГНО, секреции ГК, экспрессии и свойств их рецепторов, происходят изменения в каждой из представ-

ленных на схеме систем. Важность каждой из этих систем не подлежит сомнению, поэтому ключевые компоненты каждой системы рассматриваются как мишени для терапии, и разрабатываются подходы (фармакологические и не фармакологические) к воздействию на эти мишени. До сих пор такие подходы не привели к выдающимся успехам лечения церебральных патологий. Если ГК действительно выполняют функции дирижера гиппокампальной нейропластичности, возможно, следует больше внимания уделить потенциальным возможностям коррекции ГГНО, уровня кортизола и состояния рецепторов ГК? Логика подсказывает, что, если научиться корректировать основную регуляторную систему, благоприятный эффект будет оказан и на патологически измененные в результате ее нарушения нижележащие компоненты. Очевидно, что направленно воздействовать на такую сложную нейрогуморальную систему, как ГГНО, чрезвычайно сложно, однако, очень вероятно, что именно достижение управления этой системой позволит поддерживать оптимальный уровень нейропластичности и тем самым совершить давно ожидаемый прорыв в терапии когнитивных и эмоциональных расстройств, а также соответствующих коморбидных состояний. Синтез новых лигандов рецепторов ГК, результаты их применения в экспериментах на моделях заболеваний мозга и предварительные результаты их применения в клинике [151–157] позволяют надеяться на то, что этот подход принесет долгожданный успех.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 гг.

Конфликт интересов. Автор заявляет 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. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237–242, doi: 10.1134/S0006297917030014.
2. Xiong, H., and Krugers, H. J. (2015) Tuning hippocampal synapses by stress-hormones: relevance for emotional memory formation, *Brain Res.*, **1621**, 114–120, doi: 10.1016/j.brainres.2015.04.010.
3. Goto, A. (2022) Synaptic plasticity during systems memory consolidation, *Neurosci. Res.*, **183**, 1–6, doi: 10.1016/j.neures.2022.05.008.
4. Toda, T., and Gage, F. H. (2018) Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity, *Cell. Tissue Res.*, **373**, 693–709, doi: 10.1007/s00441-017-2735-4.
5. Deppermann, S., Storchak, H., Fallgatter, A. J., and Ehrlis, A. C. (2014) Stress-induced neuroplasticity:

- (mal)adaptation to adverse life events in patients with PTSD – a critical overview, *Neuroscience*, **283**, 166-177, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.037.
6. Den Boon, F. S., and Sarabdjitsingh, R. A. (2017) Circadian and ultradian patterns of HPA-axis activity in rodents: significance for brain functionality, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, **31**, 445-457, doi: 10.1016/j.beem.2017.09.001.
 7. Gray, J. D., Kogan, J. F., Marrocco, J., and McEwen, B. S. (2017) Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain, *Nat. Rev Endocrinol.*, **13**, 661-673, doi: 10.1038/nrendo.2017.97.
 8. Meijer, O. C., Buurstede, J. C., and Schaaf, M. J. M. (2019) Corticosteroid receptors in the brain: transcriptional mechanisms for specificity and context-dependent effects, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 539-549, doi: 10.1007/s10571-018-0625-2.
 9. Koning, A. C. A. M., Buurstede, J. C., van Weert, L. T. C. M., and Meijer, O. C. (2019) Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the brain: a transcriptional perspective, *J. Endocr. Soc.*, **3**, 1917-1930, doi: 10.1210/js.2019-00158.
 10. Meijer, O. C., Buurstede, J. C., Viho, E. M. G., Amaya, J. M., Koning, A. C. A. M., van der Meulen, M., van Weert, L. T. C. M., Paul, S. N., Kroon, J., and Koorneef, L. L. (2023) Transcriptional glucocorticoid effects in the brain: Finding the relevant target genes, *J. Neuroendocrinol.*, **35**, e13213, doi: 10.1111/jne.13213.
 11. Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid regulation of the glutamatergic synapse: mechanisms of stress-dependent neuroplasticity, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **57**, 564-576, doi: 10.1134/S0022093021030091.
 12. Fuxe, K., Diaz, R., Cintra, A., Bhatnagar, M., Tinner, B., Gustafsson, J. A., Ogren, S. O., and Agnati, L. F. (1996) On the role of glucocorticoid receptors in brain plasticity, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **16**, 239-258, doi: 10.1007/BF02088179.
 13. Suri, D., and Vaidya, V. A. (2015) The adaptive and maladaptive continuum of stress responses – a hippocampal perspective, *Rev. Neurosci.*, **26**, 415-442, doi: 10.1515/revneuro-2014-0083.
 14. Uchoa, E. T., Aguilera, G., Herman, J. P., Fiedler, J. L., Deak, T., and de Sousa, M. B. (2014) Novel aspects of glucocorticoid actions, *J. Neuroendocrinol.*, **26**, 557-572, doi: 10.1111/jne.12157.
 15. Bolshakov, A. P., Tret'yakova, L. V., Kvichansky, A. A., and Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of hippocampal neuroinflammation, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 156-167, doi: 10.1134/S0006297921020048.
 16. McEwen, B. S. (2002) Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process, *Neurobiol. Aging*, **23**, 921-939, doi: 10.1016/s0197-4580(02)00027-1.
 17. Gulyaeva, N. V. (2021) Stress-associated molecular and cellular hippocampal mechanisms common for epilepsy and comorbid depressive disorders, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 641-656, doi: 10.1134/S0006297921060031.
 18. Madalena, K. M., and Lerch, J. K. (2017) The effect of glucocorticoid and glucocorticoid receptor interactions on brain, spinal cord, and glial cell plasticity, *Neural Plast.*, **2017**, 8640970, doi: 10.1155/2017/8640970.
 19. Weerasinghe-Mudiyanselage, P. D. E., Ang, M. J., Kang, S., Kim, J. S., and Moon, C. (2022) Structural plasticity of the hippocampus in neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3349, doi: 10.3390/ijms23063349.
 20. De Kloet, E. R., Sutanto, W., Rots, N., van Haarst, A., van den Berg, D., Oitzl, M., van Eekelen, A., and Voorhuis, D. (1991) Plasticity and function of brain corticosteroid receptors during aging, *Acta Endocrinol. (Copenh)*, **125 Suppl 1**, 65-72.
 21. Fares, J., Bou Diab, Z., Nabha, S., and Fares, Y. (2019) Neurogenesis in the adult hippocampus: history, regulation, and prospective roles, *Int. J. Neurosci.*, **129**, 598-611, doi: 10.1080/00207454.2018.1545771.
 22. Ko, S. Y., and Frankland, P. W. (2021) Neurogenesis-dependent transformation of hippocampal engrams, *Neurosci. Lett.*, **762**, 136176, doi: 10.1016/j.neulet.2021.136176.
 23. Miller, S. M., and Sahay, A. (2019) Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing, *Nat. Neurosci.*, **22**, 1565-1575, doi: 10.1038/s41593-019-0484-2.
 24. Tuncdemir, S. N., Lacefield, C. O., and Hen, R. (2019) Contributions of adult neurogenesis to dentate gyrus network activity and computations, *Behav. Brain Res.*, **374**, 112112, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112112.
 25. Moreno-Jiménez, E. P., Terreros-Roncal, J., Flor-García, M., Rábano, A., and Llorens-Martín, M. (2021) Evidences for adult hippocampal neurogenesis in humans, *J. Neurosci.*, **41**, 2541-2553, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0675-20.2020.
 26. Huckleberry, K. A., and Shansky, R. M. (2021) The unique plasticity of hippocampal adult-born neurons: contributing to a heterogeneous dentate, *Hippocampus*, **31**, 543-556, doi: 10.1002/hipo.23318.
 27. Vilar, M., and Mira, H. (2016) Regulation of neurogenesis by neurotrophins during adulthood: expected and unexpected roles, *Front. Neurosci.*, **10**, 26, doi: 10.3389/fnins.2016.00026.
 28. Niklison-Chirou, M. V., Agostini, M., Amelio, I., and Melino, G. (2020) Regulation of adult neurogenesis in mammalian brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4869, doi: 10.3390/ijms21144869.
 29. Jorgensen, C., and Wang, Z. (2020) Hormonal regulation of mammalian adult neurogenesis: a multifaceted mechanism, *Biomolecules*, **10**, 1151, doi: 10.3390/biom10081151.
 30. Surget, A., and Belzung, C. (2022) Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective,

- Mol. Psychiatry*, **27**, 403-421, doi: 10.1038/s41380-021-01136-8.
31. Jones, K. L., Zhou, M., and Jhaveri, D. J. (2022) Dissecting the role of adult hippocampal neurogenesis towards resilience versus susceptibility to stress-related mood disorders, *NPJ Sci. Learn.*, **7**, 16, doi: 10.1038/s41539-022-00133-y.
 32. Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Naninck, E. F., Fitzsimons, C. P., van Dam, A. M., Czeh, B., and Korosi, A. (2015) Regulation of adult neurogenesis and plasticity by (early) stress, glucocorticoids, and inflammation, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a021303, doi: 10.1101/cshperspect.a021303.
 33. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, **157**, 370-392, doi: 10.1111/jnc.15265.
 34. Vasic, V., and Schmidt, M. H. H. (2017) Resilience and vulnerability to pain and inflammation in the hippocampus, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 739, doi: 10.3390/ijms18040739.
 35. Kirschen, G. W., and Ge, S. (2019) Young at heart: insights into hippocampal neurogenesis in the aged brain, *Behav. Brain. Res.*, **369**, 111934, doi: 10.1016/j.bbr.2019.111934.
 36. Chen, P., Guo, Z., and Zhou, B. (2023) Insight into the role of adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease, *Ageing Res. Rev.*, **84**, 101828, doi: 10.1016/j.arr.2022.101828.
 37. Teixeira, C. M., Pallas-Bazarra, N., Bolós, M., Terreros-Roncal, J., Ávila, J., and Llorens-Martin, M. (2018) Untold new beginnings: adult hippocampal neurogenesis and Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **64** (s1), S497-S505, doi: 10.3233/JAD-179918.
 38. Nicola, R., and Oku, E. (2021) Adult hippocampal neurogenesis: one lactate to rule them all, *Neuromol. Med.*, **23**, 445-448, doi: 10.1007/s12017-021-08658-y.
 39. McEwen, B. S. (1996) Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **16**, 103-116, doi: 10.1007/BF02088170.
 40. Mihály, A. (2019) The reactive plasticity of hippocampal ionotropic glutamate receptors in animal epilepsies, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1030, doi: 10.3390/ijms20051030.
 41. Shipton, O. A., and Paulsen, O. (2013) GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **369**, 20130163, doi: 10.1098/rstb.2013.0163.
 42. Pampaloni, N. P., and Plested, A. J. R. (2022) Slow excitatory synaptic currents generated by AMPA receptors, *J. Physiol.*, **600**, 217-232, doi: 10.1113/JP280877.
 43. Nair, J. D., Wilkinson, K. A., Henley, J. M., and Mellor, J. R. (2021) Kainate receptors and synaptic plasticity, *Neuropharmacology*, **196**, 108540, doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108540.
 44. Valbuena, S., and Lerma, J. (2021) Kainate receptors, homeostatic gatekeepers of synaptic plasticity, *Neuroscience*, **456**, 17-26, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.11.050.
 45. Griego, E., and Galván, E. J. (2021) Metabotropic glutamate receptors at the aged mossy fiber – CA3 synapse of the hippocampus, *Neuroscience*, **456**, 95-105, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.016.
 46. Mukherjee, S., and Manahan-Vaughan, D. (2013) Role of metabotropic glutamate receptors in persistent forms of hippocampal plasticity and learning, *Neuropharmacology*, **66**, 65-81, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.06.005.
 47. Mikasova, L., Xiong, H., Kerkhofs, A., Bouchet, D., Krugers, H. J., and Groc, L. (2017) Stress hormone rapidly tunes synaptic NMDA receptor through membrane dynamics and mineralocorticoid signalling, *Sci. Rep.*, **7**, 8053, doi: 10.1038/s41598-017-08695-3.
 48. Gonçalves-Ribeiro, J., Pina, C. C., Sebastião, A. M., and Vaz, S. H. (2019) Glutamate transporters in hippocampal LTD/LTP: not just prevention of excitotoxicity, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 357, doi: 10.3389/fncel.2019.00357.
 49. Taylor, C. J., He, R., and Bartlett, P. F. (2014) The role of the N-methyl-D-aspartate receptor in the proliferation of adult hippocampal neural stem and precursor cells, *Sci. China Life Sci.*, **57**, 403-411, doi: 10.1007/s11427-014-4637-y.
 50. Gulyaeva, N. V. (2022) Neuroendocrine control of hyperglutamatergic states in brain pathologies: the effects of glucocorticoids, *J. Evol. Biochem. Phys.*, **58**, 1425-1438, doi: 10.1134/S0022093022050131.
 51. Jacobsson, J., Persson, M., Hansson, E., and Rönnbäck, L. (2006) Corticosterone inhibits expression of the microglial glutamate transporter GLT-1 *in vitro*, *Neuroscience*, **139**, 475-483, doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.046.
 52. Zschocke, J., Bayatti, N., Clement, A. M., Witan, H., Figiel, M., Engele, J., and Behl, C. (2005) Differential promotion of glutamate transporter expression and function by glucocorticoids in astrocytes from various brain regions, *J. Biol. Chem.*, **280**, 34924-34932, doi: 10.1074/jbc.M502581200.
 53. Chu, S. F., Zhang, Z., Zhou, X., He, W. B., Yang, B., Cui, L. Y., He, H. Y., Wang, Z. Z., and Chen, N. H. (2021) Low corticosterone levels attenuate late life depression and enhance glutamatergic neurotransmission in female rats, *Acta Pharmacol. Sin.*, **42**, 848-860, doi: 10.1038/s41401-020-00536-w.
 54. Kang, M., Ryu, J., Kim, J. H., Na, H., Zuo, Z., and Do, S. H. (2010) Corticosterone decreases the activity of rat glutamate transporter type 3 expressed in *Xenopus oocytes*, *Steroids*, **75**, 1113-1118, doi: 10.1016/j.steroids.2010.07.003.
 55. Cox, M. F., Hascup, E. R., Bartke, A., and Hascup, K. N. (2022) Friend or foe? Defining the role of

- glutamate in aging and Alzheimer's disease, *Front. Aging*, **3**, 929474, doi: 10.3389/fragi.2022.929474.
56. Gulyaeva, N. V. (2022) Multi-level plasticity-pathology continuum of the nervous system: functional aspects, *Neurochem. J.*, **16**, 424-428, doi: 10.1134/S1819712422040092.
 57. Bano, D., and Ankarcrona, M. (2018) Beyond the critical point: an overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences, *Neurosci. Lett.*, **663**, 79-85, doi: 10.1016/j.neulet.2017.08.048.
 58. Foster, T. C., Kyritsopoulos, C., and Kumar, A. (2017) Central role for NMDA receptors in redox mediated impairment of synaptic function during aging and Alzheimer's disease, *Behav. Brain Res.*, **322 (Pt B)**, 223-232, doi: 10.1016/j.bbr.2016.05.012.
 59. Temido-Ferreira, M., Coelho, J. E., Pousinha, P. A., and Lopes, L. V. (2019) Novel players in the aging synapse: impact on cognition, *J. Caffeine Adenosine Res.*, **9**, 104-127, doi: 10.1089/caff.2019.0013.
 60. Leal, G., Bramham, C. R., and Duarte, C. B. (2017) BDNF and hippocampal synaptic plasticity, *Vitam. Horm.*, **104**, 153-195, doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.004.
 61. Gómez-Palacio-Schjetnan, A., and Escobar, M. L. (2013) Neurotrophins and synaptic plasticity, *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, **15**, 117-136, doi: 10.1007/7854_2012_231.
 62. De Vincenti, A. P., Ríos, A. S., Paratcha, G., and Ledda, F. (2019) Mechanisms that modulate and diversify BDNF functions: implications for hippocampal synaptic plasticity, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 135, doi: 10.3389/fncel.2019.00135.
 63. Zagrebelsky, M., and Korte, M. (2014) Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses, *Neuropharmacology*, **76 Pt C**, 628-638, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.029.
 64. Von Bohlen Und Halbach, O., and von Bohlen Und Halbach, V. (2018) BDNF effects on dendritic spine morphology and hippocampal function, *Cell. Tissue Res.*, **373**, 729-741, doi: 10.1007/s00441-017-2782-x.
 65. Jeanneteau, F., Borie, A., Chao, M. V., and Garabedian, M. J. (2019) Bridging the Gap between brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoid effects on brain networks, *Neuroendocrinology*, **109**, 277-284, doi: 10.1159/000496392.
 66. Gray, J. D., Milner, T. A., and McEwen, B. S. (2013) Dynamic plasticity: the role of glucocorticoids, brain-derived neurotrophic factor and other trophic factors, *Neuroscience*, **239**, 214-227, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.034.
 67. Numakawa, T., and Odaka, H. (2022) The role of neurotrophin signaling in age-related cognitive decline and cognitive diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7726, doi: 10.3390/ijms23147726.
 68. Arango-Lievano, M., Lambert, W. M., and Jeanneteau, F. (2015) Molecular biology of glucocorticoid signaling, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **872**, 33-57, doi: 10.1007/978-1-4939-2895-8_2.
 69. Jeanneteau, F., and Chao, M. V. (2013) Are BDNF and glucocorticoid activities calibrated? *Neuroscience*, **239**, 173-195, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.017.
 70. Rothman, S. M., and Mattson, M. P. (2013) Activity-dependent, stress-responsive BDNF signaling and the quest for optimal brain health and resilience throughout the lifespan, *Neuroscience*, **239**, 228-240, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.014.
 71. Gulyaeva, N. V. (2017) Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 301-307, doi: 10.1134/S0006297917030087.
 72. Gibon, J., Barker, P. A. (2017) Neurotrophins and proneurotrophins: focus on synaptic activity and plasticity in the brain, *Neuroscientist*, **23**, 587-604, doi: 10.1177/1073858417697037.
 73. Mizui, T., Ishikawa, Y., Kumanogoh, H., and Kojima, M. (2016) Neurobiological actions by three distinct subtypes of brain-derived neurotrophic factor: multi-ligand model of growth factor signaling, *Pharmacol. Res.*, **105**, 93-98, doi: 10.1016/j.phrs.2015.12.019.
 74. Kojima, M., and Mizui, T. (2017) BDNF propeptide: a novel modulator of synaptic plasticity, *Vitam. Horm.*, **104**, 19-28, doi: 10.1016/bs.vh.2016.11.006.
 75. Costa, R. O., Perestrelo, T., and Almeida, R. D. (2018) PRoneurotrophins and CONsequences, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2934-2951, doi: 10.1007/s12035-017-0505-7.
 76. Leal, G., Afonso, P. M., Salazar, I. L., and Duarte, C. B. (2015) Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF, *Brain Res.*, **1621**, 82-101, doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.019.
 77. Notaras, M., and van den Buuse, M. (2020) Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders, *Mol. Psychiatry*, **25**, 2251-2274, doi: 10.1038/s41380-019-0639-2.
 78. Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction, *Handb. Exp. Pharmacol.*, **220**, 223-250, doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_9.
 79. Ninan, I. (2014) Synaptic regulation of affective behaviors; role of BDNF, *Neuropharmacology*, **76 Pt C**, 684-695, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.011.
 80. Duman, R. S., Deyama, S., and Fogaça, M. V. (2021) Role of BDNF in the pathophysiology and treatment of depression: activity-dependent effects distinguish rapid-acting antidepressants, *Eur. J. Neurosci.*, **53**, 126-139, doi: 10.1111/ejn.14630.
 81. Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., and Volpicelli, F. (2020) Neurotrophic factor BDNF, physiological functions and therapeutic potential in depression,

- neurodegeneration and brain cancer, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7777, doi: 10.3390/ijms21207777.
82. Numakawa, T., Adachi, N., Richards, M., Chiba, S., and Kunugi, H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system, *Neuroscience*, **239**, 157-172, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.073.
 83. Jones, O. D. (2015) Astrocyte-mediated metaplasticity in the hippocampus: help or hindrance? *Neuroscience*, **309**, 113-124, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.08.035.
 84. Fuchsberger, T., and Paulsen, O. (2022) Modulation of hippocampal plasticity in learning and memory, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **75**, 102558, doi: 10.1016/j.conb.2022.102558.
 85. Wang, Y., Fu, A. K. Y., and Ip, N. Y. (2022) Instructive roles of astrocytes in hippocampal synaptic plasticity: neuronal activity-dependent regulatory mechanisms, *FEBS J.*, **289**, 2202-2218, doi: 10.1111/febs.15878.
 86. Çalışkan, G., Müller, A., and Albrecht, A. (2020) Long-term impact of early-life stress on hippocampal plasticity: spotlight on astrocytes, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4999, doi: 10.3390/ijms21144999.
 87. Cassé, F., Richetin, K., and Toni, N. (2018) Astrocytes' contribution to adult neurogenesis in physiology and Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **12**, 432, doi: 10.3389/fncel.2018.00432.
 88. Delpech, J. C., Madore, C., Nadjar, A., Joffre, C., Wohleb, E. S., and Layé, S. (2015) Microglia in neuronal plasticity: Influence of stress, *Neuropharmacology*, **96** (Pt A), 19-28, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.034.
 89. Guedes, J. R., Ferreira, P. A., Costa, J. M., Cardoso, A. L., and Peça, J. (2022) Microglia-dependent remodeling of neuronal circuits, *J. Neurochem.*, **163**, 74-93, doi: 10.1111/jnc.15689.
 90. Rodríguez-Iglesias, N., Sierra, A., and Valero, J. (2019) Rewiring of memory circuits: connecting adult newborn neurons with the help of microglia, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **7**, 24, doi: 10.3389/fcell.2019.00024.
 91. Turkin, A., Tuchina, O., and Klempin, F. (2021) Microglia function on precursor cells in the adult hippocampus and their responsiveness to serotonin signaling, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 665739, doi: 10.3389/fcell.2021.665739.
 92. Sanguino-Gómez, J., Buurstede, J. C., Abiega, O., Fitzsimons, C. P., Lucassen, P. J., Eggen, B. J. L., Lesuis, S. L., Meijer, O. C., and Krugers, H. J. (2022) An emerging role for microglia in stress-effects on memory, *Eur. J. Neurosci.*, **55**, 2491-2518, doi: 10.1111/ejn.15188.
 93. Gądek-Michalska, A., Tadeusz, J., Rachwalska, P., and Bugajski, J. (2013) Cytokines, prostaglandins and nitric oxide in the regulation of stress-response systems, *Pharmacol. Rep.*, **65**, 1655-1662, doi: 10.1016/s1734-1140(13)71527-5.
 94. Dheen, S. T., Kaur, C., and Ling, E. A. (2007) Microglial activation and its implications in the brain diseases, *Curr. Med. Chem.*, **14**, 1189-1197, doi: 10.2174/092986707780597961.
 95. Williamson, L. L., and Bilbo, S. D. (2013) Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability, *Brain. Behav. Immun.*, **30**, 186-194, doi: 10.1016/j.bbi.2013.01.077.
 96. Singhal, G., and Baune, B. T. (2017) Microglia: an interface between the loss of neuroplasticity and depression, *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 270, doi: 10.3389/fncel.2017.00270.
 97. Bauer, M. E., and Teixeira, A. L. (2019) Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1437**, 57-67, doi: 10.1111/nyas.13712.
 98. Bisht, K., Sharma, K., and Tremblay, M. È. (2018) Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress, *Neurobiol. Stress*, **9**, 9-21, doi: 10.1016/j.ynstr.2018.05.003.
 99. Patterson, S. L. (2015) Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity, *Neuropharmacology*, **96** (Pt A), 11-18, doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.020.
 100. Salazar, I. L., Caldeira, M. V., Curcio, M., and Duarte, C. B. (2016) The role of proteases in hippocampal synaptic plasticity: putting together small pieces of a complex puzzle, *Neurochem. Res.*, **41**, 156-182, doi: 10.1007/s11064-015-1752-5.
 101. Wiera, G., and Mozrzymas, J. W. (2015) Extracellular proteolysis in structural and functional plasticity of mossy fiber synapses in hippocampus, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 427, doi: 10.3389/fncel.2015.00427.
 102. Wójtowicz, T., Brzdęk, P., and Mozrzymas, J. W. (2015) Diverse impact of acute and long-term extracellular proteolytic activity on plasticity of neuronal excitability, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 313, doi: 10.3389/fncel.2015.00313.
 103. Gulyaeva, N. V. (2003) Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue, *Biochemistry (Moscow)*, **68**, 1171-1180, doi: 10.1023/b:biry.0000009130.62944.35.
 104. Yakovlev, A. A., and Gulyaeva, N. V. (2011) Pleiotropic functions of brain proteinases: methodological considerations and search for caspase substrates, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1079-1086, doi: 10.1134/S0006297911100014.
 105. Wang, Y., Liu, Y., Bi, X., and Baudry, M. (2020) Calpain-1 and calpain-2 in the brain: new evidence for a critical role of calpain-2 in neuronal death, *Cells*, **9**, 2698, doi: 10.3390/cells9122698.
 106. Orlowski, R. Z. (1999) The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis, *Cell Death Differ.*, **6**, 303-313, doi: 10.1038/sj.cdd.4400505.
 107. Laham, B. J., and Gould, E. (2022) How stress influences the dynamic plasticity of the brain's extracellular matrix, *Front. Cell. Neurosci.*, **15**, 814287, doi: 10.3389/fncel.2021.814287.

108. Breviario, S., Senserrich, J., Florensa-Zanuy, E., Garro-Martínez, E., Díaz, Á., Castro, E., Pazos, Á., and Pilar-Cuéllar, F. (2023) Brain matrix metalloproteinase-9 activity is altered in the corticosterone mouse model of depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **120**, 110624, doi: 10.1016/j.pnpbp.2022.110624.
109. Koyama, Y. (2021) Endothelin ETB receptor-mediated astrocytic activation: pathological roles in brain disorders, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4333, doi: 10.3390/ijms22094333.
110. Harkness, K. A., Adamson, P., Sussman, J. D., Davies-Jones, G. A., Greenwood, J., and Woodroffe, M. N. (2000) Dexamethasone regulation of matrix metalloproteinase expression in CNS vascular endothelium, *Brain*, **123** (Pt 4), 698-709, doi: 10.1093/brain/123.4.698.
111. Förster, C., Kahles, T., Kietz, S., and Drenckhahn, D. (2007) Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND, *J. Physiol.*, **580** (Pt. 3), 937-949, doi: 10.1113/jphysiol.2007.129007.
112. Hillegass, J. M., Villano, C. M., Cooper, K. R., and White, L. A. (2007) Matrix metalloproteinase-13 is required for zebra fish (*Danio rerio*) development and is a target for glucocorticoids, *Toxicol. Sci.*, **100**, 168-179, doi: 10.1093/toxsci/kfm192.
113. Wang, Y., Li, M., Tang, J., Song, M., Xu, X., Xiong, J., Li, J., and Bai, Y. (2011) Glucocorticoids facilitate astrocytic amyloid- β peptide deposition by increasing the expression of APP and BACE1 and decreasing the expression of amyloid- β -degrading proteases, *Endocrinology*, **152**, 2704-2715, doi: 10.1210/en.2011-0145.
114. Hou, Y., Luo, S., Zhang, Y., Jia, Y., Li, H., Xiao, C., Bao, H., and Du, J. (2019) Contrasting effects of acute and long-term corticosterone treatment on amyloid- β , beta-secretase 1 expression, and nuclear factor kappa B nuclear translocation, *J. Integr. Neurosci.*, **18**, 393-400, doi: 10.31083/j.jin.2019.04.1172.
115. Proulx, K., and Seeley, R. J. (2005) The regulation of energy balance by the central nervous system, *Psychiatr. Clin. North Am.*, **28**, 25-38, doi: 10.1016/j.psc.2004.09.005.
116. Maniam, J., and Morris, M. J. (2012) The link between stress and feeding behaviour, *Neuropharmacology*, **63**, 97-110, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.017.
117. Ferrario, C. R., and Reagan, L. P. (2018) Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts, *Neuropharmacology*, **136** (Pt B), 182-191, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.001.
118. Grillo, C. A., Woodruff, J. L., Macht, V. A., and Reagan, L. P. (2019) Insulin resistance and hippocampal dysfunction: disentangling peripheral and brain causes from consequences, *Exp. Neurol.*, **318**, 71-77, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.04.012.
119. Spinelli, M., Fusco, S., and Grassi, C. (2019) Brain insulin resistance and hippocampal plasticity: mechanisms and biomarkers of cognitive decline, *Front. Neurosci.*, **13**, 788, doi: 10.3389/fnins.2019.00788.
120. Irving, A., and Harvey, J. (2021) Regulation of hippocampal synaptic function by the metabolic hormone leptin: implications for health and disease, *Prog. Lipid Res.*, **82**, 101098, doi: 10.1016/j.plipres.2021.101098.
121. McGregor, G., Malekizadeh, Y., and Harvey, J. (2015) Minireview: food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones, *Mol. Endocrinol.*, **29**, 3-13, doi: 10.1210/me.2014-1328.
122. Lazarov, O., Minshall, R. D., and Bonini, M. G. (2020) Harnessing neurogenesis in the adult brain-A role in type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease, *Int. Rev. Neurobiol.*, **155**, 235-269, doi: 10.1016/bs.irn.2020.03.020.
123. Detka, J., Kurek, A., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Lasoń, W., and Budziszewska, B. (2013) Neuroendocrine link between stress, depression and diabetes, *Pharmacol. Rep.*, **65**, 1591-1600, doi: 10.1016/s1734-1140(13)71520-2.
124. Doyle, T., Halaris, A., and Rao, M. (2014) Shared neurobiological pathways between type 2 diabetes and depressive symptoms: a review of morphological and neurocognitive findings, *Curr. Diab. Rep.*, **14**, 560, doi: 10.1007/s11892-014-0560-7.
125. Lyra E Silva, N. M., Gonçalves, R. A., Boehnke, S. E., Forny-Germano, L., Munoz, D. P., and De Felice, F. G. (2019) Understanding the link between insulin resistance and Alzheimer's disease: Insights from animal models, *Exp. Neurol.*, **316**, 1-11, doi: 10.1016/j.expneurol.2019.03.016.
126. Yagi, S., and Galea, L. A. M. (2019) Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis, *Neuropsychopharmacology*, **44**, 200-213, doi: 10.1038/s41386-018-0208-4.
127. Koss, W. A., and Frick, K. M. (2017) Sex differences in hippocampal function, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 539-562, doi: 10.1002/jnr.23864.
128. Scharfman, H. E., and MacLusky, N. J. (2017) Sex differences in hippocampal area CA3 pyramidal cells, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 563-575, doi: 10.1002/jnr.23927.
129. Tozzi, A., Bellingacci, L., and Pettorossi, V. E. (2020) Rapid estrogenic and androgenic neurosteroids effects in the induction of long-term synaptic changes: implication for early memory formation, *Front. Neurosci.*, **14**, 572511, doi: 10.3389/fnins.2020.572511.
130. Sheppard, P. A. S., Choleris, E., and Galea, L. A. M. (2019) Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents, *Mol. Brain*, **12**, 22, doi: 10.1186/s13041-019-0442-7.
131. Nicholson, K., MacLusky, N. J., and Leranthy, C. (2020) Synaptic effects of estrogen, *Vitam. Horm.*, **114**, 167-210, doi: 10.1016/bs.vh.2020.06.002.

132. Murakami, G., Hojo, Y., Kato, A., Komatsuzaki, Y., Horie, S., Soma, M., Kim, J., and Kawato, S. (2018) Rapid nongenomic modulation by neurosteroids of dendritic spines in the hippocampus: androgen, oestrogen and corticosteroid, *J. Neuroendocrinol.*, **30**, e12561, doi: 10.1111/jne.12561.
133. Gall, C. M., Le, A. A., and Lynch, G. (2021) Sex differences in synaptic plasticity underlying learning, *J. Neurosci. Res.*, **101**, 764-782, doi: 10.1002/jnr.24844.
134. Kramár, E. A., Babayan, A. H., Gall, C. M., and Lynch, G. (2013) Estrogen promotes learning-related plasticity by modifying the synaptic cytoskeleton, *Neuroscience*, **239**, 3-16, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.038.
135. Harte-Hargrove, L. C., Maclusky, N. J., and Scharfman, H. E. (2013) Brain-derived neurotrophic factor-estrogen interactions in the hippocampal mossy fiber pathway: implications for normal brain function and disease, *Neuroscience*, **239**, 46-66, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.029.
136. Deakk, T., Quinck, M., Cidlowski, J. A., Victoriak, N. C., Murphy, A. Z., and Sheridank, J. F. (2015) Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for pharmacotherapy of stress-related disease, *Stress*, **18**, 367-380, doi: 10.3109/10253890.2015.1053451.
137. Kandasamy, M., Radhakrishnan, R. K., Poornimaik Abirami, G. P., Roshank, S. A., Yesudhask, A., Balamuthuk, K., Prahalathank, C., Shanmugaapriyak, S., Moorthy, A., Essakk, M. M., and Anusuyadevik, M. (2019) Possible existence of the hypothalamic-pituitary-hippocampal (HPH) axis: a reciprocal relationship between hippocampal specific neuroestradiol synthesis and neuroblastosis in ageing brains with special reference to menopause and neurocognitive disorders, *Neurochem. Res.*, **44**, 1781-1795, doi: 10.1007/s11064-019-02833-1.
138. Resmini, E., Santos, A., and Webb, S. M. (2016) Cortisol excess and the brain, *Front. Horm. Res.*, **46**, 74-86, doi: 10.1159/000443868.
139. Hill, A. R., and Spencer-Segal, J. L. (2021) Glucocorticoids and the brain after critical illness, *Endocrinology*, **162**, bqaa242, doi: 10.1210/endo/bqaa242.
140. Druzhkova, T. A., Yakovlev, A. A., Rider, F. K., Zinchuk, M. S., Guekht, A. B., and Gulyaeva, N. V. (2022) Elevated serum cortisol levels in patients with focal epilepsy, depression, and comorbid epilepsy and depression, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10414, doi: 10.3390/ijms231810414.
141. Zhanina, M. Y., Druzhkova, T. A., Yakovlev, A. A., Vladimirova, E. E., Freiman, S. V., Eremina, N. N., Guekht, A. B., and Gulyaeva, N. V. (2022) Development of post-stroke cognitive and depressive disturbances: associations with neurohumoral indices, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **44**, 6290-6305, doi: 10.3390/cimb44120429.
142. Gulyaeva, N. V., Onufriev, M. V., and Moiseeva, Y. V. (2021) Ischemic stroke, glucocorticoids, and remote hippocampal damage: a translational outlook and implications for modeling, *Front. Neurosci.*, **15**, 781964, doi: 10.3389/fnins.2021.781964.
143. Komoltsev, I. G., and Gulyaeva, N. V. (2022) Brain trauma, glucocorticoids and neuroinflammation: dangerous liaisons for the hippocampus, *Biomedicines*, **10**, 1139, doi: 10.3390/biomedicines10051139.
144. Komoltsev, I. G., Frankevich, S. O., Shirobokova, N. I., Volkova, A. A., Onufriev, M. V., Moiseeva, J. V., Novikova, M. R., and Gulyaeva, N. V. (2021) Neuroinflammation and neuronal loss in the hippocampus are associated with immediate posttraumatic seizures and corticosterone elevation in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5883, doi: 10.3390/ijms22115883.
145. Herbert, J., and Lucassen, P. J. (2016) Depression as a risk factor for Alzheimer's disease: genes, steroids, cytokines and neurogenesis – what do we need to know? *Front. Neuroendocrinol.*, **41**, 153-171, doi: 10.1016/j.yfrne.2015.12.001.
146. Linnemann, C., and Lang, U. E. (2020) Pathways connecting late-life depression and dementia, *Front. Pharmacol.*, **11**, 279, doi: 10.3389/fphar.2020.00279.
147. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
148. McEwen, B. S., and Akil, H. (2020) Revisiting the stress concept: implications for affective disorders, *J. Neurosci.*, **40**, 12-21, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019.
149. Xu, W., Yao, X., Zhao, F., Zhao, H., Cheng, Z., Yang, W., Cui, R., Xu, S., and Li, B. (2020) Changes in hippocampal plasticity in depression and therapeutic approaches influencing these changes, *Neural Plast.*, **2020**, 8861903, doi: 10.1155/2020/8861903.
150. Sotiropoulos, I., Silva, J. M., Gomes, P., Sousa, N., and Almeida, O. F. X. (2019) Stress and the etio-pathogenesis of Alzheimer's disease and depression, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1184**, 241-257, doi: 10.1007/978-981-32-9358-8_20.
151. Meyer, M., Lara, A., Hunt, H., Belanoff, J., de Kloet, E. R., Gonzalez Deniselle, M. C., and De Nicola, A. F. (2018) The selective glucocorticoid receptor modulator cort 113176 reduces neurodegeneration and neuroinflammation in wobbler mice spinal cord, *Neuroscience*, **384**, 384-396, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.05.042.
152. Dalm, S., Karssen, A. M., Meijer, O. C., Belanoff, J. K., and de Kloet, E. R. (2019) Resetting the stress system with a mifepristone challenge, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 503-522, doi: 10.1007/s10571-018-0614-5.
153. De Kloet, E. R., de Kloet, S. F., de Kloet, C. S., and de Kloet, A. D. (2019) Top-down and bottom-

- up control of stress-coping, *J. Neuroendocrinol.*, **31**, e12675, doi: 10.1111/jne.12675.
154. De Nicola, A. F., Meyer, M., Guennoun, R., Schumacher, M., Hunt, H., Belanoff, J., de Kloet, E. R., and Gonzalez Deniselle, M. C. (2020) Insights into the therapeutic potential of glucocorticoid receptor modulators for neurodegenerative diseases, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2137, doi: 10.3390/ijms21062137.
 155. Meyer, M., Kruse, M. S., Garay, L., Lima, A., Roig, P., Hunt, H., Belanoff, J., de Kloet, E. R., Deniselle, M. C. G., and De Nicola, A. F. (2020) Long-term effects of the glucocorticoid receptor modulator
 - CORT113176 in murine motoneuron degeneration, *Brain Res.*, **1727**, 146551, doi: 10.1016/j.brainres.2019.146551.31726042.
 156. De Kloet, E. R., and Joëls, M. (2023) The cortisol switch between vulnerability and resilience, *Mol. Psychiatry*, doi: 10.1038/s41380-022-01934-8.
 157. Daskalakis, N. P., Meijer, O. C., and de Kloet, E. R. (2022) Mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor work alone and together in cell-type-specific manner: implications for resilience prediction and targeted therapy, *Neurobiol. Stress*, **18**, 100455, doi: 10.1016/j.ynstr.2022.100455.

GLUCOCORTICIDS ORCHESTRATE ADULT HIPPOCAMPAL PLASTICITY: GROWING POINTS AND TRANSLATIONAL ASPECTS

Review

N. V. Gulyaeva^{1,2}

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
117485 Moscow, Russia; e-mail: nata_gul@ihna.ru*

² *Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, 115419 Moscow, Russia*

The review analyzes modern concepts regarding the control of various mechanisms of the hippocampal neuroplasticity in adult mammals and humans by glucocorticoids. Glucocorticoid hormones ensure the coordinated functioning of key components and mechanisms of hippocampal plasticity: neurogenesis, glutamatergic neurotransmission, microglia and astrocytes, systems of neurotrophic factors, neuroinflammation, protease activities, metabolic hormones, neurosteroids. Regulatory mechanisms are diverse; along with the direct action of glucocorticoids through their receptors, there are indirect glucocorticoid-dependent effects, as well as numerous interactions between various systems and components. Despite the fact that many connections in this complex regulatory scheme have not yet been established, the study of the factors and mechanisms considered in the review forms growth points in the field of glucocorticoid-regulated processes in the brain and primarily in the hippocampus. These studies are fundamentally important for the translation into the clinic and the potential treatment/prevention of common diseases of the emotional and cognitive spheres and respective comorbid conditions.

Keywords: neuroplasticity, hippocampus, glucocorticoids, hypothalamic-pituitary-adrenal axis, synaptic plasticity, stress, neurogenesis, neuroinflammation, glutamatergic transmission, proteases, BDNF, insulin resistance, depression, Alzheimer's disease, aging

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ЦИКЛОФИЛИН А ЧЕЛОВЕКА В КОМБИНАЦИИ С АДОПТИВНОЙ Т-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИЕЙ УСИЛИВАЕТ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ИММУНОТЕРАПИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo*

© 2023 А.А. Калинина*, Д.Б. Казанский, Л.М. Хромых

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России, 115478 Москва, Россия; электронная почта: aakalinina89@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2022

После доработки 08.02.2023

Принята к публикации 08.02.2023

Адоптивная Т-клеточная терапия (АКТ) успешно внедряется в лечение онкологических заболеваний. Основные ограничения эффективности АКТ обусловлены низкой жизнеспособностью, коротким временем персистенции и потерей функциональной активности Т-клеток после адоптивного переноса. Поиск новых иммуномодуляторов, способных улучшить выживаемость, экспансию и функции Т-лимфоцитов при адоптивном переносе с минимальным развитием побочных эффектов, позволит создать более успешные и безопасные стратегии АКТ. Особый интерес в этом отношении представляет рекомбинантный циклофилин А человека (рчЦФА), который обладает плеiotропным иммуномодулирующим действием, направленным на стимуляцию врожденного и адаптивного противоопухолевого иммунитета. В настоящей работе изучали влияние рчЦФА на эффективность АКТ. В исследованиях использовали ранее разработанную экспериментальную систему адоптивной терапии лимфомы EL-4 мыши, в которой источником опухолеспецифических Т-клеток для АКТ служили лимфоциты трансгенных мышей 1D1a с врожденным пулом Т-лимфоцитов, способных распознавать антигены данной опухоли. В моделях иммунокомпетентных и иммунодефицитных трансгенных мышей было показано, что 3-дневное введение рчЦФА значительно стимулировало отторжение лимфомы EL-4 и улучшало выживаемость животных-опухоленосителей после адоптивного переноса лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a в сниженных дозах. Наши исследования показали, что рчЦФА способен значительно повышать эффективность АКТ посредством усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов. Полученные результаты открывают широкие перспективы для разработки новых подходов адоптивной Т-клеточной иммунотерапии злокачественных новообразований с использованием рчЦФА как альтернативы существующей цитокиновой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: циклофилин А, адоптивная клеточная терапия, цитокиновая терапия, противоопухолевая терапия, Т-клеточный рецептор, цитотоксический Т-лимфоцит, иммунодефицит, трансгенез.

DOI: 10.31857/S0320972523050020, EDN: AXIUIK

ВВЕДЕНИЕ

Адоптивная клеточная терапия (АКТ) — это перспективный, активно развивающийся подход иммунотерапии онкологических заболеваний, который предполагает введение пациенту аутологичных опухолеспецифических Т-лимфоцитов [1, 2]. Их источником могут служить опухоль-инфильтрирующие лимфоциты или Т-клетки, генетически модифициро-

ванные Т-клеточными рецепторами (ТКР) или химерными антигенными рецепторами (CAR), специфичными к антигенам опухоли [1–4]. Многочисленные клинические данные подтвердили эффективность АКТ с использованием ТКР-модифицированных Т-клеток при лечении различных солидных опухолей (меланомы, синовиальной саркомы, карциномы толстой кишки и др.) и CAR-Т-клеток при терапии В-клеточных лимфом [3, 4].

Принятые сокращения: АКТ — адоптивная клеточная терапия; ТКР — Т-клеточный рецептор; ЦФА — циклофилин А; рчЦФА — рекомбинантный циклофилин А человека; ЦТЛ — цитотоксические лимфоциты; Kb — молекула главного комплекса гистосовместимости H2-K^b.

* Адресат для корреспонденции.

Основными ограничениями АКТ являются низкая жизнеспособность и короткое время персистенции Т-клеток в организме пациента после адоптивного переноса [5, 6], а также потеря их функциональной активности в супрессорном микроокружении опухоли [7, 8]. Разработка стратегий, позволяющих поддерживать эффективность адоптивно перенесенных Т-лимфоцитов, остается актуальной практической задачей развития АКТ.

В ряде клинических испытаний АКТ солидных опухолей в протоколы лечения включена курсовая терапия интерлейкином-2 (ИЛ-2) [9–11]. ИЛ-2 стал первым цитокином, высокая эффективность которого была показана при лечении онкологических заболеваний, что обусловлено его иммуномодулирующим действием, направленным на стимуляцию пролиферации, дифференцировки и активации Т-клеток и естественных киллеров (НК-клеток) [12, 13]. Между тем введение пациентам высоких доз ИЛ-2 сопряжено с развитием тяжелых токсических эффектов (анемии, цитопении, гипотонии, почечной недостаточности и др.), вплоть до летальных исходов [12, 14]. Поиск новых иммуномодуляторов, способных улучшить выживаемость, экспансию и функциональную активность Т-лимфоцитов при адоптивном переносе с минимальным развитием побочных эффектов, позволит создать более успешные и безопасные стратегии АКТ.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что рекомбинантный циклофилин А человека (рЦФА) обладает иммуностимулирующим действием, направленным на усиление противоопухолевого иммунного ответа за счет активации врожденного и адаптивного иммунитета [15]. ЦФА (18 кДа) – белок из семейства изомераз, в секреторной форме выполняющий функции провоспалительного фактора [16] и хемоаттрактанта для незрелых гемопоэтических клеток [17], гранулоцитов, макрофагов, дендритных клеток и активированных Т-лимфоцитов [18]. Кроме того, ЦФА регулирует продукцию и функции других хемокинов и провоспалительных факторов [19]. Учитывая плейотропность иммуномодулирующего действия ЦФА, мы предположили, что данный фактор также способен влиять на функциональную активность Т-клеток при адоптивном переносе.

В настоящей работе исследовали влияние рЦФА на эффективность АКТ в экспериментальной модели лимфомы EL-4 мыши. В качестве источника опухолеспецифических Т-клеток использовали спленоциты трансгенных мышей 1D1a, которые врожденно имеют пул Т-клеток, способных распознавать антигены

данной опухоли [20]. Используя разработанные ранее модели отторжения лимфомы EL-4 у мышей дикого типа B10.D2(R101) [15, 20] и трансгенных мышей 1D1b [21], мы показали, что рЦФА способен значительно повышать эффективность АКТ посредством усиления эффекторных функций опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Мышей инбредной линии B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Москва, Россия). В работе также использовали мышей трансгенной линии 1D1a [20] и трансгенной линии 1D1b [21], выведенных на генетической основе B10.D2(R101), из собственной коллекции лаборатории механизмов регуляции иммунитета (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Экспериментальные протоколы одобрены этической комиссией ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В работе использовали самцов и самок, 18–20 г (6–8-недельного возраста). Экспериментальные группы состояли из 6–18 животных.

Анализ наличия трансгенных α - и β -цепей ТКР. Наличие трансгена в геноме мышей 1D1a и 1D1b анализировали методом ПЦР, как описано ранее [20, 21]. 1D1 α -цепь принадлежит к семейству V α 1.3, к которому нет доступных коммерческих антител [20]. По этой

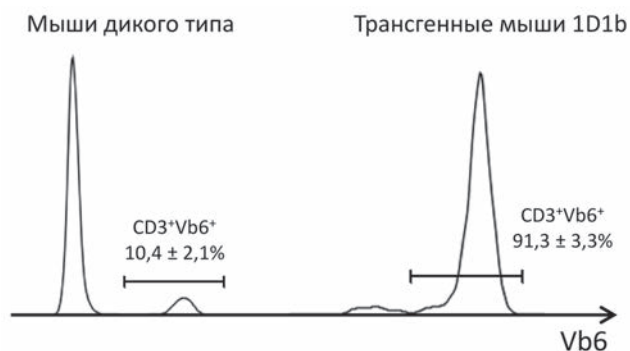


Рис. 1. Анализ экспрессии трансгенной β -цепи ТКР в Т-лимфоцитах мышей 1D1b. Цитофлуориметрический анализ Т-клеток периферической крови мышей линии B10.D2(R101) (дикий тип) и трансгенной линии 1D1b. Экспрессию трансгенной β -цепи определяли окрашиванием антителами к семейству Vb6. Относительное количество (%) CD3⁺Vb6⁺ Т-клеток анализировали в популяции живых одиночных лимфоцитов. Данные представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$)

причине прямая оценка популяций Т-лимфоцитов мышей 1D1a, экспрессирующих трансгенную α -цепь ТКР, оказалась невозможной. Экспрессию трансгенной 1D1 β -цепи в периферических лимфоцитах мышей 1D1b подтверждали методом проточной цитофлуориметрии. Относительное количество Т-клеток, экспрессирующих трансгенную ТКР β , в периферической крови мышей 1D1b составило $91,3 \pm 3,3\%$ (рис. 1), что соответствует ранее полученным данным [21].

Клеточные линии. Клетки лимфомы EL-4 (H2-K^b) получены из коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. EL-4 прививали внутрибрюшинно (в/б) сингенным мышам C57BL/6 ($3,0\text{--}5,0 \times 10^6$ клеток/мышь) и наращивали в асцитной форме 10–14 дней. Опухолевые клетки стерильно выделяли из брюшного асцита и 3 раза отмывали в фосфатно-солевом буфере (PBS; pH 7,4) центрифугированием (200 g, 5 мин, 4 °C). Жизнеспособные клетки подсчитывали в смеси трипанового синего и эозина в камере Горяева.

Прививка EL-4. Клетки лимфомы EL-4 прививали мышам B10.D2(R101) и 1D1b в/б в дозе $3,0 \times 10^5$ клеток/мышь в 500 мкл PBS.

Подготовка клеточных суспензий. Образцы крови мышей дикого типа B10.D2(R101) и трансгенных мышей 1D1b отбирали из ретроорбитального синуса и инкубировали в лизирующем буфере («BD Pharmingen», США) для удаления эритроцитов. Затем образцы дважды промывали PBS при 200 g, 5 мин при 4 °C и окрашивали флуоресцентно меченными антителами для последующего анализа методом проточной цитофлуориметрии. Интактных мышей линий B10.D2(R101) и 1D1a умерщвляли методом цервикальной дислокации, стерильно извлекали селезенки и осторожно выдавливали клетки из стромы органа в гомогенизаторе Поттера в 3 мл PBS. Эритроциты лизировали в лизирующем буфере, лейкоциты промывали и подсчитывали, как описано выше. Полученные суспензии спленоцитов использовали для адоптивного переноса мышам линий B10.D2(R101) и 1D1b. Мышей-реципиентов B10.D2(R101) выводили из эксперимента на 6 день после прививки клеток EL-4 и извлекали лаваж брюшной полости. Для этого в брюшную полость животных вводили шприцем 2 мл ледяного PBS и отбирали 1 мл клеточной суспензии. У мышей 1D1b извлекали клетки лаважа и селезенки на 12 день после трансплантации лимфомы EL-4 и использовали для цитофлуориметрического анализа.

Адоптивный перенос. Спленоциты мышей линий B10.D2(R101) и 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ и

$5,0 \times 10^6$ вводили в/б мышам B10.D2(R101) и 1D1b в 500 мкл PBS одновременно с трансплантацией клеток EL-4.

РЧЦФА, схема введения. РЧЦФА получали, как описано ранее [22, 23]. РЧЦФА вводили в/б мышам B10.D2(R101) и 1D1b в дозе 100 мкг/мышь 1 раз в день в течение 3 дней, начиная через 3 ч после трансплантации клеток EL-4 и адоптивного переноса. Для оценки противоопухолевого эффекта рчЦФА у иммунодефицитных мышей 1D1b исследуемый белок вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней, начиная через 3 ч после прививки лимфомы EL-4. Контрольным животным аналогично вводили PBS.

Антитела. В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3/FITC (клон 145-2C11) и анти-CD8/Pacific blue (клон 53-6.7) фирмы «BD Pharmingen»; анти-CD44/APC (клон IM7), анти-Vb6/PE (клон RR4-7) и анти-CD62L/APC-Cy7 (клон MEL-14) фирмы «eBioscience», США, а также анти-Kb/FITC (клон AF6-88.5) фирмы «BioLegend», США.

Цитофлуориметрический анализ. Пробы клеток ($5,0 \times 10^5$) инкубировали с блокирующими антителами Fc block (клон 2.4G2, «BD Pharmingen») (10 мин, 4 °C) и окрашивали флуоресцентно меченными антителами (40 мин, 4 °C). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACS Canto II («BD Bioscience») в программе FACSDiva 6.0 («BD Bioscience»). Лейкоциты выделяли по показателям прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния с последующим выделением одиночных клеток по показателям FSC-H против FSC-A (FSC-H – параметр прямого светорассеяния клетки, характеризующий высоту (H – height) пика, FSC-A – параметр, учитывающий площадь под пиком (A – area). Мертвые клетки исключали из анализа по включению йодида пропидия («BD Bioscience»). Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили в популяции живых одиночных лейкоцитов. При анализе образцов клеток крови, лаважа и селезенки трансгенных мышей 1D1b относительное количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную ТКР β , оценивали по окрашиванию анти-Vb6 антителами (семейство V β , к которому принадлежит трансгенная β -цепь 1D1b). Относительное количество опухолевых клеток EL-4 в брюшной полости экспериментальных животных определяли по экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости H2-K^b (Kb). Анализ популяций Т-лимфоцитов проводили после исключения Kb-позитивных клеток. Обработку данных проводили в программе Flow Jo 7.6 («TreeStar Inc.», США).

Статистический анализ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего ($m \pm SEM$). Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica for Windows 6.0 («StatSoft», США) и непарного критерия Стьюдента. Предварительно проводили проверку нормальности распределения выборок с использованием критерия Шапиро–Уилка для подтверждения корректности использования t -критерия Стьюдента. Различия признавали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее мы показали, что адоптивный перенос 1×10^7 спленцитов трансгенных мышей

1D1a мышам дикого типа B10.D2(R101) приводит к быстрой элиминации клеток лимфомы EL-4 в организме реципиента [20]. Для оценки влияния рчЦФА на эффективность АКТ в разработанной экспериментальной модели для адоптивного переноса использовали две дозы лимфоцитов мышей 1D1a – $2,5 \times 10^6$ и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь, что в 4 и 2 раза ниже установленной эффективной дозы соответственно. РчЦФА вводили животным один раз в день в течение 3 дней, т.е. по схеме, максимально приближенной к клиническим протоколам для ИЛ-2 [14].

Влияние рчЦФА на динамику отторжения лимфомы EL-4 при адоптивном переносе лимфоцитов 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь. Анализ клеток брюшной полости экспериментальных животных на 6 день после трансплан-

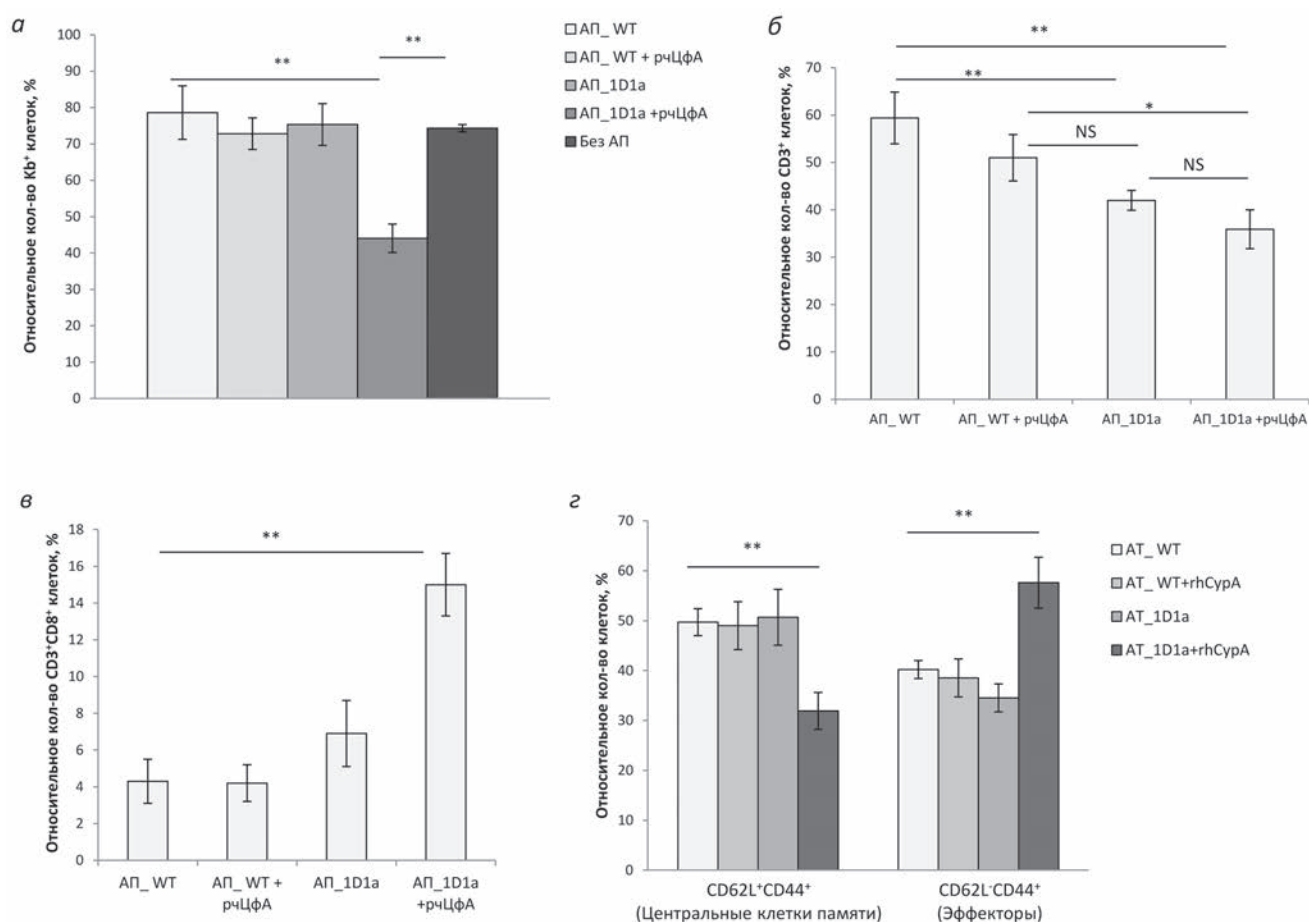


Рис. 2. Влияние рчЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии при дозе $2,5 \times 10^6$ лимфоцитов 1D1a/мышь. Мышам B10.D2(R101) в/б вводили спленциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_ WT) в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. В качестве контроля использовали мышей B10.D2(R101), аналогично привитых EL-4, но без адоптивного переноса (без АП). РчЦФА вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. Анализ клеток брюшной полости проводили методом проточной цитофлуориметрии на 6 день после трансплантации опухолевых клеток и адоптивного переноса. Относительное количество (%) клеток EL-4 (а), Т-клеток (CD3+) (б), цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+) (в) и Т-лимфоцитов CD3+CD8+ с фенотипом центральных клеток памяти (CD62L+CD44+) и эффекторов (CD62L-CD44+) (г). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). NS – различия не достоверны; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

тации клеток EL-4 и адоптивного переноса лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь показал, что под действием рчЦФА произошло снижение относительного количества Kb⁺-клеток в 1,7 раза по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,01$; рис. 2, а). При этом без введения рчЦФА адоптивный перенос $2,5 \times 10^6$ трансгенных клеток не повлиял на скорость отторжения EL-4 в организме реципиентов как по сравнению с животными без адоптивного переноса, так и с группами адоптивного переноса контрольных лимфоцитов (рис. 2, а). Это указывает на неэффективность данной дозы трансгенных лимфоцитов для АКТ в этой экспериментальной системе. Стоит особо отметить, что под действием рчЦФА скорость элиминации лимфомы после адоптивного переноса лимфоцитов мышей дикого типа (АП_WT) была без изменений (рис. 2, а).

При адоптивном переносе трансгенных лимфоцитов в брюшной полости реципиентов

наблюдалось менее интенсивное накопление Т-клеток (рис. 2, б): относительное количество лимфоцитов CD3⁺ было ниже в 1,4 раза ($p \leq 0,01$) по сравнению с группой адоптивного переноса контрольных спленоцитов (АП_WT). Под действием рчЦФА произошло дальнейшее снижение относительного количества Т-клеток в 1,6 раза по сравнению с группой АП_WT ($p \leq 0,01$) и в 1,4 раза – по сравнению с группой АП_WT+рчЦФА ($p \leq 0,05$). Однако стоит отметить, что по данному показателю не было достоверных различий между группами адоптивного переноса трансгенных лимфоцитов (рис. 2, б). Введение рчЦФА при трансфузии контрольных спленоцитов не вызвало изменения в содержании CD3⁺-клеток в брюшной полости экспериментальных животных при сравнении с группой АП_WT.

Анализ доли цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺, ЦТЛ) в популяции Т-клеток брюшной полости реципиентов показал, что введение рчЦФА после адоптивного переноса

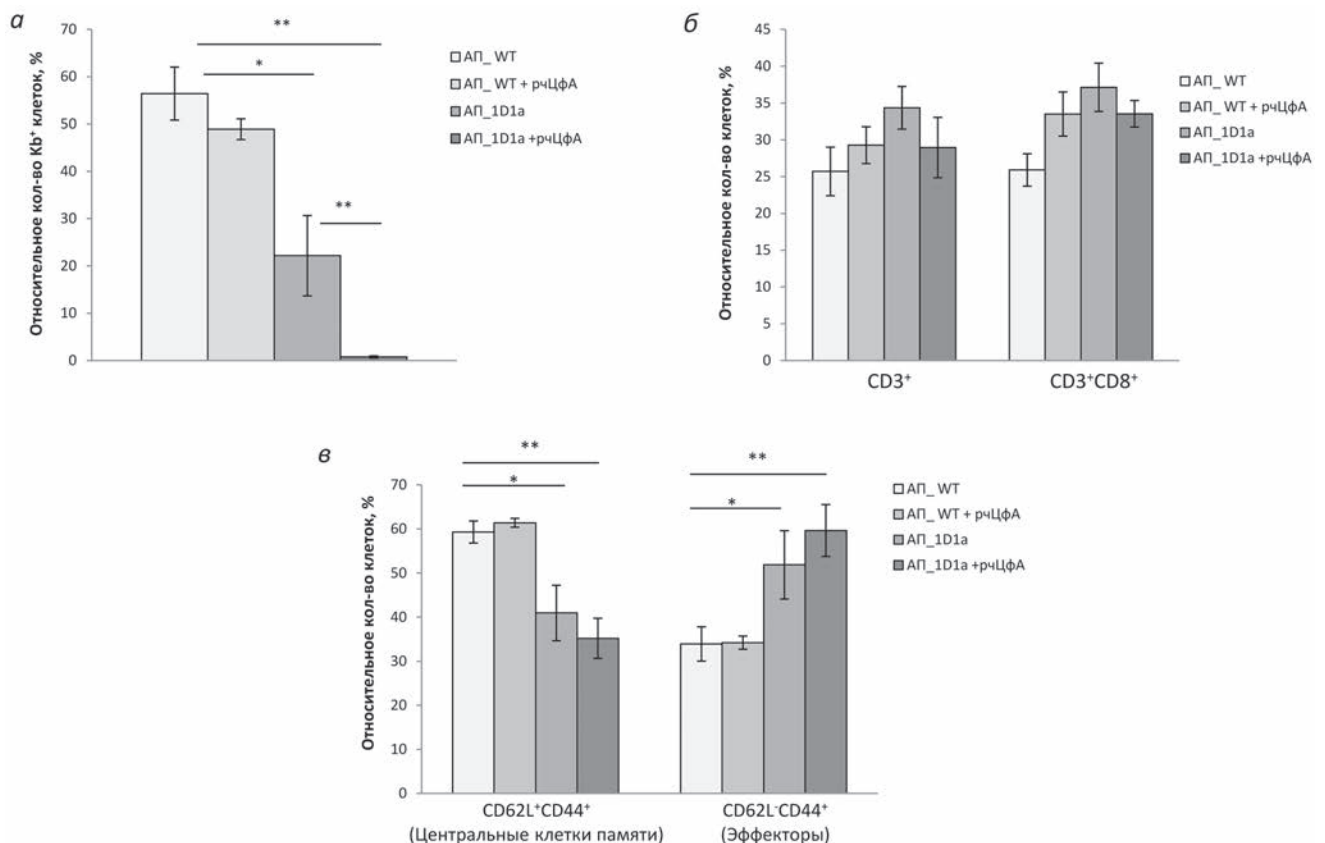


Рис. 3. Влияние рчЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии при дозе $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов 1D1a/мышь. Мышам B10.D2(R101) в/б вводили спленоциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_WT) в дозе $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. РчЦФА вводили в/б в дозе 100 мкг/мышь в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. Анализ клеток брюшной полости проводили методом проточной цитометрии на 6 день после трансплантации опухолевых клеток и адоптивного переноса. Относительное количество (%) клеток EL-4 (а), Т-клеток (CD3⁺) и цитотоксических Т-клеток (CD3⁺CD8⁺) (б), Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ с фенотипом центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторов (CD62L⁻CD44⁺) (г). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 6-9$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

трансгенных лимфоцитов увеличило долю ЦТЛ в 2,2 раза по сравнению с группой АП_1D1a и в 3,6 раза — по сравнению с обеими группами адоптивного переноса контрольных клеток ($p \leq 0,01$; рис. 2, в). Данный эффект рЧЦФА отсутствовал при трансфузии спленоцитов мышей дикого типа (рис. 2, в). Собственно адоптивный перенос лимфоцитов мышей 1D1a не вызывал изменения относительного количества ЦТЛ в брюшной полости экспериментальных животных.

Кроме того, исключительно после введения рЧЦФА в группе мышей-реципиентов трансгенных спленоцитов наблюдалось локальное накопление эффекторных ЦТЛ, доля которых была увеличена в 1,7 раза по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,01$; рис. 2, г) за счет пропорционального снижения относительного количества Т-клеток с фенотипом центральных клеток памяти (рис. 2, г).

Влияние рЧЦФА на динамику отторжения лимфомы EL-4 при адоптивном переносе лимфоцитов 1D1a в дозе $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь. При адоптивном переносе $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов трансгенных мышей 1D1a наблюдалось снижение относительного количества клеток лимфомы EL-4 в брюшной полости реципиентов в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой адоптивного переноса АП_WT ($p \leq 0,05$; рис. 3, а), что указывает на частичную эффективность данной дозы трансгенных клеток. При этом введение рЧЦФА способствовало усилению эффективности АКТ и привело к практически полной элиминации опухолевых клеток из организма мышей-реципиентов к 6 дню после трансплантации EL-4 (рис. 3, а). Данный эффект рЧЦФА не наблюдался после адоптивного переноса лимфоцитов мышей дикого типа (АП_WT; рис. 3, а).

При анализе относительного количества Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и ЦТЛ ($CD3^+CD8^+$) в брюшной полости мышей-реципиентов не было выявлено достоверных различий ни в одной исследуемой группе (рис. 3, б). Однако адоптивный перенос трансгенных лимфоцитов 1D1a привел к увеличению доли $CD8^+$ -эффекторов ($CD62L-CD44^+$) в 1,5–1,7 раза по сравнению с группами адоптивного переноса контрольных спленоцитов (рис. 3, в). Стоит отметить, что у реципиентов трансгенных клеток на фоне введения рЧЦФА доля эффекторных ЦТЛ в брюшной полости не отличалась от значений в контрольной группе АП_1D1a (рис. 3, в), что может указывать на начало контракции эффекторной фазы иммунного ответа ввиду полной элиминации специфического антигена (рис. 3, а).

Влияние рЧЦФА на развитие противоопухолевого иммунного ответа у иммунодефицитных трансгенных мышей 1D1b. Для подтверждения способности рЧЦФА повышать эффективность разработанной экспериментальной АКТ в дальнейшей работе использовали трансгенных мышей 1D1b, которые не способны развивать полноценный иммунный ответ и отторгать аллогенную лимфому EL-4 вследствие суженного репертуара ТКР у этих мышей [21, 24].

Ранее мы показали, что под действием рЧЦФА у трансгенных мышей 1D1b в ответе на лимфому EL-4 значительно увеличивается пул эффекторных $CD8^+$ -клеток, экспрессирующих трансгенную β -цепь ТКР (ТКР β) [15]. В настоящей работе мы более детально изучили влияние рЧЦФА на развитие противоопухолевого иммунного ответа у этих иммунодефицитных животных. Для этого исследуемый белок вводили в течение 10 дней после трансплантации клеток лимфомы EL-4 и на 12 день анализировали популяции клеток брюшной полости (рис. 4, а и б) и селезенки (рис. 4, в–д).

Исследование клеток брюшной полости мышей 1D1b показало, что курсовое введение рЧЦФА способствовало достоверному (в 1,8 раза; $p \leq 0,05$) снижению абсолютного количества опухолевых клеток по сравнению с контролем к 12 дню после трансплантации лимфомы EL-4 (рис. 4, а). Это сопровождалось увеличением доли Т-клеток почти в 3,0 раза по сравнению с контрольной группой без рЧЦФА и интактными мышами без опухоли (рис. 4, б). Стоит отметить, что при этом достоверно снизилось относительное количество Т-клеток с трансгенной ТКР β ($p \leq 0,05$; рис. 4, б). Эти данные указывают на то, что под действием рЧЦФА индуцируется инфильтрация опухоли Т-лимфоцитами, экспрессирующими как трансгенную, так и эндогенные β -цепи ТКР.

В селезенке мышей 1D1b после введения рЧЦФА отмечалось достоверное увеличение относительного количества ЦТЛ ($p \leq 0,05$; рис. 4, в) без изменения соотношения $Vb6^+/Vb6^- CD8^+$ -лимфоцитов (рис. 4, г). При этом наблюдалось увеличение доли эффекторных ЦТЛ в популяции Т-лимфоцитов, экспрессирующих трансгенную ТКР β (в 4,0 раза по сравнению с контролями), в основном за счет снижения относительного количества наивных клеток ($p \leq 0,01$; рис. 4, д, 1–3). Аналогичным образом введение рЧЦФА привело к достоверному повышению относительного количества эффекторов среди Т-клеток с эндогенными β -цепями ТКР ($p \leq 0,05$ по сравнению с контрольными группами; рис. 4, д, 4–6). Это согласуется с результатами анализа клеток брюшной полости (рис. 4, б)

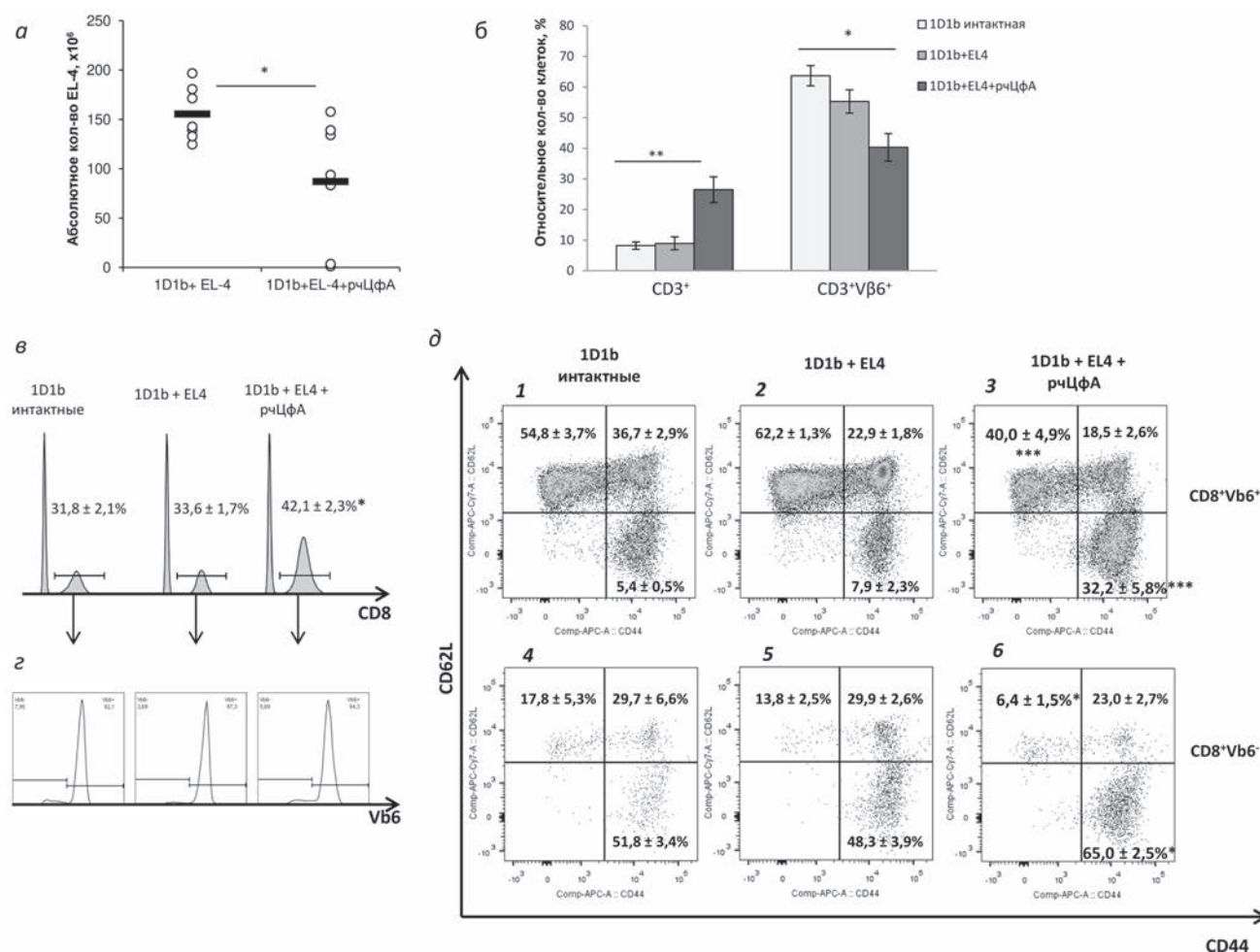


Рис. 4. Анализ клеток брюшной полости и селезенки мышей 1D1b после трансплантации лимфомы EL-4. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б трансплантировали $3,0 \times 10^5$ клеток EL-4 и в/б вводили рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. На 12 день анализировали клеточный состав в лаваже брюшной полости (а и б) и селезенке (в–д) экспериментальных животных. а – Абсолютное количество опухолевых клеток ($\times 10^6$). б – Относительное количество (%) Т-клеток (CD3⁺) и Т-клеток, экспрессирующих трансгенную β-цепь ТКР (CD3⁺Vβ6⁺); в – относительное количество (%) цитотоксических Т-лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺); г – относительное количество (%) CD3⁺CD8⁺ Т-клеток селезенки, экспрессирующих трансгенную β-цепь ТКР (Vβ6⁺); д – относительное количество (%) CD3⁺CD8⁺ Т-клеток селезенки с фенотипом наивных клеток (CD62L⁺CD44⁻), центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторов (CD62L⁻CD44⁺). Индивидуальный анализ популяций CD3⁺CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих трансгенную β-цепь ТКР (CD8⁺Vβ6⁺) (д, 1–3) или эндогенные β-цепи ТКР (CD8⁺Vβ6⁻) (д, 4–6). Данные получены в трех независимых экспериментах и представлены как $m \pm SEM$ ($n = 7–8$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

и подтверждает вовлечение обеих субпопуляций Т-клеток, экспрессирующих трансгенную ТКРβ (Vβ6⁺) или эндогенные варианты ТКРβ (Vβ6⁻), в ответ на клетки EL-4 под действием рЧЦФА.

Курсовое введение рЧЦФА также привело к достоверному увеличению продолжительности жизни мышей 1D1b с привитой лимфомой EL-4 ($30,2 \pm 3,9$ дней по сравнению с $20,2 \pm 1,2$ днями в контрольной группе; $p \leq 0,05$; рис. 5). Более того, под действием рЧЦФА у 10% трансгенных мышей произошло полное отторжение лимфомы EL-4 без признаков роста опухоли при наблюдении более 100 дней (рис. 5).

Влияние рЧЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии в трансгенной модели 1D1b. При оценке влияния рЧЦФА на эффективность АКТ в модели иммунодефицитных мышей 1D1b для адоптивного переноса использовали спленоциты трансгенных мышей 1D1a в обеих исследуемых дозах ($2,5 \times 10^6$ и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь).

Инфузия трансгенных лимфоцитов мышам 1D1b в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь достоверно увеличила продолжительность жизни реципиентов с привитой лимфомой EL-4 по сравнению со всеми контрольными группами ($p \leq 0,05$; рис. 6, а). Курсовое (3-дневное) введение рЧЦФА значительно улучшило эффек-

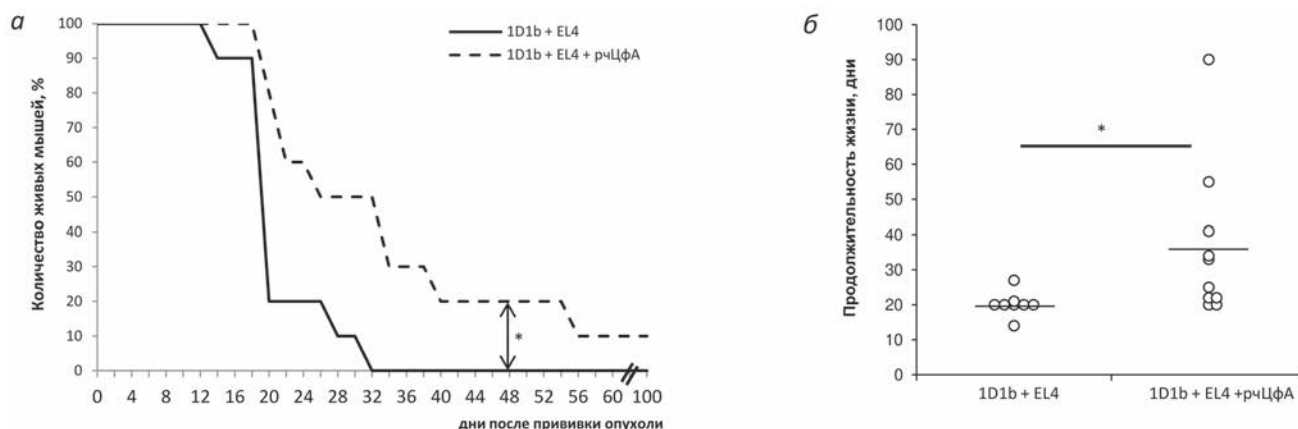


Рис. 5. Влияние рЧЦФА на продолжительность жизни трансгенных мышей 1D1b после прививки клеток лимфомы EL-4. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б трансплантировали $3,0 \times 10^5$ клеток EL-4 и в/б вводили рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь в течение 10 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. *а* – Динамика гибели животных. *б* – Продолжительность жизни животных ($n = 10$). * $p \leq 0,05$ (непарный критерий Стьюдента)

тивность АКТ, повысив срок жизни мышей 1D1b в 1,5 раза по сравнению с группой АП_1D1a ($44,0 \pm 1,1$ дня и $28,8 \pm 1,5$ дня соответственно; рис. 6, *а*). При этом продолжительность жизни мышей-реципиентов после инъекций рЧЦФА увеличилась в 2,0 раза по сравнению с животными без терапии и группами адоптивного переноса контрольных лимфоцитов (рис. 6, *а*).

Адоптивный перенос $5,0 \times 10^6$ лимфоцитов мышей 1D1a трансгенным мышам 1D1b увеличил продолжительность жизни реципиентов в 2,0 раза по сравнению со всеми контрольными группами животных (рис. 6, *б*). Кроме того, около 20% мышей 1D1b (4 из 18) полностью отторгли лимфому EL-4 без признаков роста опухоли при наблюдении более 120 дней (рис. 6, *в*). После курсового введения рЧЦФА количество выживших реципиентов увеличилось почти вдвое (38,8%; 7 из 18) по сравнению с группой АП_1D1a (рис. 6, *в*), что свидетельствует об усилении эффективности АКТ при использовании данной дозы лимфоцитов мышей 1D1a.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее в нашей лаборатории была получена трансгенная линия мышей 1D1a, Т-лимфоциты которых экспрессируют α -цепь центрического ТКР клеток памяти, распознающего молекулу МНС I класса H2-K^b [20]. Вследствие этого трансгенные мыши 1D1a врожденно имеют пул Т-клеток, специфичных к H2-K^b, и способны ускоренно отторгать лимфому EL-4, экспрессирующую данный аллоантиген [20]. Экспериментальную модель, в которой спле-

ноциты трансгенных мышей 1D1a служили источником опухолеспецифических Т-клеток [20], использовали в настоящей работе для исследования влияния рЧЦФА на эффективность АКТ.

Было показано, что курсовое введение рЧЦФА при адоптивном переносе трансгенных 1D1a лимфоцитов в количестве в 2–4 раза ниже эффективной дозы [20] значительно стимулирует отторжение специфической опухоли в организме реципиентов (рис. 2, *а* и 3, *а*). Этот эффект был обусловлен локальным накоплением эффекторных ЦТЛ посредством дифференцировки из Т-лимфоцитов с фенотипом центральных клеток памяти (рис. 2, *г*). Полученные данные согласуются с результатами нашего предыдущего исследования, в котором было показано, что у трансгенных мышей 1D1a в ответе на EL-4 именно центральные клетки памяти становятся источником эффекторных ЦТЛ [20].

Для подтверждения наблюдаемых эффектов рЧЦФА мы использовали трансгенных мышей 1D1b – уникальную модель иммунодефицитного состояния, обусловленного сокращением разнообразия репертуара ТКР вследствие экспрессии трансгенной β -цепи ТКР [24]. Было показано, что β -цепь 1D1b не определяет антигенную специфичность исходного рецептора [20, 24] и в комплексе с эндогенными α -цепями формирует узкий репертуар ТКР с ограниченным количеством клонотипов, способных распознавать специфический антиген (молекулу МНС I класса H2-K^b). Вследствие этого Т-клетки, экспрессирующие трансгенную ТКР β , образуют небольшое количество эффекторов в ответ на клетки аллогенной лимфомы EL-4, несущей H2-K^b [21, 24]. В организме трансгенных мышей 1D1b формируется также минорный

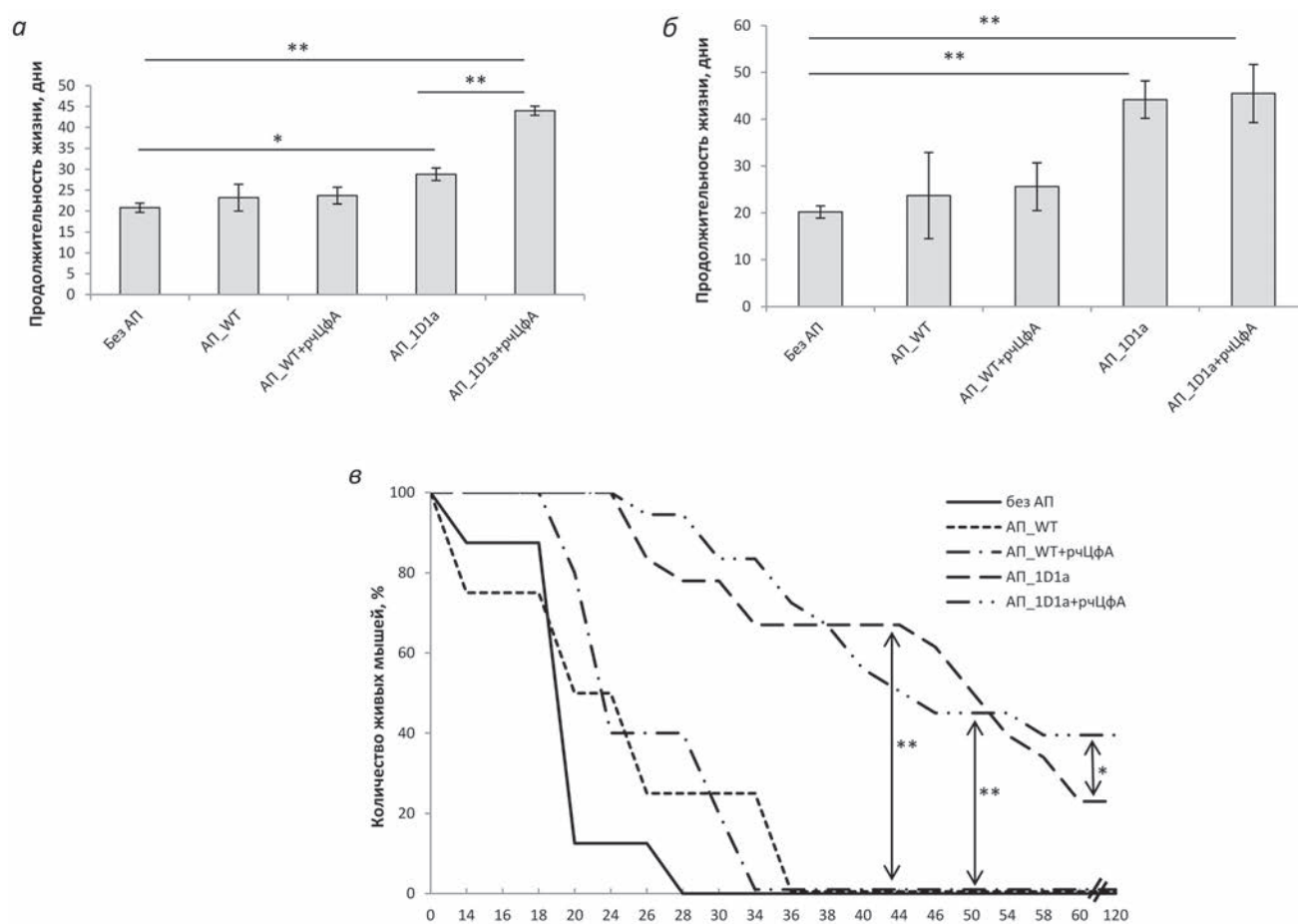


Рис. 6. Влияние рЧЦФА на эффективность адоптивной клеточной терапии в модели иммунодефицитных мышей 1D1b. Мышам трансгенной линии 1D1b в/б вводили спленциты трансгенных мышей 1D1a (АП_1D1a) или мышей B10.D2(R101) (АП_WT) в дозе $2,5 \times 10^6$ клеток/мышь (а) и $5,0 \times 10^6$ клеток/мышь (б и в) одновременно с в/б трансплантацией клеток EL-4. В/б инъекции рЧЦФА в дозе 100 мкг/мышь проводили в течение 3 дней. Контрольным животным аналогично вводили PBS. а и б – Продолжительность жизни животных ($n = 7-18$). в – Динамика гибели животных ($n = 10-18$). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ (непарный критерий Стьюдента)

пул Т-клеток (~10%) с эндогенными β -цепями, разнообразие которых не ограничено, и, следовательно, он способен распознавать EL-4. Однако из-за низкой численности этих клонотипов их оказывается недостаточно для развития полноценного иммунного ответа и элиминации опухолевых клеток [24]. Таким образом, иммунодефицитные трансгенные мыши 1D1b являются удобной моделью для оценки эффективности АКТ, так как эта экспериментальная система позволяет минимизировать вклад иммунитета реципиента в ответ на опухолевые клетки.

В данной экспериментальной системе было показано, что курсовое (3-дневное) введение рЧЦФА значительно повышает терапевтический эффект адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов мышам 1D1b, в 2 раза увеличивая продолжительность жизни животных с привитой лимфомой EL-4 (рис. 6). Более того, под действием рЧЦФА около 40% реципиентов выживает после АКТ, полно-

стью отторгнув опухоль, что в 2 раза выше показателя для АКТ без введения рЧЦФА (рис. 6, в).

Полученные данные указывают на способность рЧЦФА стимулировать эффекторные функции опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов, таким образом значительно повышая эффективность АКТ. Учитывая отсутствие токсических эффектов рЧЦФА в широком диапазоне доз [25], результаты настоящей работы открывают широкие перспективы для оптимизации протоколов АКТ, исключая необходимость длительного и трудоемкого наращивания *in vitro* требуемого количества Т-лимфоцитов для адоптивного переноса, и разработки более успешных и безопасных стратегий адоптивной иммунотерапии злокачественных новообразований с использованием рЧЦФА как альтернативы существующим подходам цитокиновой терапии [11, 14].

Кроме того, в модели иммунодефицитных трансгенных мышей 1D1b без АКТ было

показано, что рЧЦФА, как хемоаттрактант, стимулирует накопление Т-лимфоцитов по месту локализации опухоли, при этом большую часть составляют Т-клетки с эндогенными ТКРβ (60%; рис. 4, б), т.е. с более широким диапазоном специфичностей. Также под влиянием рЧЦФА у мышей 1D1b в ответе на клетки лимфомы EL-4 системно (в селезенке) накапливаются как эффекторы, экспрессирующие трансгенную ТКРβ, так и эффекторы с эндогенными вариантами ТКРβ (рис. 4, д). Это позволяет предположить, что под действием рЧЦФА ограниченное количество клонотипов Т-клеток мыши 1D1b, способных распознавать антигены лимфомы EL-4, подвергаются клональной экспансии и формируют более эффективный пул ЦТЛ. Это обуславливает интенсивное отторжение опухолевых клеток на ранних сроках и достоверное увеличение продолжительности жизни трансгенных мышей-опухоленосителей (рис. 5).

Сокращенный репертуар ТКР и низкая численность клонотипов Т-клеток, способных распознавать опухолевые антигены, служат серьезным препятствием для развития полноценного адаптивного противоопухолевого иммунного ответа, позволяя опухоли избежать иммунологического контроля и быстро прогрессировать. Терапия, направленная на активацию и экспансию опухолеспецифических Т-клеток, может повысить скорость элиминации трансформиро-

ванных клеток, снизить темпы иммуноредактирования опухоли и формирования супрессорного микроокружения. Продемонстрированный в настоящем исследовании иммуностимулирующий эффект рЧЦФА может потенциально использоваться для коррекции противоопухолевого ответа иммунодефицитных пациентов на ранних стадиях развития опухоли.

Вклад авторов. А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — концепция; Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — руководство работой; А.А. Калинина — проведение экспериментов; А.А. Калинина, Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский — обсуждение результатов исследования; А.А. Калинина — написание текста статьи; Л.М. Хромых, Д.Б. Казанский, А.А. Калинина — редактирование текста статьи; А.А. Калинина — получение финансирования. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-75-00004), <http://rscf.ru/project/22-75-00004/>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Met, Ö., Jensen, K., Chamberlain, C., Donia, M., and Svane, I. (2019) Principles of adoptive T cell therapy in cancer, *Semin. Immunopathol.*, **41**, 49–58, doi: 10.1007/s00281-018-0703-z.
2. Zhang, H., and Chen, J. (2018) Current status and future directions of cancer immunotherapy, *J. Cancer.*, **9**, 1773–1781, doi: 10.7150/jca.24577.
3. Zhao, Q., Jiang, Y., Xiang, S., Kaboli, P., Shen, J., Zhao, Y., Wu, X., Du, F., Li, M., Cho, C., Li, J., Wen, Q., Liu, T., Yi, T., and Xiao, Z. (2021) Engineered TCR-T cell immunotherapy in anticancer precision medicine: pros and cons, *Front. Immunol.*, **12**, 658753, doi: 10.3389/fimmu.2021.658753.
4. June, C., O'Connor, R., Kawalekar, O., Ghassemi, S., and Milone, M. (2018) CAR T cell immunotherapy for human cancer, *Science*, **359**, 1361–1365, doi: 10.1126/science.aar6711.
5. Mescher, M., Popescu, F., Gerner, M., Hammerbeck, C., and Curtsinger, J. (2007) Activation-induced non-responsiveness (anergy) limits CD8 T cell responses to tumors, *Semin. Cancer Biol.*, **17**, 299–308, doi: 10.1016/j.semcancer.2007.06.008.
6. William, Y., Ho, C., and Greenberg, P. (2002) Adoptive therapy with CD8⁺ T cells: it may get by with a little help from its friends, *J. Clin. Invest.*, **110**, 1415–1417, doi: 10.1172/JCI17214.
7. Srivastava, S., and Riddell, S. (2018) Chimeric antigen receptor T cell therapy: challenges to bench-to-bedside efficacy, *J. Immunol.*, **200**, 459–468, doi: 10.4049/jimmunol.1701155.
8. Yamamoto, T., Lee, P., Vodnala, S., Gurusamy, D., Kishton, R., Yu, Z., Eidizadeh, A., Eil, R., Fioravanti, J., Gattinoni, L., Kochenderfer, J., Fry, T., Aksoy, B., Hammerbacher, J., Cruz, A., Siegel, R., Restifo, N., and Klebanoff, C. (2019) T cells genetically engineered to overcome death signaling enhance adoptive cancer immunotherapy, *J. Clin. Invest.*, **129**, 1551–1565, doi: 10.1172/JCI121491.
9. Chandran, S., Somerville, R., Yang, J., Sherry, R., Klebanoff, C., Goff, S., Wunderlich, J., Danforth, D., Zlott, D., Paria, B., Sabesan, A., Srivastava, A., Xi, L., Pham, T., Raffeld, M., White, D., Toomey, M., Rosenberg, S., and Kammula, U. (2017) Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of

- tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study, *Lancet Oncol.*, **18**, 792-802, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30251-6.
10. Veatch, J., Lee, S., Fitzgibbon, M., Chow, I., Jesernig, B., Schmitt, T., Kong, Y., Kargl, J., Houghton, A., Thompson, J., McIntosh, M., Kwok, W., and Riddell, S. (2018) Tumor-infiltrating BRAFV600E-specific CD4⁺ T cells correlated with complete clinical response in melanoma, *J. Clin. Invest.*, **128**, 1563-1568, doi: 10.1172/JCI98689.
 11. Berraondo, P., Sanmamed, M., Ochoa, M., Etcheberria, I., Aznar, M., Pérez-Gracia, J., Rodríguez-Ruiz, M., Ponz-Sarvisé, M., Castañón, E., and Melero, I. (2019) Cytokines in clinical cancer immunotherapy, *Br. J. Cancer*, **120**, 6-15, doi: 10.1038/s41416-018-0328-y.
 12. Choudhry, H., Helmi, N., Abdulaal, W., Zeyadi, M., Zamzami, M., Wu, W., Mahmoud, M., Warsi, M., Rasool, M., and Jamal, M. (2018) Prospects of IL-2 in cancer immunotherapy, *Biomed. Res. Int.*, **2018**, 9056173, doi: 10.1155/2018/9056173.
 13. Rosenberg, S., Yang, J., White, D., and Steinberg, S. (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response, *Ann. Surg.*, **228**, 307-319, doi: 10.1097/0000658-199809000-00004.
 14. Nguyen, L., Saibil, S., Sotov, V., Le, M., Khoja, L., Ghazarian, D., Bonilla, L., Majeed, H., Hogg, D., Joshua, A., Crump, M., Franke, N., Spreafico, A., Hansen, A., Al-Habeeb, A., Leong, W., Easson, A., Reedijk, M., Goldstein, D., McCready, D., Yasufuku, K., Waddell, T., Cypel, M., Pierre, A., Zhang, B., Boross-Harmer, S., Cipollone, J., Nelles, M., Scheid, E., Fyrsta, M., Lo, C., Nie, J., Yam, J., Yen, P., Gray, D., Motta, V., Elford, A., DeLuca, S., Wang, L., Effendi, S., Ellenchery, R., Hirano, N., Ohashi, P., and Butler, M. (2019) Phase II clinical trial of adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and low-dose interleukin-2, *Cancer Immunol. Immunother.*, **68**, 773-785, doi: 10.1007/s00262-019-02307-x.
 15. Kalinina, A., Silaeva, Yu., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2019) The role of recombinant human Cyclophilin A in the antitumor immune response, *Acta Naturae*, **11**, 63-67, doi: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67.
 16. Nigro, P., Pompilio, G., and Capogrossi, M. (2013) Cyclophilin A: a key player for human disease, *Cell Death Dis.*, **4**, e888, doi: 10.1038/cddis.2013.410.
 17. Khromykh, L., Kulikova, N., Anfalova, T., Muranova, T., Abramov, V., Vasiliev, A., Khlebnikov, V., and Kazansky, D. (2007) Cyclophilin A produced by thymocytes regulates the migration of murine bone marrow cells, *Cell. Immunol.*, **249**, 46-53, doi: 10.1016/j.cellimm.2007.11.002.
 18. Xu, Q., Leiva, M., Fischkoff, S., Handschumacher, R., and Lyttle, C. (1992) Leukocyte chemotactic activity of cyclophilin, *J. Biol. Chem.*, **267**, 11968-11971.
 19. Dawar, F., Xiong, Y., Khattak, M., Li, J., Lin, L., Mei, J. (2017) Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion, *J. Leukoc. Biol.*, **102**, 989-992, doi: 10.1189/jlb.3RU0317-090RR.
 20. Zamkova, M., Kalinina, A., Silaeva, Y., Persiyantseva, N., Bruter, A., Deikin, A., Khromykh, L., and Kazansky, D. (2019) Dominant role of the α -chain in rejection of tumor cells bearing a specific alloantigen in TCR α transgenic mice and in *in vitro* experiments, *Oncotarget*, **10**, 4808-4821, doi: 10.18632/oncotarget.27093.
 21. Silaeva, Y., Kalinina, A., Vagida, M., Khromykh, L., Deikin, A., Ermolkevich, T., Sadchikova, E., Goldman, I., and Kazansky, D. (2013) Decrease in pool of T lymphocytes with surface phenotypes of effector and central memory cells under influence of TCR transgenic β -chain expression, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 549-559, doi: 10.1134/S0006297913050143.
 22. Kalinina, A., Kolesnikov, A., Kozyr, A., Kulikova, N., Zamkova, M., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2022) Preparative production and purification of recombinant human Cyclophilin A, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 259-268, doi: 10.1134/S0006297922030063.
 23. Khromykh, L. M., Kalinina, A. A., Kozyr, A. V., Kolesnikov, A. V., Silaeva, Yu. Yu., and Kazansky, D. B. Patent № 2603283, Russian Federation, 2015.
 24. Silaeva, Y., Grinenko, T., Vagida, M., Kalinina, A., Khromykh, L., and Kazansky, D. (2014) Immune selection of tumor cells in TCR β -chain transgenic mice, *J. Immunotoxicol.*, **11**, 393-399, doi: 10.3109/1547691X.2013.861548.
 25. Kalinina, A., Zamkova, M., Antoshina, E., Trukhanova, L., Gorkova, T., Kazansky, D., and Khromykh, L. (2019) Analyses of the toxic properties of recombinant human Cyclophilin A in mice, *J. Immunotoxicol.*, **16**, 182-190, doi: 10.1080/1547691X.2019.1665597.

RECOMBINANT HUMAN CYCLOPHILIN A IN COMBINATION WITH ADOPTIVE T CELL THERAPY IMPROVES THE EFFICACY OF CANCER IMMUNOTHERAPY IN EXPERIMENTAL MODELS *in vivo*

A. A. Kalinina*, D. B. Kazansky, and L. M. Khromykh

*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of the Russian Federation,
115478 Moscow, Russia; E-mail: aakalinina89@gmail.com*

Adoptive T-cell therapy (ACT) is successfully applied in cancer treatment, however, its efficiency can be limited by a low viability, short persistence time, and loss of functional activity of T cells after adoptive transfer. The search for novel immunomodulators that can improve the viability, expansion, and functions of T cells after their infusion with the minimal side effects could contribute to the development of more efficient and safe ACT strategies. Recombinant human cyclophilin A (rhCypA) is of particular interest in this respect, as it exhibits pleiotropic immunomodulatory activity and stimulates both innate and adaptive anti-tumor immunity. Here, we evaluated the effect of rhCypA on the efficacy of ACT in the mouse EL4 lymphoma model. Lymphocytes from transgenic 1D1a mice with an inborn pool of EL4-specific T cells were used as a source of tumor-specific T cells for ACT. In models of immunocompetent and immunodeficient transgenic mice, the course (3 days) rhCypA administration was shown to significantly stimulate EL4 rejection and prolong the overall survival of tumor-bearing mice after adoptive transfer of lowered doses of transgenic 1D1a cells. Our studies showed that rhCypA significantly improved the efficacy of ACT by enhancing the effector functions of tumor-specific cytotoxic T cells. These findings open up the prospects for the development of innovative strategies of adoptive T-cell immunotherapy for cancer using rhCypA as an alternative to existing cytokine therapies.

Keywords: cyclophilin A, adoptive cell therapy, cytokine therapy, anti-cancer therapy, T-cell receptor, cytotoxic T lymphocyte, immunodeficiency, transgenesis

О-АЦЕТИЛГОМОСЕРИНСУЛЬФИДРИЛАЗА ИЗ *Clostridioides difficile*: РОЛЬ ОСТАТКОВ ТИРОЗИНА АКТИВНОГО ЦЕНТРА

© 2023 В.В. Куликова*, С.В. Ревтович, А.Д. Лыфенко,
Е.А. Морозова, В.С. Коваль, Н.П. Бажулина, Т.В. Демидкина

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия; электронная почта: vitviku@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.11.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 10.02.2023

О-ацетилгомосеринсульфидрилаза является одним из ключевых ферментов в биосинтезе метионина в *Clostridioides difficile*. Механизм реакции γ -замещения О-ацетил-L-гомосерина, катализируемой этим ферментом, наименее изучен среди пиридоксаль-5'-фосфат-зависимых ферментов, участвующих в метаболизме цистеина и метионина. Для выяснения роли остатков активного центра Tyr52 и Tyr107 получены четыре мутантные формы фермента с заменами на фенилаланин и аланин. Исследованы каталитические и спектральные свойства мутантных форм. Скорость реакции γ -замещения, катализируемой мутантными формами с заменой остатка Tyr52, уменьшилась более чем на три порядка по сравнению с ферментом дикого типа. Мутантные формы Tyr107Phe и Tyr107Ala практически не катализировали данную реакцию. Замены остатков Tyr52 и Tyr107 привели к уменьшению сродства апофермента к кофактору на три порядка и изменениям ионного состояния внутреннего альдимида фермента. Полученные результаты позволили сделать предположение, что остаток Tyr52 участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофактор-связывающего остатка лизина на стадиях отрыва C- α -протона и элиминирования боковой группы субстрата. Остаток Tyr107 может выполнять роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: О-ацетилгомосеринсульфидрилаза, пиридоксаль-5'-фосфат, реакция γ -замещения, сайт-направленный мутагенез.

DOI: 10.31857/S0320972523050032, EDN: AXKFQQ

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)-зависимая О-ацетилгомосеринсульфидрилаза (ОАНС, КФ 2.5.1.49) участвует в биосинтезе метионина, катализируя реакцию γ -замещения О-ацетил-L-гомосерина (ОАН), приводящую к образованию предшественника метионина — L-гомоцистеина (рис. 1). Фермент обнаружен в некоторых микроорганизмах, включая патогенные бактерии класса Clostridia [1, 2]. Одними из самых распространенных и агрессивных возбудителей внутрибольничных инфекций в последние годы стали антибиотикорезистентные штаммы *Clostridioides difficile*. Ранее нами был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli* ген ОАНС из *C. difficile*, получены гомогенные препараты фермента и ис-

следованы его биохимические свойства [2]. Данные о характеристиках ПЛФ-зависимых ферментов из патогенных микроорганизмов становятся все более актуальными, поскольку некоторые из них не присутствуют в клетках млекопитающих и поэтому являются перспективными мишенями для создания новых антибиотиков.

Механизм многостадийной реакции γ -замещения, катализируемой ОАНС, является одним из самых сложных и неисследованных в ПЛФ-зависимом катализе превращений аминокислот. Первые очень ограниченные биохимические характеристики ОАНС были получены для ферментов, выделенных из *Neurospora* [3], *Saccharomyces cerevisiae* [4] и *Corynebacterium ethanolaminophilum* [5]. Большинство публикаций, в которых упомина-

Принятые сокращения: ПЛФ — пиридоксаль-5'-фосфат; ОАН — О-ацетил-L-гомосерин; ОАНС — О-ацетилгомосеринсульфидрилаза.

* Адресат для корреспонденции.

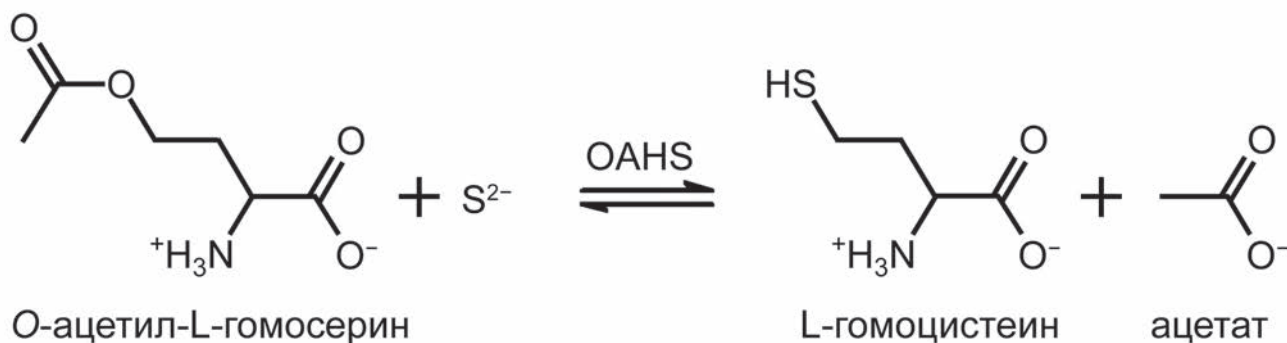


Рис. 1. Схема реакции γ -замещения, катализируемой *O*-ацетилгомосеринсульфгидрилазой

ются ОАHS, относится к исследованиям путей синтеза метионина в бактериях, грибах и дрожжах. Этот вопрос наиболее изучен для рода *Corynebacterium*, для некоторых бактерий которого были показаны два пути синтеза метионина [6]. Единственный путь прямого сульфгидрирования, обуславливающий важность ОАHS для микроорганизма, был установлен для *Pseudomonas aeruginosa* [7] и *Leptospira meyeri* [8]. В наших предыдущих работах мы также предположили, что в *C. difficile* и *Clostridium novyi* используется один путь биосинтеза метионина — путь прямого сульфгидрирования, в котором ОАHS играет ключевую роль [1, 2].

В настоящее время определены пространственные структуры ОАHS с доказанной субстратной специфичностью из *Thermus thermophilus* (PDB 1ULQ, 2CTZ) [9], *Wolinella succinogenes* (PDB 3RI6) [10, 11] и *Thermotoga maritima* (PDB 7KB0, 7KB1) [12]. Сравнение этих структур со структурами ПЛФ-зависимых ферментов, катализирующих реакции превращений серосодержащих аминокислот, показало, что ОАHS принадлежит к структурному классу I, подклассу цистатионин- β -лиазы [13]. Выравнивание аминокислотных последовательностей ОАHS и ферментов подкласса цистатионин- β -лиазы и анализ имеющихся пространственных структур выявили консервативность двух остатков тирозина их активных центров [1]. В структуре ОАHS из *T. maritima* остаток Tyr58, соответствующий остатку Tyr52 ОАHS из *C. difficile*, образует водородную связь с фосфатной группой ПЛФ, остаток Tyr107 находится в π -стекинге с пиридиновым кольцом ПЛФ, обеспечивая электроноакцепторные свойства кофактора. Остатки Tyr114 и Tyr113 метионин- γ -лиазы из *Pseudomonas putida* и *Citrobacter freundii*, гомологичные остатку Tyr107, предположительно, выполняют роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования γ -заместителя [14, 15].

Для остатка Tyr58 метионин- γ -лиазы из *C. freundii*, гомологичного остатку Tyr52 ОАHS, было сделано предположение, что он необходим для оптимального положения боковой аминогруппы каталитического ПЛФ-связывающего остатка Lys210 метионин- γ -лиазы на стадиях отрыва C- α - и C- β -протонов [16].

Целью настоящей работы было выяснение роли остатков Tyr52 и Tyr107 ОАHS из *C. difficile*. Для этого были сконструированы четыре плазмиды с геном ОАHS из *C. difficile*, содержащие единичные замены консервативных остатков тирозина активного центра на фенилаланин и аланин. Мутантные формы фермента были экспрессированы в клетках *E. coli*, получены очищенные препараты, проанализировано влияние замен на каталитические и спектральные свойства фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сайт-направленный мутагенез. Сайт-направленный мутагенез проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве матрицы использовали плазмиду, полученную клонированием гена ОАHS в вектор Bluescript II SK^(+/-) («Agilent», США). Последовательности праймеров, использованных для замены Tyr52Phe, Tyr52Ala, Tyr107Phe и Tyr107Ala («Синтол», Россия), представлены в табл. 1.

После проведения ПЦР из реакционных смесей выделяли ампликоны с использованием набора для выделения ДНК («Fermentas», Латвия). Очищенные препараты ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NcoI и XhoI и лигировали с плазмидой pET28a («Novagen», Германия), обработанным этими же ферментами. Полученные смеси трансформировали электропорацией в клетки *E. coli* DH10B и выращивали на твердой среде (1,8% (w/v) агар на среде Лурия—Бертани (LB)) с 50 мкг/мл канамицина. Выращенные колонии переносили

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для сайт-направленного мутагенеза

Вариант замены	Последовательность праймеров 5'→3'
Tyr52Phe	GGATTGCTTATTCTTGA <u>AA</u> ATATATGTCCATCAACTT
Tyr52Ala	GGATTGCTTATTCTTGA <u>TG</u> CTATATGTCCATCAACTT
Tyr107Phe	GTAATTTGAATGTTCTCCTC <u>CA</u> AACTTTTGAAGAACAAAGT
Tyr107Ala	GTAATTTGAATGTTCTCCTCCTG <u>C</u> TACTTTTGAAGAACAAAGT

Примечание. Кодоны, в которые были внесены замены, подчеркнуты.

в жидкую среду LB с добавлением канамицина и растили в течение 16–18 ч. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора для выделения плазмид («Thermo Scientific», США) и идентифицировали путем аналитической рестрикции. Фрагменты, содержащие замены, были переклонированы в плазмиду pET28a. Точность клонирования контролировали путем секвенирования вставок ДНК («Геном», Москва). Клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали плазмидами, содержащими вставки.

Выращивание бактериальной массы и очистка ферментов. Выращивание клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиды с генами мутантных форм, и очистку ферментов проводили, как описано ранее для фермента дикого типа [2]. Концентрацию очищенных препаратов фермента определяли по методу Бредфорда [17]. Гомогенность препаратов проверяли при помощи ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях [18].

Кинетические исследования. Реакцию γ -замещения, катализируемую ОАHS, проводили при 25 °С, как описано ранее [2]. Реакционная смесь (200 мкл) содержала 0,05 М K_2HPO_4 /0,05 М K_2HPO_4 (pH 7,5); 0,1 мМ ПЛФ; 10 мМ ОАН и 5 мМ Na_2S . Реакцию инициировали добавлением 10–100 мкг белка. Количество образовавшегося гомоцистеина рассчитывали по методу Kredich и Becker [19]. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль гомоцистеина в минуту.

Изотопный обмен C- α -протона субстрата в комплексах с ферментом. Кинетику реакции обмена C- α -протона ОАН на дейтерий, катализируемой мутантными формами, регистрировали при помощи ^1H -ЯМР-спектроскопии. Изотопный обмен протонов аминокислот проводили в 0,5 мл D_2O , содержащей 0,05 М калий-фосфат (pD = 7,1); 0,1 мМ ПЛФ; 100 мМ ОАН и 5 мкг фермента. Через 24 ч после инкубации при 25 °С фермент инактивировали нагреванием (90 °С, 5 мин) и отделяли центрифугированием при 9660 g (r_{cp} = 6 см) в течение

5 мин. Спектры ^1H -ЯМР записывали с использованием спектрометра Bruker AMXIII-400 («Bruker», США) с рабочей частотой 400 МГц. Сигналы C- α -протона аминокислоты интегрировали с помощью модифицированной программы автоматизации enzkim, входящей в состав программ XWIN_NMR.

Получение холоферментов и апоферментов. Для получения холофермента к раствору белка (10–20 мг/мл) в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) добавляли 50-кратный молярный избыток ПЛФ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Избыток ПЛФ удаляли диализом против буфера того же состава при +4 °С. Для получения апофермента к 0,2 мМ раствору белка в 0,05 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) добавляли 20 мМ раствор D, L-пенициллина. Раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, затем избыток D, L-пенициллина удаляли диализом при +4 °С против буфера того же состава.

Спектральные исследования. Для получения спектров поглощения мутантных форм холоферментов и их комплексов с ингибиторами использовали спектрофотометр Cary-50 («Varian», США). Спектры регистрировали в 0,1 М калий-фосфатном буфере (pH 7,5) при концентрации фермента 0,5–2 мг/мл и 100 мМ L-метионина или D, L-пропаргилглицина. Содержание ПЛФ в холоферментах определяли, используя коэффициент поглощения ПЛФ $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ в 0,1 М NaOH при 390 нм [20]. Для определения ионного состояния внутренних альдиминов мутантных форм спектры поглощения были разложены методом логнормального разложения на полосы отдельных электронных переходов их таутомеров и конформеров [21].

Определение константы диссоциации (K_d) комплекса фермента с ПЛФ. К растворам апофермента (0,02 мМ) в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 1 мМ ДТТ, добавляли аликвоты раствора ПЛФ (0,2–200 мМ). После 30 мин инкубации при 30 °С

растворы помещали в центрифужный концентратор (30 000 Da, «Sartorius», Германия) и центрифугировали при 2795 g ($r_{cp} = 10$ см) в течение 5 мин для освобождения от несвязанного ПЛФ. Содержание ПЛФ в холоферментах определяли, как описано выше. Полученные данные обрабатывали в координатах Скэтчарда [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кинетические исследования. Замена остатков тирозина активного центра ОАНС привела к значительным изменениям каталитических параметров фермента. Мутантные формы с заменой Tyr52 катализировали реакцию γ -замещения ОАН со скоростями, более чем на три порядка меньшими, чем фермент дикого типа, значения K_m ОАН увеличились в несколько раз (табл. 2). Для мутантных форм Tyr107Phe и Tyr107Ala не удалось обнаружить образование L-гомоцистеина, продукта реакции γ -замещения. При инкубации мутантных форм с ОАН в D₂O в спектрах ¹H-ЯМР наблюдалось уменьшение интенсивности сигнала C- α -протона субстрата (табл. 2), что свидетельствовало о том, что мутантные формы связывали субстрат и катализировали отрыв C- α -протона из внешнего альдимида.

Сродство к кофактору. Ухудшение сродства к кофактору наблюдалось во всех мутантных формах: величина константы диссоциации комплекса фермента с ПЛФ (K_d) увеличилась на три порядка по сравнению с величиной, полученной для фермента дикого типа (табл. 3).

Спектральные исследования. В спектрах поглощения холоферментов Tyr107Phe, Tyr107Ala, Tyr52Phe и Tyr52Ala имеются полосы поглощения с максимумами в области 325–340 нм и 410–416 нм, которые при данных условиях эксперимента (pH 7,5) могут соответствовать одному из ионных состояний внутреннего альдимида — катионному или нейтральному (рис. 2). Для определения ионного состояния внутреннего альдимида мутантных форм было применено логнормальное разложение спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам альдимин-ПЛФ с аминокислотами, используя две модели: катионную и нейтральную (рис. 2). Основным критерием корректности использованных моделей для описания спектров было соответствие количества таутомеров и конформеров количеству связанного ПЛФ. Анализ данных разложения спектров поглощения всех четырех мутантных форм показал, что при использовании нейтральной модели количество ПЛФ, связанного с ферментом, соответствует суммарному количеству найденных таутомеров и конформеров. Поэтому для разложения спектров поглощения холоферментов всех четырех мутантных форм нейтральная модель является наиболее адекватной, и, следовательно, внутренний альдимин в активных центрах мутантных ферментов находится в нейтральной форме, содержащей таутомеры III, IV, V, и конформеры форм III и V. На рис. 3 представлено разложение спектров поглощения мутантных форм холофермента при pH 7,5 в соответствии с нейтральной моделью.

Таблица 2. Кинетические параметры реакции γ -замещения ОАН

Фермент	K_m , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_m , M ⁻¹ ·c ⁻¹	Степень обмена C- α -протона ОАН в D ₂ O за 24 ч
Tyr52Phe	4,4 ± 0,3	0,05 ± 0,003	11	40%
Tyr52Ala	3,2 ± 0,2	0,06 ± 0,003	19	50%
Tyr107Phe	н/о	н/о	н/о	35%
Tyr107Ala	н/о	н/о	н/о	20%
Дикий тип*	0,60 ± 0,05	94,12 ± 1,88	1,6 × 10 ⁵	90%

Примечание. * Литературные данные [2]. н/о — не определено.

Таблица 3. Сродство фермента к ПЛФ

Параметры	ОАНС дикого типа*	Tyr52Phe	Tyr52Ala	Tyr107Phe	Tyr107Ala
K_d , M	(1,3 ± 0,1) × 10 ⁻⁵	(2,7 ± 0,2) × 10 ⁻²	(2,9 ± 0,2) × 10 ⁻²	(1,6 ± 0,1) × 10 ⁻²	(1,4 ± 0,1) × 10 ⁻²
ΔG , ккал/моль	-6,64	-2,13	-2,06	-2,44	-2,51

Примечание. * Литературные данные [2].

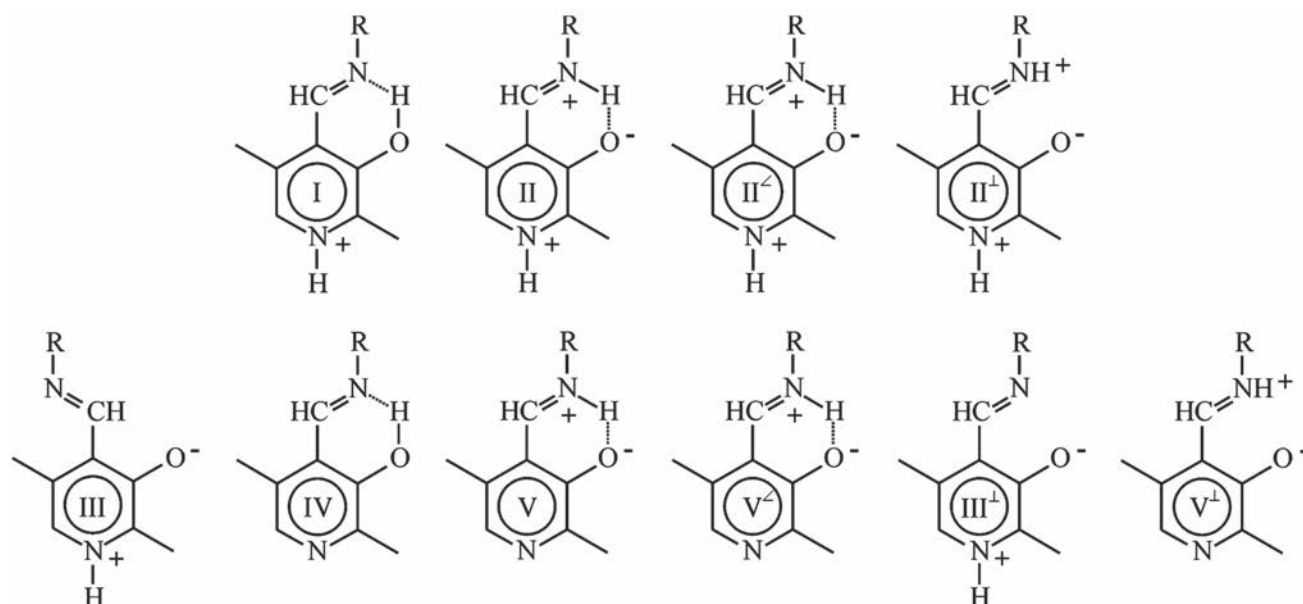


Рис. 2. Ионные формы внутреннего альдимины. I–II – структуры, относящиеся к катионной форме кофактора, III–V – структуры, относящиеся к нейтральной форме кофактора. Обозначение структур II⁺ и V⁺ относится к конформерам соответствующих ионных форм, у которых альдиминная группа частично выведена из плоскости пиридинового цикла, но при этом сохраняется водородная связь с атомом кислорода пиридинового кольца. Структуры II⁺, III⁺ и V⁺ обозначают конформеры с альдиминной группой, полностью выведенной из сопряжения с пиридиновым циклом

Экспериментальные параметры полос поглощения таутомерных и конформерных структур представлены в табл. 4.

Для четырех мутантных форм сняты спектры поглощения комплексов с ингибиторами фермента дикого типа L-метионином и D, L-пропаргилглицином. На рис. 4 приведены спектры для Tyr52Ala мутантной формы фермента в сравнении со спектрами фермента дикого типа. Спектры поглощения для остальных мутантных форм имели аналогичный вид.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ионное состояние внутренних альдиминов в мутантных формах. В спектрах поглощения мутантных холоферментов ОАНС при pH 7,5 наблюдались полосы в областях 330 нм и 416 нм, характерные для внутренних альдиминов ПЛФ-зависимых ферментов (рис. 3). Первой стадией любой реакции, катализируемой ПЛФ-зависимыми ферментами, является образование внешнего альдимины, как результат трансальдиминирования между внутренним альдииминном и аминокислотой-субстратом. Знание того, в какой ионной и таутомерной форме находится внутренний альдимин, необходимо для понимания механизма реакции. С этой целью было проведено разложение спектров поглощения на полосы, соответствующие отдельным электронным переходам альдими-

нов ПЛФ с аминокислотами. Как нами было показано ранее, внутренний альдимин ОАНС дикого типа находится в катионной форме [2], содержащей два таутомера – кетонамин (структура II) и енолимин (структура I), а также два конформера кетонамина (структуры II⁺ и II⁺) (рис. 2). Наши результаты позволяют сделать вывод, что внутренние альдимины мутантных форм ОАНС при pH 7,5 существуют в виде нейтральной формы с преобладанием кетонамина V, у которого атом пиридинового азота депротонирован. В ферменте дикого типа активной формой является кетонамин II с положительно заряженным атомом пиридинового азота, электроноакцепторные свойства которого облегчают нуклеофильную атаку аминокислоты субстрата на C4'-атом кофермента. У нейтрального кетонамина V отсутствует положительный заряд на атоме пиридинового азота, поэтому он обладает меньшей реакционной способностью к образованию внешнего альдимины по сравнению с кетонамином II.

Взаимодействие с ингибиторами. Для фермента дикого типа было показано ингибирование реакции конечным продуктом биосинтетического пути – L-метионином, и специфическим ингибитором ПЛФ-зависимых ферментов, участвующих в метаболизме цистеина и метионина – D, L-пропаргилглицином [2]. Значительное снижение скорости реакции, катализируемой мутантными фор-

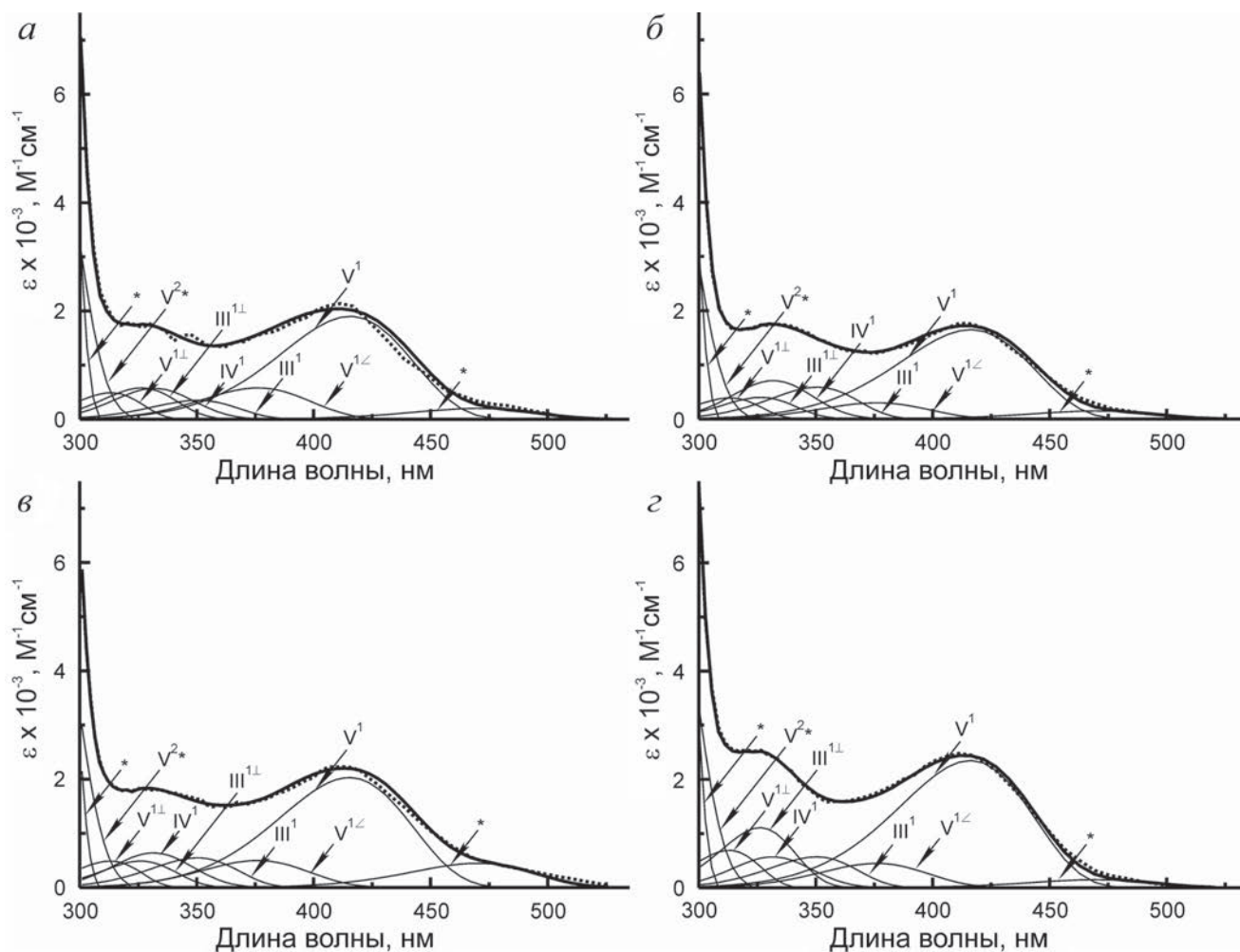


Рис. 3. Разложение спектров поглощения внутренних альдиминов мутантных форм ОАHS (*а* – Tyr107Phe; *б* – Tyr107Ala; *в* – Tyr52Phe; *г* – Tyr52Ala) при pH 7,5 на полосы отдельных электронных переходов их таутомеров и конформеров: точки – экспериментальные данные, жирные линии – расчетные данные, тонкие линии – полосы, соответствующие отдельным электронным переходам. Обозначение структур соответствует данным рис. 2 и табл. 4. Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам соответствующих структур. Надстрочный индекс ($\perp$) относится к конформеру структуры V, у которого альдиминная группа частично выведена из сопряжения с пиридиновым циклом, но сохраняется водородная связь между альдиминным атомом азота и оксигруппой кофактора. Надстрочный индекс ($\angle$) относится к конформерам структур III и V, у которых альдиминная группа полностью выведена из сопряжения с пиридиновым циклом и находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового кольца. Полосы, о которых нет или недостаточно информации, указаны стрелками, помеченными * и V^{2*} .

мами ОАHS, не позволило провести исследование ингибирования реакции γ -замещения этими ингибиторами. Спектральные характеристики комплексов мутантных форм с ингибиторами (рис. 4) в основном сходны с характеристиками, полученными для фермента дикого типа [2]. Уменьшение максимума поглощения в области 416 нм и увеличение поглощения в области 330 нм в комплексах мутантных форм с L-метионином и D, L-пропаргилглицином, скорее всего, свидетельствует об изменении равновесия между таутомерными формами внешнего альдимины (рис. 5). Кроме того, в этой области могут поглощать промежуточные продукты реакции с тетраэдрическим C4'-атомом углерода (рис. 6, интермедиаты 4 и 5).

Каталитические свойства мутантных ферментов. ПЛФ-зависимые ферменты, участвующие в биосинтезе метионина в бактериях, образуют эволюционно родственное семейство [23] и имеют много общего в строении активных центров и механизмах катализируемых реакций [13, 24]. На рис. 6 представлен предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАHS. После образования внешнего альдимины между коферментом и субстратом происходит отрыв C- α -протона с образованием хиноидного интермедиата, затем – протонирование C4'-атома кофактора с образованием кетимина. Дальнейший отрыв C- β -протона приводит к отщеплению ацетильной группы субстрата. Присоединение сульфид-

Таблица 4. Параметры, полученные при разложении спектров поглощения мутантных форм ОАHS на полосы отдельных переходов

Мутантная форма ОАHS	Структуры	E (эВ)	$\nu \times 10^{-3}$ (см $^{-1}$)	λ (нм)	$\epsilon \times 10^{-3}$ (М $^{-1}$ ·см $^{-1}$)	$W \times 10^{-3}$ (см $^{-1}$)	ρ	f	n (%)
Tyr107Phe	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,06	415,5	1,90	3,95	1,50	0,07	24
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,65	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,35	3,65	1,45	0,01	3
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,57	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,58	3,53	1,36	0,02	7
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,49	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,00	4,78	1,32	0,30	
	*	4,44	35,81	279,3	25,20	4,30	1,56	0,98	
Tyr107Ala	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,02	416,3	1,65	4,00	1,53	0,06	21
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,30	3,87	1,37	0,01	4
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,59	3,65	1,45	0,02	6
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,71	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,40	3,53	1,36	0,01	3
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,39	3,47	1,47	0,01	4
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	6,20	4,78	1,32	0,26	
	*	4,44	35,81	279,3	23,50	4,30	1,56	0,91	
Tyr52Phe	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,06	415,5	2,03	3,95	1,50	0,07	24
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,50	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,55	3,65	1,45	0,02	6
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,64	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	0,49	3,53	1,36	0,02	7
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,49	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,20	4,78	1,32	0,31	
	*	4,44	35,81	279,3	22,20	4,30	1,56	0,87	
Tyr52Ala	V ¹ (кетонамин)	2,98	24,02	416,3	2,35	4,00	1,53	0,08	28
	V ^{1z} (кетонамин)	3,30	26,58	376,2	0,45	3,87	1,37	0,02	8
	III ¹ (енолимин)	3,54	28,53	350,5	0,57	3,65	1,45	0,02	7
	IV ¹ (кетонамин)	3,74	30,14	331,8	0,57	3,68	1,22	0,02	10
	III ^{1⊥} (енолимин)	3,80	30,64	326,4	1,11	3,53	1,36	0,03	10
	V ^{1⊥}	3,96	31,92	313,3	0,69	3,47	1,47	0,02	8
	V ^{2*}	4,40	35,49	281,8	7,40	4,78	1,32	0,31	
	*	4,44	35,81	279,3	23,80	4,30	1,56	0,92	

Примечание. * Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры V. Надстрочный индекс (z) относится к конформеру структуры V, у которого альдиминная группа частично выведена из сопряжения с пиридиновым циклом, но сохраняется водородная связь между альдиминным атомом азота и окси группой кофермента. Надстрочный индекс (⊥) относятся к конформерам структур III и V, у которых альдиминная группа полностью выведена из сопряжения с пиридиновым циклом и находится в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла.

E — энергия электронного перехода; ν — волновое число; λ — длина волны; ϵ — коэффициент молярного поглощения; W — полуширина; ρ — асимметрия; f — сила осциллятора; n % — содержание таутомеров и конформеров, соответствующее содержанию ПЛФ в растворах мутантных ферментов: Tyr107Phe, Tyr107Ala, Tyr52Phe, Tyr52Ala — 60%, 48%, 63%, 71% соответственно.

иона к β, γ -ненасыщенному кетимину и последующий перенос протонов приводят к образованию второго хиноидного интермедиата, C- α -положение которого протонируется с образованием продукта. Протекание реакции должно обеспечиваться путем вовлечения каталитического основания на стадиях отрыва C- α - и C- β -протонов субстрата и кислотного

катализа на стадии элиминирования γ -заместителя.

Замена остатков Tyr52 и Tyr107 существенно повлияла на ионное состояние кофермента в активном центре, что отразилось на эффективности катализа реакции γ -замещения. Снижение эффективности катализа реакции (k_{cat}/K_m) мутантными формами Tyr52Phe

и Tyr52Ala более чем на три порядка является главным образом результатом уменьшения скорости реакции, а также снижения сродства мутантных форм фермента к субстрату (табл. 2). Скорость обмена C- α -протона в комплексах мутантных форм фермента с субстратом уменьшилась по сравнению с ферментом дикого типа (табл. 2). В метионин- γ -лиазе гомологичный остаток Tyr58 обеспечивает оптимальное положение каталитического остатка Lys210 на стадии отрыва C- α -протона [16]. Полученные данные могут свидетельствовать о сходной роли остатка Tyr52 в ОАНС.

Поскольку мутантные формы Tyr107Phe и Tyr107Ala не катализируют образование гомоцистеина в реакции γ -замещения, но катализируют обмен C- α -протона ОАН на дейтерий, мы предполагаем, что остаток Tyr107 может выполнять функцию кислотного катализатора

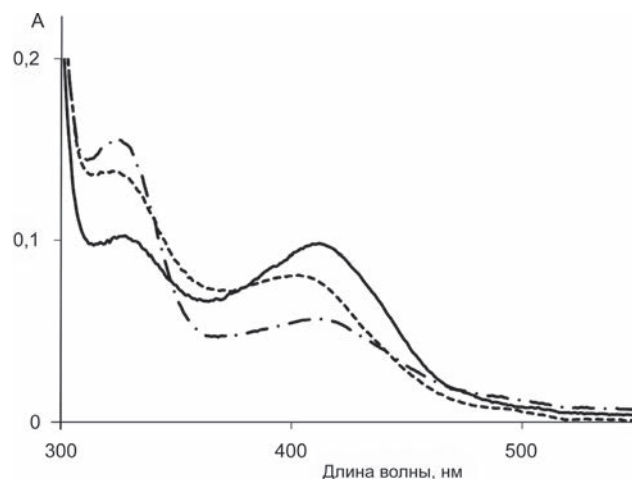


Рис. 4. Спектры поглощения комплексов Tyr52Ala мутантной формы ОАНС с ингибиторами в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,5). Холофермент — непрерывная линия, комплекс с L-метионином — штриховая линия, комплекс с D, L-пропаргилглицином — пунктирная линия

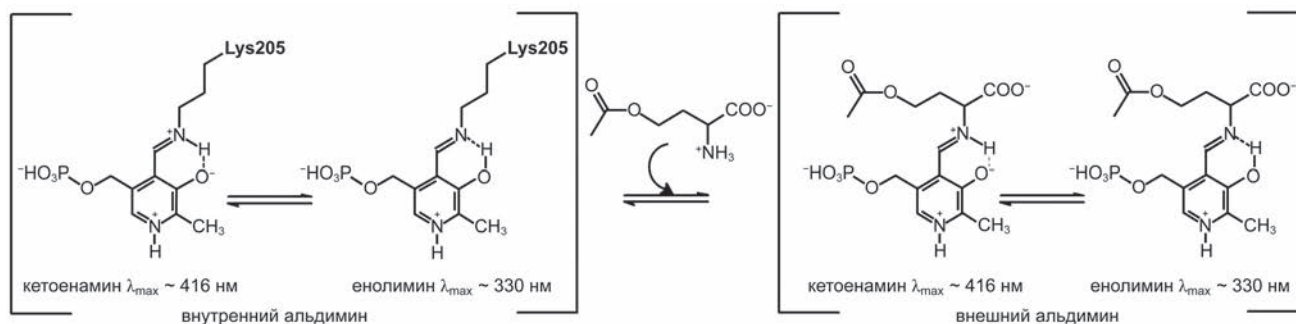


Рис. 5. Равновесие таутомерных форм внутреннего и внешнего альдиминов ОАНС

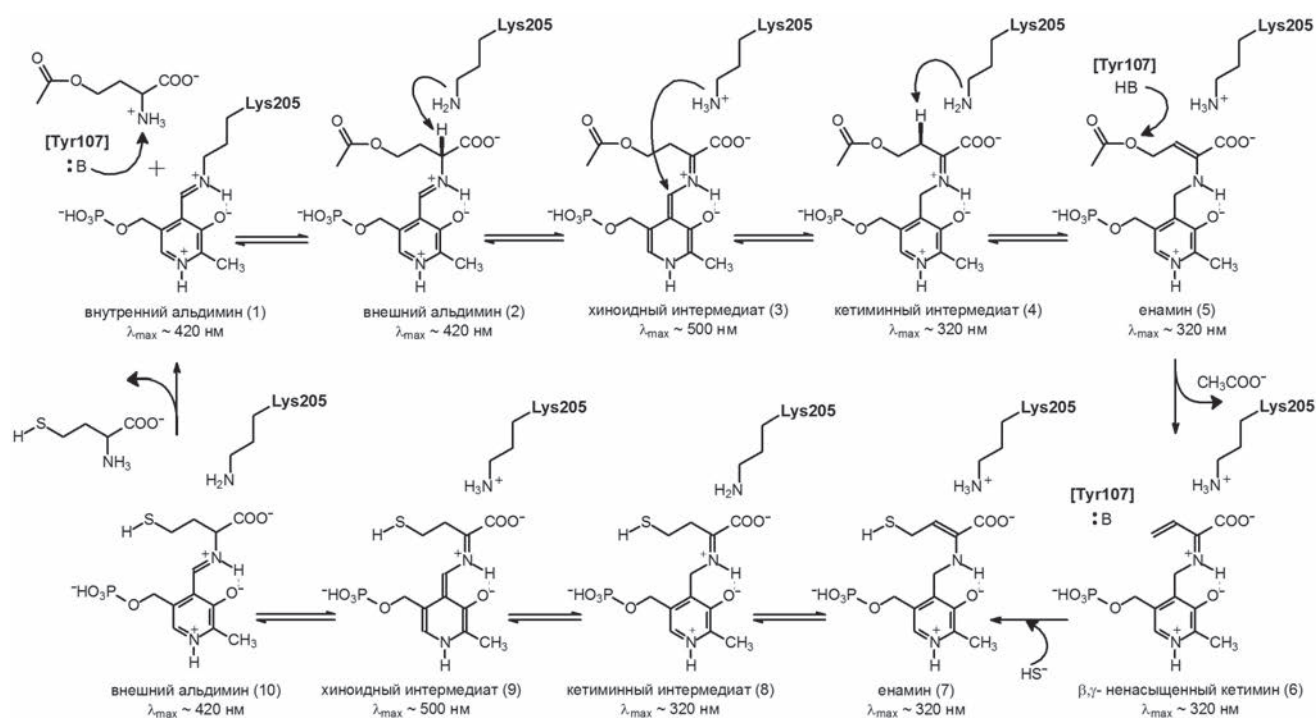


Рис. 6. Предполагаемый механизм реакции γ -замещения, катализируемой ОАНС, согласно данным Brzović et al. [24]

на стадии элиминирования ацетата в OASH из *C. difficile*. Наши данные согласуются с выводами, сделанными для этого консервативного остатка в ферментах подкласса цистатионин-β-лиазы, в которых он был предложен в качестве общего кислотного катализатора на стадии элиминирования заместителя [14, 15, 25]. Помимо того, что стэкинг-взаимодействие ароматической группы остатка Tyr107 с пиридиновым кольцом ПЛФ обеспечивает стабилизацию положения кофермента в активном центре, дестабилизация кофактора при заменах Tyr107 привела, как свидетельствуют данные разложения спектра поглощения холофермента мутантной формы, к нарушению водородной связи пиридинового атома азота ПЛФ с боковой группой Asp180, которая обеспечивает электроноакцепторные свойства кофермента. Данный остаток Asp является строго консервативным в ПЛФ-зависимых ферментах структурного класса I и играет ключевую роль в стабилизации положительного заряда атома азота пиридинового кольца, что увеличивает отток электронов во внешнем и внутреннем альдимидах к атому азота пиридинового фрагмента кофермента. Нарушение связи карбоксильной группы Asp с N1-атомом ПЛФ должно приводить к понижению нуклеофильности C4'-атома внутреннего и внешнего альдимидов и, следовательно, к замедлению стадии трансальдиминирования и уменьшению кислотности C-α-протона внешнего альдимида, образуемых мутантными формами Tyr107Ala и Tyr107Phe.

Влияние замены остатков тирозина на связывание кофактора. Значения K_d , полученные для мутантных форм Tyr52Ala и Tyr52Phe, оказались на три порядка выше, чем для фермента дикого типа (табл. 3). Уменьшение сродства к кофактору соответствует разнице ~4,5 ккал/моль в свободной энергии связывания ПЛФ между мутантными формами и ферментом дикого типа (табл. 3). Эта величина соответствует энергии водородной связи между заряженным и нейтральными атомами [26], то есть между анионом фосфатной группы кофермента и гидроксильной группой остатка Tyr52 OASH.

В мутантных формах Tyr107Ala и Tyr107Phe сродство к кофактору также уменьшилось на три порядка по сравнению с ферментом дикого типа, значения ΔG снизились на 4,1–4,2 ккал/моль (табл. 3). Такая значительная разница в свободной энергии по сравнению с ферментом дикого типа может объясняться отсутствием водородной связи между атомом азота пиридинового кольца кофактора и карбоксильной группой остатка Asp180. Отсутствие водородной связи и электростатического взаимодей-

ствия консервативного в ферментах структурного класса I остатка аспарагиновой кислоты с положительно заряженным атомом азота пиридинового кольца кофермента в мутантных формах тирозин-фенол-лиазы и аспартатамино-трансферазы с заменой аспарагиновой кислоты также приводило к значительному снижению сродства кофактора с аналогичной разницей в свободной энергии связывания [27, 28]. Аналогичная замена Tyr114 на Phe в C-S-лиазе из *Corynebacterium diphtheriae* вызвала только 16-кратное снижение сродства к ПЛФ (разница в свободной энергии — 1,6 ккал/моль), что позволило авторам сделать предположение о незначительном влиянии данной замены на стэкинг с пиридиновым фрагментом кофактора [29]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что остатки Tyr52 и Tyr107 стабилизируют положение кофактора в активном центре OASH из *C. difficile*.

Таким образом, замена одной аминокислоты во всех четырех мутантных формах, вероятно, не привела к кардинальному изменению общей структуры фермента, что следует из данных по обмену C-α-протона, показавших, что образуется комплекс мутантных форм фермента с субстратом. В пользу данного утверждения свидетельствуют также спектры поглощения мутантных форм с аналогами субстрата. На основании полученных данных было сделано предположение, что остаток Tyr52 участвует в обеспечении оптимального положения каталитического кофактор-связывающего остатка лизина на стадиях отрыва C-α-протона и элиминирования боковой группы субстрата, а остаток Tyr107 может выполнять роль общего кислотного катализатора на стадии элиминирования ацетата.

Вклад авторов. В.В. Куликова проводила кинетические и спектральные исследования, писала статью; С.В. Ревтович выделяла ферменты; А.Д. Лыфенко выращивала биомассу; Е.А. Морозова делала мутагенез; В.С. Коваль проводил исследования реакции изотопного обмена; Н.П. Бажулина анализировала спектры методом логнормального разложения; Т.В. Демидкина координировала все работы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00255).

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

- Kulikova, V. V., Anufrieva, N. V., Kotlov, M. I., Morozova, E. A., Koval, V. S., Belyi, Y. F., Revtovich, S. V., and Demidkina, T. V. (2021) *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase from *Clostridium novyi*. Cloning, expression of the gene and characterization of the enzyme, *Protein Expr. Purif.*, **180**, 105810, doi: 10.1016/j.pep.2020.105810.
- Kulikova, V. V., Revtovich, S. V., Bazhulina, N. P., Anufrieva, N. V., Kotlov, M. I., Koval, V. S., Morozova, E. A., Hayashi, H., Belyi, Y. F., and Demidkina, T. V. (2019) Identification of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, a putative enzyme responsible for methionine biosynthesis in *Clostridioides difficile*: Gene cloning and biochemical characterizations, *IUBMB Life*, **71**, 1815-1823, doi: 10.1002/iub.2139.
- Kerr, D. S. (1971) *O*-Acetylhomoserine sulfhydrylase from *Neurospora*. Purification and consideration of its function in homocysteine and methionine synthesis, *J. Biol. Chem.*, **246**, 95-102, doi: 10.1016/S0021-9258(18)62537-2.
- Yamagata, S. (1971) Homocysteine synthesis in yeast. Partial purification and properties of *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, *J. Biochem.*, **70**, 1035-1045, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a129712.
- Murooka, Y., Kakiyama, K., Miwa, T., Seto, K., and Harada, T. (1977) *O*-alkylhomoserine synthesis catalyzed by *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase in microorganisms, *J. Bacteriol.*, **130**, 62-73, doi: 10.1128/jb.130.1.62-73.1977.
- Lee, H., and Hwang, B. (2003) Methionine biosynthesis and its regulation in *Corynebacterium glutamicum*: parallel pathways of transsulfuration and direct sulfhydrylation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 459-467, doi: 10.1007/s00253-003-1306-7.
- Fogliano, M., Borne, F., Bally, M., Ball, G., and Patte, J. (1995) A direct sulfhydrylation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiology*, **141**, 431-439, doi: 10.1099/13500872-141-2-431.
- Belfaiza, J., Martel, A., Margarita, D., and Saint Girons, I. (1998) Direct sulfhydrylation for methionine biosynthesis in *Leptospira meyeri*, *J. Bacteriol.*, **180**, 250-255, doi: 10.1128/jb.180.2.250-255.
- Shimizu, H., Yamagata, S., Masui, R., Inoue, Y., Shibata, T., Yokoyama, S., Kuramitsu, S., and Iwama, T. (2001) Cloning and overexpression of the *oah1* gene encoding *O*-acetyl-L-homoserine sulfhydrylase of *Thermus thermophilus* HB8 and characterization of the gene product, *Biochim. Biophys. Acta*, **1549**, 61-72, doi: 10.1016/S0167-4838(01)00245-X.
- Krishnamoorthy, K., and Begley, T. P. (2011) Protein thiocarboxylate-dependent methionine biosynthesis in *Wolinella succinogenes*, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 379-386, doi: 10.1021/ja107424t.
- Tran, T. H., Krishnamoorthy, K., Begley, T. P., and Ealick, S. E. (2011) A novel mechanism of sulfur transfer catalyzed by *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase in the methionine-biosynthetic pathway of *Wolinella succinogenes*, *Acta Cryst.*, **D67**, 831-838, doi: 10.1107/S0907444911028010.
- Brewster, J. L., Pachl, P., McKellar, J. L., Selmer, M., Squire, C. J., and Patrick, W. M. (2021) Structures and kinetics of *Thermotoga maritima* MetY reveal new insights into the predominant sulfurylation enzyme of bacterial methionine biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100797, doi: 10.1016/j.jbc.2021.100797.
- Messerschmidt, A., Worbs, M., Steegborn, C., Wahl, M. C., Huber, R., Laber, B., and Clausen, T. (2003) Determinants of enzymatic specificity in the Cys-Met-metabolism PLP-dependent enzymes family: crystal structure of cystathionine γ -lyase from yeast and intrafamilial structure comparison, *Biol. Chem.*, **384**, 373-386, doi: 10.1515/BC.2003.043.
- Inoue, H., Inagaki, K., Adachi, N., Tamura, T., Esaki, N., Soda, K., and Tanaka, H. (2000) Role of tyrosine 114 of L-methionine gamma-lyase from *Pseudomonas putida*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2336-2343, doi: 10.1271/bbb.64.2336.
- Revtovich, S. V., Faleev, N. G., Morozova, E. A., Anufrieva, N. V., Nikulin, A. D., and Demidkina, T. V. (2014) Crystal structure of the external aldimine of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase with glycine provides insight in mechanisms of two stages of physiological reaction and isotope exchange of α - and β -protons of competitive inhibitors, *Biochimie*, **101**, 161-167, doi: 10.1016/j.biochi.2014.01.007.
- Anufrieva, N. V., Faleev, N. G., Morozova, E. A., Bazhulina, N. P., Revtovich, S. V., Timofeev, V. P., Tkachev, Y. V., Nikulin, A. D., and Demidkina, T. V. (2015) The role of active site tyrosine 58 in *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1854**, 1220-1228, doi: 10.1016/j.bbapap.2014.12.027.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- 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.
- Kredich, N. M., and Becker, M. A. (1971) Cysteine biosynthesis: serine transacetylase and *O*-acetylserine sulfhydrylase, *Methods Enzymol.*, **17 B**, 459-470, doi: 10.1016/0076-6879(71)17082-6.
- Peterson, E. A., and Sober, H. A. (1954) Preparation of crystalline phosphorylated derivatives of vitamin B6, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 169-175, doi: 10.1021/ja01630a045.

21. Bazhulina, N. P., Morozov, Y. V., Papisova, A. I., and Demidkina, T. V. (2000) Pyridoxal 5'-phosphate schiff base in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase. Ionic and tautomeric equilibria, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 1830-1836, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01185.x.
22. Scatchard, G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions, *Ann. NY Acad. Sci.*, **51**, 660-672, doi: 10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x.
23. Käck, H., Sandmark, J., Gibson, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1999) Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes, *J. Mol. Biol.*, **291**, 857-876, doi: 10.1006/jmbi.1999.2997.
24. Brzović, P., Holbrook, E. L., Greene, R. C., and Dunn, M. F. (1990) Reaction mechanism of *Escherichia coli* cystathionine gamma-synthase: direct evidence for a pyridoxamine derivative of vinylglyoxylate as a key intermediate in pyridoxal phosphate dependent gamma-elimination and gamma-replacement reactions, *Biochemistry*, **29**, 442-451, doi: 10.1021/bi00454a020.
25. Steegborn, C., Laber, B., Messerschmidt, A., Huber, R., and Clausen, T. (2001) Crystal structures of cystathionine γ -synthase inhibitor complexes rationalize the increased affinity of a novel inhibitor, *J. Mol. Biol.*, **311**, 789-801, doi: 10.1006/jmbi.2001.4880.
26. Fersht, A. R., Shi, J. P., Knill-Jones, J., Lowe, D. M., Wilkinson, A. J., Blow, D. M., Brick, P., Carter, P., Waye, M. M., and Winter, G. (1985) Hydrogen bonding and biological specificity analysed by protein engineering, *Nature*, **314**, 235-238, doi: 10.1038/314235a0.
27. Yano, T., Kuramitsu, S., Tanase, S., Morino, Y., and Kagamiyama, H. (1992) Role of Asp222 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase: the amino acid residue which enhances the function of the enzyme-bound coenzyme pyridoxal 5'-phosphate, *Biochemistry*, **31**, 5878-5887, doi: 10.1021/bi00140a025.
28. Demidkina, T. V., Faleev, N.G., Papisova, A. I., Bazhulina, N. P., Kulikova, V. V., Gollnick, P.D., and Phillips, R. S. (2006) Aspartic acid 214 in *Citrobacter freundii* tyrosine phenol-lyase ensures sufficient C-H-acidity of the external aldimine intermediate and proper orientation of the cofactor at the active site, *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 1268-1276, doi: 10.1016/j.bbapap.2006.05.001.
29. Astegno, A., Allegrini, A., Piccoli, S., Giorgetti, A., and Dominici, P. (2015) Role of active-site residues Tyr55 and Tyr114 in catalysis and substrate specificity of *Corynebacterium diphtheriae* C-S lyase, *Proteins*, **83**, 78-90, doi: 10.1002/prot.24707.

***O*-ACETYLMOMOSERINE SULFHYDRYLASE FROM *Clostridioides difficile*: THE ROLE OF TYROSINE RESIDUES OF THE ACTIVE CENTER**

**V. V. Kulikova*, S. V. Revtovich, A. D. Lyfenko, E. A. Morozova,
V. S. Koval, N. P. Bazhulina, and T. V. Demidkina**

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia; e-mail: vitviku@yandex.ru*

O-acetylhomoserine sulfhydrylase is one of the key enzymes in the biosynthesis of methionine in *Clostridioides difficile*. The mechanism of the γ -substitution reaction of *O*-acetyl-L-homoserine catalyzed by this enzyme is the least studied among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes involved in the metabolism of cysteine and methionine. To clarify the role of the active site residues Tyr52 and Tyr107, four mutant forms of the enzyme with replacements for phenylalanine and alanine were obtained. The catalytic and spectral properties of mutant forms were investigated. The rate of the γ -substitution reaction catalyzed by mutant forms with the replacement of the Tyr52 residue decreased by more than three orders of magnitude compared to the wild-type enzyme. Tyr107Phe and Tyr107Ala mutant forms practically did not catalyze this reaction. Replacements of the residues Tyr52 and Tyr107 led to a decrease in the affinity of the apoenzyme to the coenzyme by three orders of magnitude and changes in the ionic state of the internal aldimine of the enzyme. The obtained results allowed us to assume that Tyr52 is involved in ensuring the optimal position of the catalytic coenzyme-binding lysine residue at the stages of C- α -proton elimination and elimination of the side group of the substrate. Tyr107 can act as a general acid catalyst at the stage of acetate elimination.

Keywords: *O*-acetylhomoserine sulfhydrylase, pyridoxal-5'-phosphate, γ -substitution reaction, site-directed mutagenesis

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ *NEFL* НА ТЕПЛОВУЮ ДЕНАТУРАЦИЮ БЕЛКА ЛЁГКОЙ ЦЕПИ НЕЙРОФИЛАМЕНТОВ

© 2023 В.В. Нефёдова^{1*}, Д.С. Ямпольская¹, С.Ю. Клейменов^{1,2},
Н.А. Чеботарева¹, А.М. Матюшенко¹, Д.И. Левицкий¹

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071 Москва, Россия; электронная почта: victoria.v.nefedova@mail.ru

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия

Поступила в редакцию 04.01.2023

После доработки 02.03.2023

Принята к публикации 02.03.2023

Проведено исследование влияния аминокислотных замен E90K, N98S и A149V на структуру и тепловую денатурацию молекулы белка лёгкой цепи нейрофиламентов (NFL). Методом кругового дихроизма показано, что данные замены не приводят к изменению в спиральной структуре NFL, однако оказывают заметное влияние на стабильность молекулы. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии были идентифицированы калориметрические домены в структуре NFL и показано, что внесение замены E90K приводит к исчезновению низкотемпературного теплового перехода (домен 1). Внесение всех аминокислотных замен приводит к изменениям энтальпии плавления доменов NFL, а также к существенным изменениям температуры плавления некоторых калориметрических доменов. Таким образом, несмотря на то что все указанные аминокислотные замены, вызванные мутациями в гене *NEFL*, связаны с развитием нейропатии Шарко–Мари–Тута, а две из них даже располагаются очень близко друг к другу в суперспиральном участке 1A, они оказывают различное влияние на структуру и стабильность молекулы NFL.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: промежуточные филаменты, нейрофиламенты, суперспиральные белки, спектроскопия кругового дихроизма, дифференциальная сканирующая калориметрия.

DOI: 10.31857/S0320972523050044, EDN: AXKJLT

ВВЕДЕНИЕ

Промежуточные филаменты (ПФ) являются важным компонентом цитоскелета, наравне с микротрубочками и микрофиламентами. Для человека описано около 70 генов, кодирующих белки ПФ [1, 2]. Все белки семейства ПФ имеют сходные черты строения, в частности – наличие центрального α -спирального домена (так называемый rod-домен). Для структуры ПФ характерны общие черты строения: наличие трёх α -спиральных участков (1A, 1B и 2), участвующих в образовании суперспиральных (coiled-coil) доменов, разделённых α -спиральными линкерными участками, которые не вовлечены в образование coiled-

coil [3, 4]. За образование суперспиральных участков отвечает rod-домен ПФ, первичная структура которого организована в гептадные повторы, в которых аминокислотные остатки обозначаются латинскими буквами *a–g*. При этом в положениях *a* и *d* часто находятся гидрофобные остатки, участвующие в образовании гидрофобного кора, что позволяет rod-доменам образовывать структуру coiled-coil. Димеры ПФ взаимодействуют антипараллельно и образуют тетрамер [3, 4]. Процесс полимеризации ПФ от димеров до зрелых филаментов проходит в три этапа [5–7]. На первом этапе происходит быстрое образование тетрамеров ПФ, затем за счёт латеральных взаимодействий происходит их сборка в ULF-частицы

Принятые сокращения: ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия; КД – круговой дихроизм; нейропатия ШМТ – нейропатия Шарко–Мари–Тута; ПФ – промежуточные филаменты; ΔH_{cal} – калориметрическая энтальпия; NFL, NFM и NFN – белки лёгкой, средней и тяжёлой цепей нейрофиламентов; NFL WT – белок NFL дикого типа; T_m – температура максимума теплового перехода; ULF – нити единичной длины, единичные протофиламенты.

* Адресат для корреспонденции.

(Unit Length Filaments, нити единичной длины) или единичные протофиламенты, диаметр которых превышает 10 нм, и, наконец, на последнем этапе происходит удлинение филаментов, их компактизация и уменьшение диаметра до стандартных 10 нм [7]. Принципы организации белков семейства ПФ в целом универсальны, однако для отдельных его представителей характерны уникальные свойства. Так, например, ламины не способны к латеральной полимеризации. Ввиду сложной организации белковых комплексов ПФ точечные аминокислотные замены даже в одном домене могут приводить к серьёзным изменениям, вплоть до потери мутантным белком способности полимеризоваться или к избирательному блокированию полимеризации на стадии ULF (замена Y117L — у виментина [8]). Наиболее изученными представителями семейства ПФ являются виментин, десмин и кератины, для которых получены кристаллические структуры отдельных суперспиральных участков, в том числе участков, ответственных за взаимодействие димеров и тетрамеров между собой [3, 4, 9]. На основании гомологии между ПФ можно предположить, что для нейрофиламентов будет характерен похожий принцип организации.

В зрелых нейронах экспрессируются пять белков ПФ — триада белков нейрофиламентов: белок лёгкой (NFL), средней (NFM) и тяжёлой (NFH) цепей, а также периферин и α -интернексин. Основное отличие трёх белков нейрофиламентов друг от друга определяется их С-концевыми доменами, которые различаются как по длине, так и по наличию важных участков фосфорилирования. Для белков NFM и NFH характерно наличие длинных С-концевых доменов, которые содержат KSP-повторы (Lys-Ser-Pro), являющиеся участками фосфорилирования (например, Erk1,2 киназами) [10,11]. В ранних работах по изучению структуры нейрофиламентов в нейронах было показано, что в клетках соотношение белков составляет 7/3/2 в расчёте на мономер NFL/NFM/NFH соответственно [10]. При этом структурно белки представлены гомодимерами NFL/NFL, а также гетеродимерами NFL/NFM и NFL/NFH [12, 13]. По сравнению с другими ПФ нейрофиламенты отличает их гетероолигомерная (гетеродимерная) структура, а также значительная протяжённость по всей длине аксона, которая требует развитой системы их транспорта. Однако *in vitro* только изолированный NFL может образовывать фибриллы, а изолированные NFM и NFH не способны полимеризоваться. *In vivo* в клетках линии SW13 Vim⁻, не экспрессирующих эндо-

генный виментин, было показано образование филаментоподобных структур, сформированных белком NFL [14]. В то же время для полноценной экспрессии NFL в нейронах необходимы белки NFM и NFH [15].

В настоящей работе мы сконцентрировались на изучении физико-химических свойств основного представителя нейрофиламентов — белка NFL. В гене *NEFL*, кодирующем этот белок, было обнаружено большое количество мутаций, приводящих к развитию наследственной нейропатии Шарко—Мари—Тута (ШМТ) [16]. Данное заболевание представляет группу патологий, которые делятся на два типа: демиелинизирующую и аксональную формы [16, 17]. Для нейропатии первого типа (ШМТ 1) характерно снижение проводимости нервного волокна, а второго типа (ШМТ 2) — дегенеративные процессы в аксоне без снижения проводимости импульса [18]. Известные мутации в гене *NEFL* можно разделить на несколько групп: 1) по месту их локализации в структуре белка NFL или 2) по типу заболевания Шарко—Мари—Тута, которое они вызывают: демиелинизирующую (1F) или аксональную (2E) формы [17, 19, 20]. Для ряда мутантных белков NFL (P8Q, E90K, N98S, A149V) в клеточных линиях была продемонстрирована агрегация, которую в большинстве случаев удавалось устранить, коэкспрессируя в клетках NFL и NFM [21–24]. При этом для трёх мутантных белков (N98S, Q332P, E397K) для предотвращения агрегации была необходима экспрессия сразу трёх белков промежуточных филаментов (NFL, NFM и периферина) [22]. Для белка NFL с заменой N98S было показано нарушение сборки филаментов и образование агрегатов белка как в культурах клеток, так и в нейронах мышей [23]. Помимо этого, на мышинной модели гетерозиготной особи N98S/WT наблюдался выраженный тремор и накопление агрегатов в мозжечке и спинном мозге. В то же время в некоторых работах не наблюдали патологической агрегации мутантных белков внутри клеток, но детектировали заметное уменьшение миелиновой оболочки аксонов [25]. Противоречия в накопленных данных поднимают ряд вопросов. Так, очевидно, является ли образование агрегатов следствием нарушения сворачивания белка или это вызвано нарушениями в его взаимодействии с белками-партнерами?

В качестве объектов исследования в настоящей работе были выбраны белки, содержащие аминокислотные замены в α -спирали 1A (E90K и N98S) и в α -спирали 1B (A149V) (рис. 1). Для данных мутантных форм NFL

ранее было показано нарушение сборки полимеров *in vivo* [21, 22, 24], выражающееся в образовании очень коротких полимеров или агрегатов белка в клетках. Для изучения причин патогенных свойств данных аминокислотных замен в NFL необходимо определить, какое влияние они оказывают на структуру белка. Положение аминокислотных остатков в гептадах определяет структуру и свойства суперспиральных белков, в том числе стабильность структуры coiled-coil, что, в свою очередь, может оказывать влияние и на свойства олигомеров NFL. Учитывая, что исследуемые замены расположены в гептадных повторах в положениях *d* (E90K), *e* (N98S) и *g* (A149V), т.е. в тех положениях, в которых находящиеся там остатки могут оказывать влияние на стабильность двойной спирали, можно предположить, что замены E90K, N98S и A149V (рис. 1) могут приводить к изменениям структуры coiled-coil NFL. В пользу такого предположения говорят полученные ранее данные о том, что замены аминокислотных остатков не только в положениях *a* и *d* гептадных повторов, но и в положениях *e* и *g* могут оказывать серьёзное влияние на стабильность (термостабильность) двойной спирали молекулы тропомиозина [26–31]. Проверка этого предположения и явилась главной задачей данной работы. Для этого мы исследовали влияние этих замен на характер тепловой денатурации белка NFL методами кругового дихроизма (КД) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение белков. Все препараты белков NFL, использованные в данной работе, были рекомбинантными белками, продуктами гена *NEFL* человека (UniProt P07196).

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Последовательность праймеров 5'→3'
F1	GACCTCAGTGACCGCTTCGCCAGCT
R1	CTGGAGCTGCGCCTTCTCCTGCGT
F2	ACGCAGAAGAAGGCGCAGCTCCAGGA
R2	GCGGATGGACTTGAGGTCGTTGCTGA
F3	CTGGTGCGGGAAGATGCCACC
R3	GCGCAGGTCGCGGATCTCCTG

Примечание. Кодоны, в которые были внесены мутации, подчеркнуты.

NFL дикого типа (NFL WT) и мутантные формы были клонированы в вектор EV («Клонинг фасилити», Россия). Для внесения точечных аминокислотных замен был использован Q5-site directed mutagenesis kit («NEB», США) и подобранные наборы праймеров. Для внесения замены N98S использовали праймеры F1 и R1; для внесения замены E90K использовали праймеры F2 и R2; для внесения замены A149V использовали праймеры F3 и R3. Последовательности праймеров («Евроген», Россия) представлены в табл. 1.

Все полученные конструкции были использованы для бактериальной экспрессии белков в клетках *Escherichia coli* штамма C41. Выделение и очистку всех рекомбинантных белков NFL проводили из фракции телец включения. После разрушения клеток ультразвуком тельца включения осаждали центрифугированием при 18 000 g. Осадок телец включения, содержащий белок NFL WT или его мутантные формы, растворяли в 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 8 M мочевины, 2 mM EGTA, 15 mM β-ME,

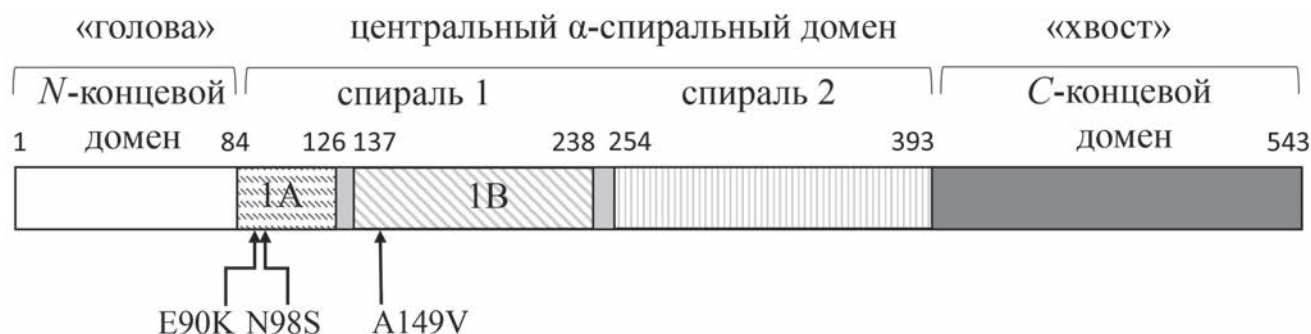


Рис. 1. Схема строения молекулы NFL. Стрелками отмечены положения аминокислотных замен E90K, N98S и A149V в спиральных участках 1A и 1B

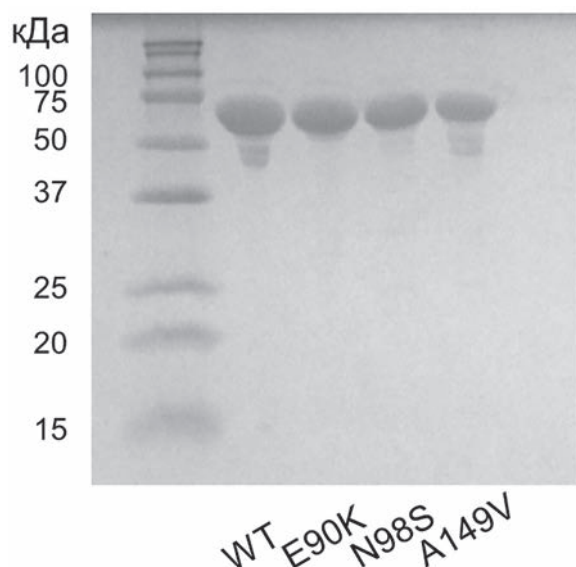


Рис. 2. Анализ чистоты полученных препаратов NFL WT и мутантных форм методом SDS-электрофореза в ПААГ

0,1 mM PMSF (буфер А), и подвергали ультрацентрифугированию при 105 000 g. Супернатант наносили на колонку HiTrap Q («GE Healthcare», США), уравновешенную буфером А. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl в диапазоне 0–0,7 M NaCl. Концентрацию белков определяли спектрометрическим методом, используя коэффициент экстинкции $A_{1\%}^{1\text{cm}}$ при 280 нм, равный $5,9 \text{ cm}^{-1}$. Полученные препараты хранили при -80°C . Чистота полученных препаратов составила не менее 95% (рис. 2).

Ренатурацию белков проводили перед экспериментами путём диализа против 5 mM Hepes/NaOH (pH 8,0), содержащего 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT в течение ночи при 4°C .

Аналитическое ультрацентрифугирование (AUC). Эксперименты по скоростной седиментации (SV) проводили в аналитической ультрацентрифуге, модель Е («Beckman», США), оснащённой абсорбционной оптикой, фотоэлектрическим сканером, монохроматором и компьютером в режиме онлайн. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили при концентрации белка 1 мг/мл в 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. В опытах использовали титановый ротор An-G Ti и двухсекторные ячейки. Седиментационные профили регистрировали путём измерения оптического поглощения при 280 нм. Все ячейки сканировались одновременно с интервалом в 2,5 мин. Дифференциальные распределения по коэффициентам седиментации $[s-g^*(s) \text{ vs } s]$ были определены при 25°C с помощью программы SEDFIT [32].

Метод спектроскопии кругового дихроизма.

Спектры КД белков NFL регистрировали в диапазоне 190–280 нм при 5°C на спектрометре Chirascan CD («Applied Photophysics», Англия) при длине оптического пути 0,02 см. Время регистрации сигнала для каждой длины волны составляло 5 сек. Для каждого препарата было получено не менее 5 записей спектров КД. Все эксперименты проводили при концентрации белков 1 мг/мл в 5 mM Hepes (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. Температурные зависимости тепловой денатурации белков регистрировали при постоянном нагреве со скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ в диапазоне $5\text{--}85^\circ\text{C}$ при длине волны 222 нм.

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии.

Эксперименты методом ДСК проводили с использованием дифференциального сканирующего микрокалориметра MicroCal VP-Capillary («Malvern Instruments», США) с капиллярными измерительными ячейками. Нагрев образцов проводили с постоянной скоростью $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ от 10 до 85°C . Все эксперименты проводили при концентрации белков 2 мг/мл в 5 mM Hepes (pH 8,0), содержащем 0,5 mM EGTA и 2 mM DTT. Для всех препаратов было произведено не менее трёх прогревов. Для изучения обратимости денатурации препараты подвергали двум последовательным прогревам. Процедуру деконволюции, т.е. разложения кривых теплопоглощения на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), проводили в программе Origin 7.0 путём подгонки данных к модели для анализа мультидоменных белков (non-two-state model) [33]. Этот математический подход, основанный на классической работе Freire и Biltonen [33], был заложен в используемый нами программный пакет «Origin 7.0» как «модуль ДСК». Этот модуль позволяет проводить не только деконволюцию кривых ДСК, полученных для обратимо денатурирующих белков, но и целый ряд иных важных процедур обработки этих кривых. Так, к примеру, он позволяет построить (и впоследствии вычесть из кривой теплопоглощения) так называемую «химическую базовую линию» (chemical baseline), соединяющую состояния нативного и полностью денатурированного белка. Он также позволяет точно определить температуру максимума теплового перехода (T_m) для каждого теплового перехода и его калориметрическую энтальпию (ΔH_{cal}), представляющую интеграл избыточной теплоёмкости по температуре в пределах температурного диапазона денатурации одного калориметрического домена или целой молекулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белок NFL относится к семейству белков ПФ и имеет характерные для белков этого семейства суперспиральные участки. Однако отличительной особенностью именно белков ПФ является их способность к полимеризации и образованию различных олигомерных структур. Ранее для бычьего белка NFL было показано формирование низкомолекулярных олигомеров — тетрамеров — в буферном растворе с низкой ионной силой [34]. Коэффициент седиментации олигомеров белка NFL WT человека, полученный в аналогичных условиях методом скоростной седиментации, составил 7,3 S (рис. 3). Ранее с использованием равновесного ультрацентрифугирования было проведено определение молекулярной массы олигомеров других ПФ — виментина и десмина, полученных в похожих условиях [35], и показано, что при низкой ионной силе (5 mM Tris-HCl) образуются олигомеры, молекулярная масса которых соответствует тетрамерам этих белков, однако коэффициенты седиментации тетрамеров виментина и десмина существенно зависят от pH, что указывало на разную степень жёсткости, размер или форму образуемых олигомеров. При pH 8 коэффициент седиментации тетрамеров виментина составил 4,7 S, а при pH 7,5 — 5,5 S [35]. В последующей работе тех же авторов было показано, что при изменении условий (в частности, при повышении концентрации белка до 0,5 мг/мл и проведении эксперимента в присутствии EDTA) коэффициент седиментации виментина повышался до 7,2 S [36], т.е. почти

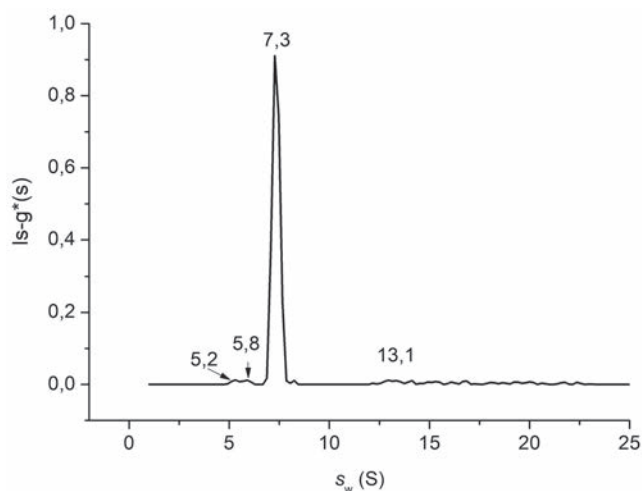


Рис. 3. Анализ олигомерного состояния белка дикого типа NFL WT (1 мг/мл) методом аналитического ультрацентрифугирования. Показано распределение по коэффициентам седиментации $I_s - g^*(s)$. Скорость вращения ротора — 48 000 об./мин

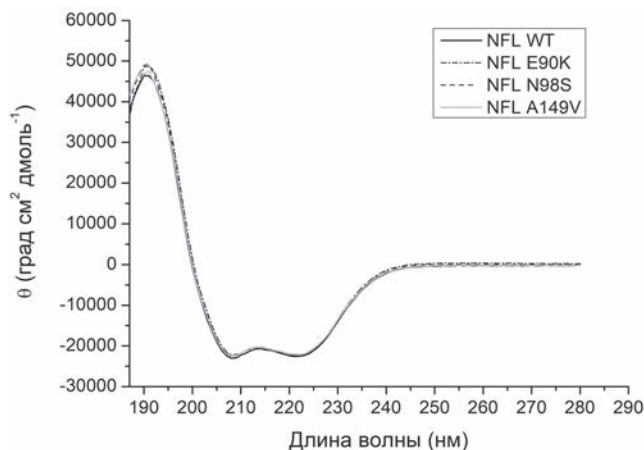


Рис. 4. Спектры кругового дихроизма NFL WT и мутантных белков NFL с заменами E90K, N98S и A149V, зарегистрированные при 5 °C

не отличался от значения 7,3 S, определённого в нашей работе для NFL, концентрация которого составляла 1 мг/мл (рис. 3).

Учитывая преобладание главного пика 7,3 S на распределении $I_s - g^*(s)$ NFL WT (рис. 3), можно заключить, что в используемых условиях этот белок находился преимущественно в форме олигомеров, соответствующих тетрамерам белка NFL. В минорных количествах присутствовали также другие олигомерные формы с коэффициентами седиментации 5,2; 5,8 или 13,2 S (каждая форма < 2%). В настоящее время мы можем лишь предположить, что тетрамерное состояние сохраняется и для мутантных форм NFL (для убедительного доказательства этого предположения требуются дополнительные эксперименты, которые в дальнейшем планируется провести). Тем не менее мы можем достаточно уверенно утверждать, что ни NFL WT, ни его мутантные формы в используемых условиях не образовывали высокомолекулярных олигомеров (ULF и филаментов), что подтверждалось полным отсутствием осадков после высокоскоростного (при 105 000 g) препаративного центрифугирования препаратов (данные не приведены). Важно отметить, что тетрамерная форма ПФ может существовать не только *in vitro*, но и *in vivo* [37], что позволяет рассматривать её как минимальную структуру для изучения свойств NFL.

Регистрация спектров КД NFL WT и всех мутантных белков показала наличие характерных для α -спиральных белков отрицательных максимумов молярной эллиптичности при 208 и 222 нм (рис. 4), при этом, по данным расчёта в программе DichroWeb (<http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml>), структура NFL примерно на 52–56% представлена α -спиральными участками.

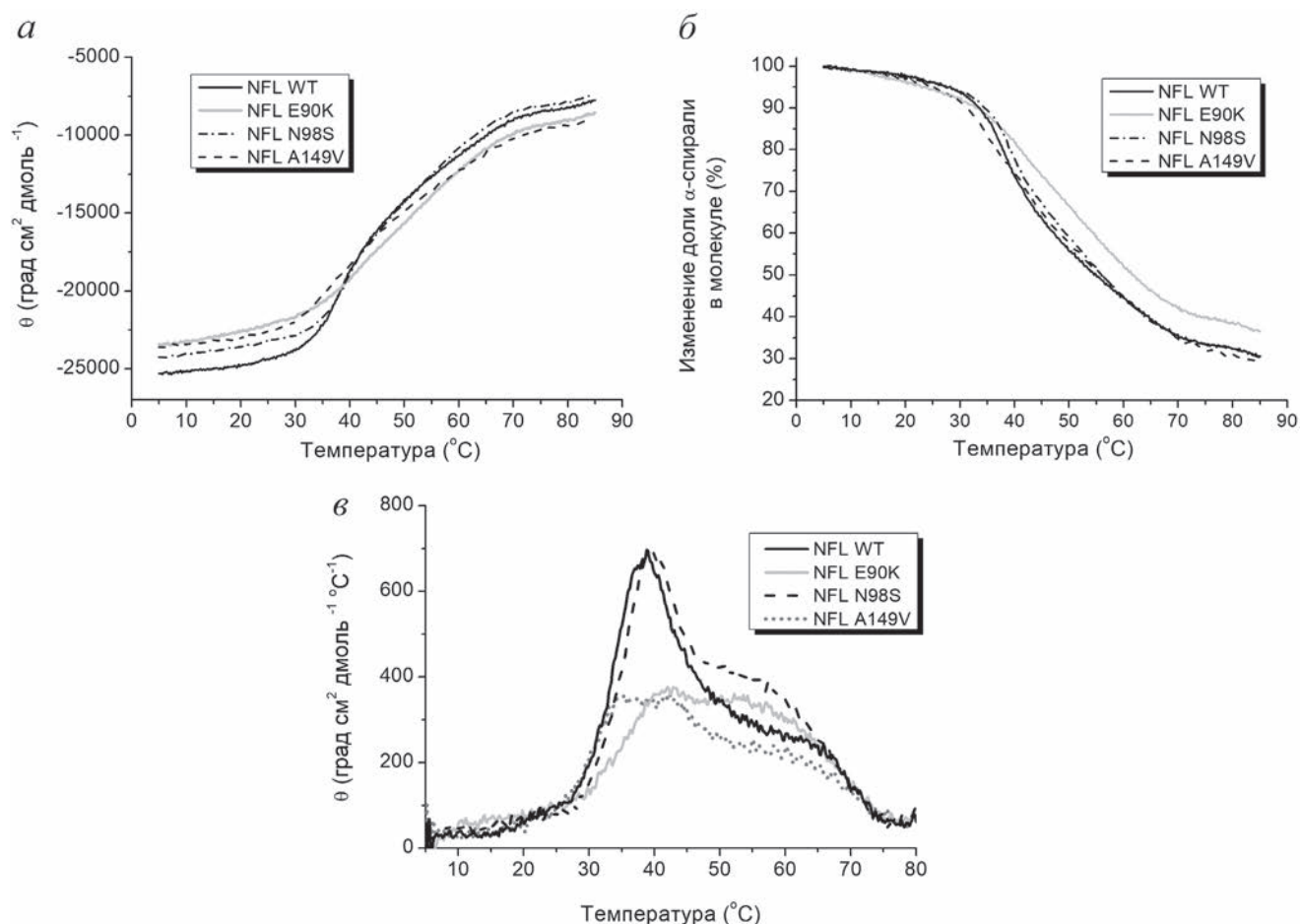


Рис. 5. Тепловая денатурация белка NFL WT и его мутантных форм E90K, N98S и A149V, измеренная методом КД. *a* – Температурные зависимости изменения молярной эллиптичности NFL WT и мутантных белков, зарегистрированные при 222 нм. *б* – Температурные зависимости изменения доли α -спирали в молекуле NFL. За 100% принята спиральность молекулы NFL при 5 °C, соответствующая ~ 50% спиральности белка. *в* – Первые производные температурных зависимостей эллиптичности, представленных на панели (*a*)

В первую очередь мы исследовали тепловую денатурацию целой молекулы NFL WT и её мутантных форм, регистрируя изменение молярной эллиптичности при 222 нм в диапазоне температур 5–85 °C (рис. 5, *a*). Оказалось, что плавление молекулы NFL WT происходит постепенно и имеет несколько выраженных тепловых переходов (рис. 5, *a–в*). С использованием первой производной зависимости, представленной на рис. 5, *a*, было показано наличие теплового перехода при ~ 38 °C, а также более высокотемпературного «плеча» (рис. 5, *в*). Тепловая денатурация мутантного белка с заменой N98S очень похожа на таковую для белка дикого типа и также имеет выраженный переход при ~ 39 °C. Методом КД для мутантного белка с заменой E90K были обнаружены тепловые переходы при ~ 42 °C и ~ 55–57 °C. Для белка NFL с заменой A149V были обнаружены тепловые переходы при ~ 35 °C и ~ 42 °C (рис. 5, *в*). При этом для всех белков NFL характерна обратимость тепловой

денатурации: после нагрева и последующего охлаждения спектры КД этих белков демонстрировали всё те же отрицательные максимумы при 208 и 222 нм, характерные для α -спиральных белков.

Для того чтобы провести точную идентификацию тепловых переходов в молекуле NFL, мы использовали метод ДСК, который позволяет регистрировать температурные зависимости избыточного теплопоглощения молекулы белка при его тепловой денатурации. Плавление NFL было полностью обратимо, что позволило нам провести компьютерную деконволюцию кривых избыточного теплопоглощения NFL WT и его мутантных форм, т.е. разложение этих кривых на отдельные тепловые переходы (калориметрические домены), отражающие денатурацию различных участков белка, которые плавятся кооперативно и независимо друг от друга. Полученные данные представлены на рис. 6 и в табл. 2.

Таблица 2. Калориметрические параметры, полученные методом ДСК для индивидуальных тепловых переходов (калориметрических доменов) белка NFL дикого типа и его мутантных форм*

NFL	Нумерация доменов	T_m # (°C)	$\Delta H_{cal}^{\S}$ (кДж моль ⁻¹)	ΔH_{cal} (% от общей ΔH_{cal})	Общая ΔH_{cal} (кДж моль ⁻¹)
NFL WT	Домен 1	33,2	35	3	1190
	Домен 2	41,7	495	42	
	Домен 3	53,6	430	36	
	Домен 4	63,2	230	19	
NFL E90K	Домен 2	41,6	150	20	745
	Домен 3	52,2	410	55	
	Домен 4	62,6	185	25	
NFL N98S	Домен 1	34,2	60	6	1080
	Домен 2	41,0	295	27	
	Домен 3	50,4	530	49	
	Домен 4	62,5	195	18	
NFL A149V	Домен 1	31,1	80	10	770
	Домен 2	40,7	170	22	
	Домен 3	47,5	345	45	
	Домен 4	63,2	175	23	

Приложение. * Параметры получены на основании данных, представленных на рис. 6.

Погрешность приведённых значений температуры калориметрических доменов (T_m) не превышала $\pm 0,2$ °C.

§ Погрешность приведённых значений калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) не превышала 10%.

По результатам деконволюции для NFL WT были определены 4 калориметрических домена с температурами полупереходов при 33,2 °C, 41,7 °C, 53,6 °C и 63,2 °C. Формы графиков первой производной изменения молярной эллиптичности при 222 нм (рис. 5, в) и температурных зависимостей избыточного теплопоглощения белка NFL WT и его мутантов (рис. 6) в целом очень похожи и демонстрируют наличие одинаковых тепловых переходов. Метод КД позволяет регистрировать денатурацию α -спиралей NFL, в то время как метод ДСК – разрушение структуры coiled-coil. Схожесть температурных зависимостей, полученных этими двумя методами, указывает на то, что разрушение структуры coiled-coil происходит одновременно с плавлением α -спиралей.

Для всех мутантных белков, кроме NFL E90K, также были определены 4 калориметрических домена. Для мутантного белка NFL E90K было показано отсутствие калориметрического домена 1 (рис. 6, табл 2). Важно отметить, что, несмотря на то что все исследованные в работе

аминокислотные замены расположены в спиральных участках 1A и 1B (рис. 1), перераспределение калориметрических доменов произошло только в случае одной аминокислотной замены – E90K. Поскольку эта замена расположена в спиральном участке 1A (рис. 1), можно предположить, что калориметрический домен 1 отражает денатурацию этого участка молекулы NFL. При внесении двух других замен (N98S и A149V) происходили изменения энтальпии отдельных калориметрических доменов, но их количество не менялось. Наименьшие изменения температуры полуперехода мы наблюдали для доменов 2 и 4. Для белков NFL WT и его мутантов значение T_m домена 2 находится в диапазоне 40,7–41,7 °C, а домена 4 – в диапазоне 62,5–63,2 °C. В то же время внесение мутаций привносит заметные изменения в калориметрический домен 3. Так, значение T_m этого домена в случае белка дикого типа составляет 53,6 °C, тогда как для мутантного белка с заменой A149V оно гораздо ниже и составляет 47,5 °C.

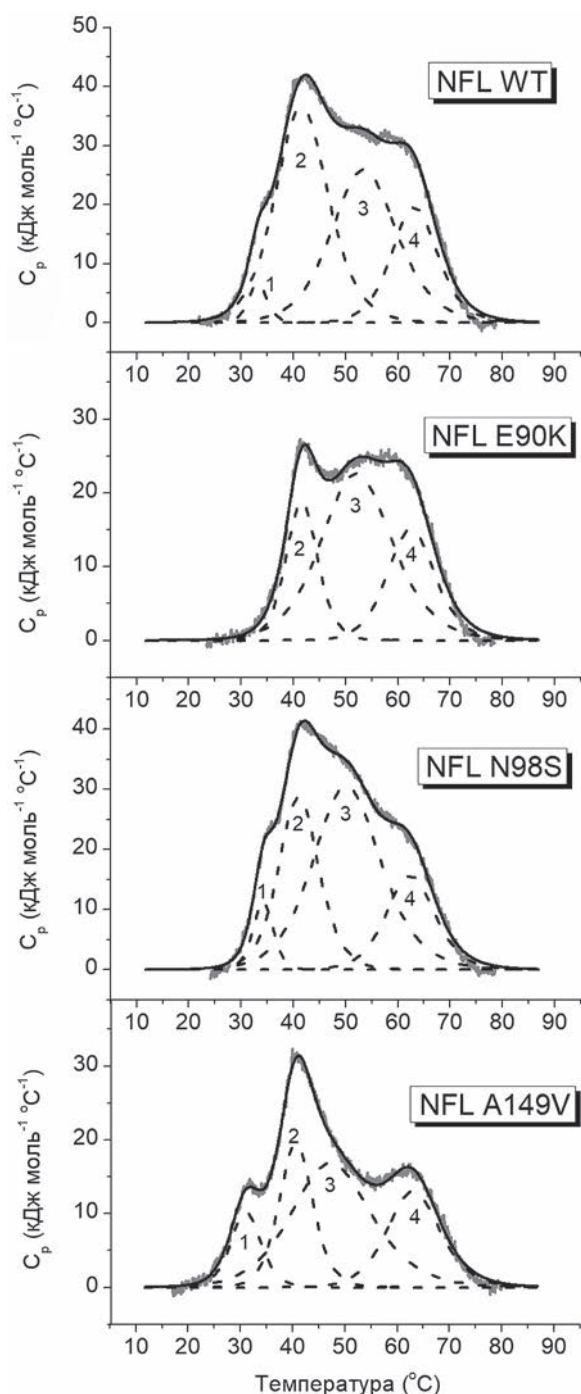


Рис. 6. Температурные зависимости избыточного теплопоглощения белка NFL WT и его точечных мутантов, полученные методом ДСК. Сплошными линиями обозначены оригинальные записи кривых избыточного теплопоглощения, а пунктирными линиями — calorиметрические домены, выявленные путём деконволюции этих кривых. Нумерация доменов соответствует их нумерации в табл. 2

Таким образом, основные изменения в тепловой денатурации NFL при внесении аминокислотных замен затрагивают calorиметрические домены 1 и 3. Для объяснения возможных причин тех структурных измене-

ний, которые могут происходить при внесении аминокислотных замен в NFL, обратимся к структуре ПФ.

Первичная структура α -спиральных участков белков семейства ПФ демонстрирует классическое для всех таких белков распределение аминокислотных остатков в гептадных повторах [26]. При этом каждый аминокислотный остаток выполняет конкретную роль в стабилизации суперспиральной структуры [26, 38]. Для белка виментина ранее были получены кристаллические структуры отдельных фрагментов и показано распределение аминокислотных остатков в спиральях 1А и 1В (рис. 7) [3]. Выравнивание первичных структур виментина и NFL показало, что спирали 1А и 1В демонстрируют высокую степень гомологии, на основании чего мы предположили, что аминокислотным остаткам в гептадах суперспиральных участков NFL будут соответствовать те же положения (*a–g*), что и в виментине. Если это так, то E90 находится в положении *d*, N98 находится в положении *e*, а A149 — в положении *g* (рис. 7). Замена E90K, обнаруженная у пациентов с нейропатией Шарко–Мари–Тута, приводит к исчезновению calorиметрического домена 1 на термограмме NFL (рис. 6, табл. 2), что может указывать на изменения в структуре суперспирального участка 1А, например, на его чрезмерную стабилизацию или, наоборот, дестабилизацию. Традиционно считается, что в положениях *a* и *d* суперспиральных белков должны находиться гидрофобные аминокислотные остатки, стабилизирующие суперспиральную структуру, однако для многих белков промежуточных филаментов (виментина, глиального фибриллярного белка, периферина, десмина) в положении, гомологичном E90 в NFL, также находится остаток глутамина [3]. При этом для остальных остатков в спирали 1А соблюдается правило, что в положениях *a* и *d* должны находиться гидрофобные аминокислотные остатки (рис. 7, *a*). Несмотря на то что аминокислотный остаток E90 не является гидрофобным, по-видимому, он также играет важную роль в стабилизации суперспиральной структуры домена 1А за счёт электростатических взаимодействий, так как в положении *d* в гидрофобной коре ему соответствует R86 (рис. 7, *b*). Внесение замены E90K должно приводить к локальному расхождению двух α -спиралей за счёт появления дополнительного положительного заряда K90 и дестабилизации этого участка структуры. Важно отметить, что для представителей семейства ПФ характерна полимеризация, и в ряде работ высказывается мнение, что именно

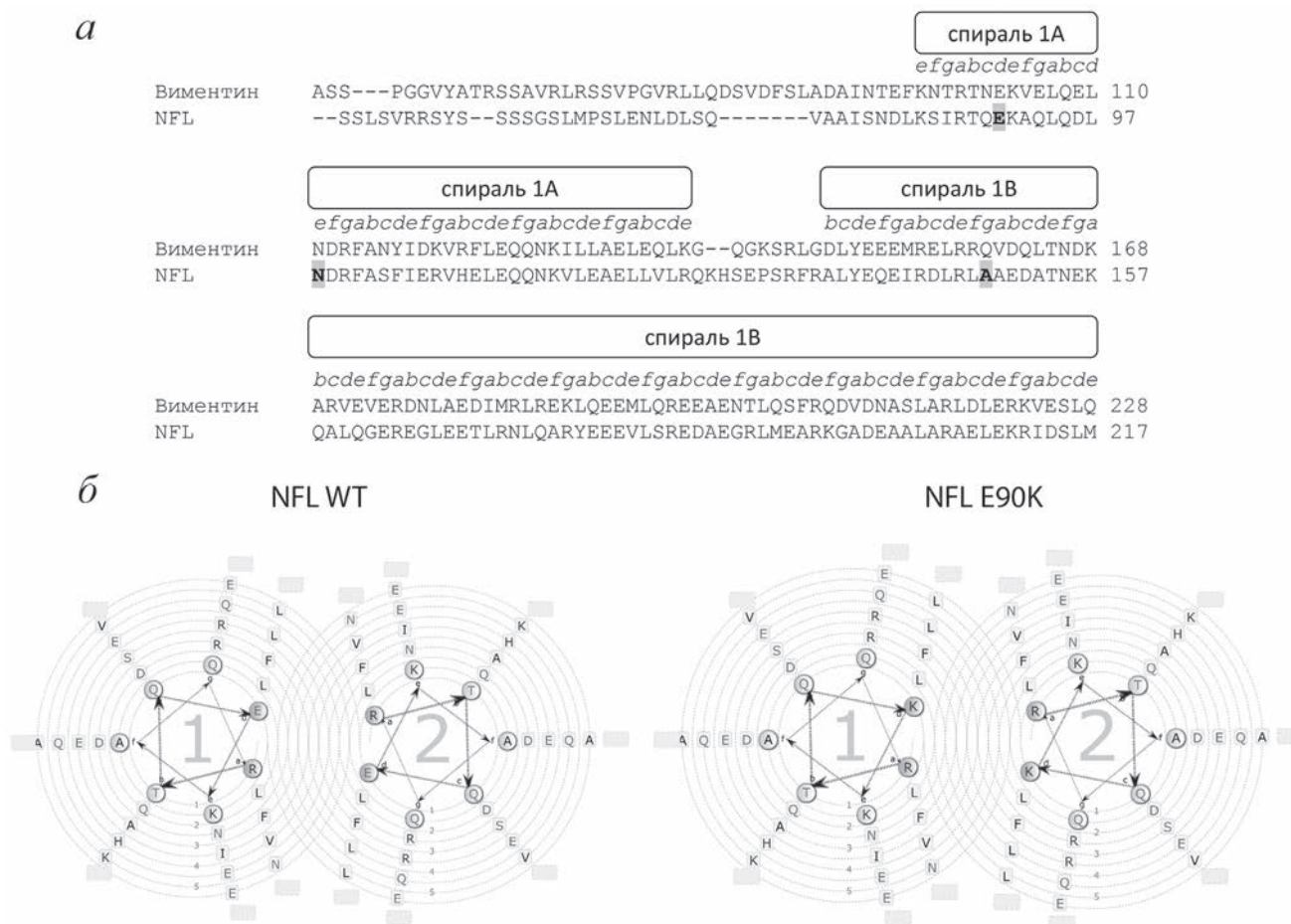


Рис. 7. Анализ положения аминокислотных остатков в гептадных повторах белка NFL. *а* — Сравнение первичных структур виментина (UniProt P08670) и белка NFL (UniProt P07196). Серым цветом обозначены аминокислотные замены в белке NFL, вызывающие развитие нейропатии Шарко–Мари–Тута. Положение аминокислот в гептадах обозначено латинскими буквами *a–g* и определено на основании статьи Chernyatina et al. [3]. *б* — Анализ положения аминокислотных остатков в гептадах NFL WT и NFL E90K в программе Waggawagga [43]. Номерами 1–5 обозначены различные гептады

спираль 1А играет важную роль в продольной полимеризации ПФ (т.е. образовании протяжённых филаментов). Для данного спирального участка белков ПФ была обнаружена самая низкая температура плавления, составляющая ~30 °С, и высказано предположение, что именно низкая термостабильность домена 1А важна для полимеризации ПФ [39–41]. Для виментина ранее была обнаружена единичная аминокислотная замена, расположенная в начале линкера 1 (K139C), из-за которой полимеризация виментина становилась зависимой от температуры. Так, белок с заменой K139C при температурах 21 °С и 37 °С одинаково быстро образовывал ULF-частицы, однако при 21 °С — не был способен образовывать протяжённые фибриллы [35]. В таком случае можно ожидать, что аминокислотные замены, которые влияют на термостабильность NFL, также могут оказывать влияние и на его способность полимеризоваться. Исследования полимеризации NFL E90K в клетках SW13 Vim⁺ показали,

что данный белок образует тонкие короткие филаменты, в отличие от белка дикого типа, который в этих же условиях образует длинные протяжённые филаменты [21]. Сопоставление этих данных литературы [21] с полученными нами результатами (рис. 6, табл. 2) указывает на то, что изменения термостабильности, индуцированные заменой E90K, происходят, по-видимому, как раз в той зоне (спиральный участок 1А, рис. 1), которая отвечает за полимеризацию NFL и образование филаментов.

Следует отметить, однако, что в случае ПФ важно также учитывать их способность к латеральной полимеризации, которая достигается за счёт антипараллельного взаимодействия димеров. Для ПФ было обнаружено несколько видов взаимодействия димеров в тетрамере: A₁₁, A₁₂ и A₂₂ [36, 38], которые отличаются взаимодействующими спиральными участками (например, в случае A₁₁ димеры взаимодействуют антипараллельно посредством спирали 1В). Несмотря на то что в зрелом филаменте ПФ

присутствуют все три вида взаимодействия, на начальных стадиях полимеризации, вплоть до ULF, взаимодействие по типу A_{11} является преобладающим [35]. Основную роль в образовании тетрамеров ПФ играет спираль 1В, однако спираль 1А и начало спирали 2 также важны для образования тетрамеров ПФ [3, 42]. Данный факт может объяснять изменения значения T_m , затрагивающие калориметрические домены 1 и 3, а также изменения энтальпии (ΔH_{cal}) всех калориметрических доменов при внесении точечных аминокислотных замен. Аминокислотные замены N98S и A149V приводили к изменениям в тепловой денатурации NFL, однако в обоих этих случаях сохранялись все четыре калориметрических домена, что, по-видимому, указывает на то, что данные замены оказывают не столь серьёзное влияние на стабилизацию суперспиралей NFL. Вероятно, это связано с тем, что данные аминокислотные остатки находятся в положениях *e* и *g* гептадных повторов, т.е. располагаются на поверхности суперспиралей. Патогенные свойства данных аминокислотных замен NFL, по-видимому, выражаются в нарушении взаимодействия между тетрамерами при образовании ULF и филаментов. В частности, для белка N98S ранее была показана агрегация в клетках SW13 Vim [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых экспериментов можно заключить, что точечные аминокислотные замены в белке NFL, обнаруженные у пациентов с периферической нейропатией Шарко–Мари–Тута, не влияют на способность этого белка формировать суперспиральную структуру. Для всех исследованных мутантных белков с заменами E90K, N98S и A149V методом КД было показано наличие α -спиральной структуры. В то же время данные аминокислотные замены влияют на стабильность и тепловую денатурацию молекулы NFL, приводя

либо к уменьшению числа калориметрических доменов, выявляемых методом ДСК, как в случае замены E90K, либо к заметному изменению температуры максимума (T_m) калориметрического домена 3, либо к изменениям калориметрической энтальпии (ΔH_{cal}) доменов.

В целом, полученные данные указывают на то, что замена E90K приводит, по-видимому, к дестабилизации α -спирального участка 1А в молекуле NFL. Что касается замен N98S и A149V, то можно предположить, что они оказывают влияние не столько на структуру суперспирали, сколько на другие уровни организации молекул NFL.

Вклад авторов. А.М. Матюшенко и В.В. Нефёдова — концепция и руководство работой; Д.С. Ямпольская и В.В. Нефёдова — получение препаратов NFL; С.Ю. Клейменов — выполнение экспериментов методом ДСК; Н.А. Чеботарева — проведение экспериментов методом аналитического ультрацентрифугирования; В.В. Нефёдова и Д.И. Левицкий — написание первоначального текста статьи. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов исследования и редактировании окончательной версии статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Государственных заданий № 122041100022-3 (В.В.Н., Д.С.Я., Н.А.Ч., А.М.М., Д.И.Л.) и № 0088-2021-0009 (С.Ю.К.).

Благодарности. При проведении измерений КД использовалось оборудование Центра коллективного пользования «Промышленные биотехнологии» Федерального государственного учреждения ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrmann, H., and Aebi, U. (2004) Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 749–789, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073823.
- Kornreich, M., Avinery, R., Malka-Gibor, E., Laser-Azogui, A., and Beck, R. (2015) Order and disorder in intermediate filament proteins, *FEBS Lett.*, **589** (19 Pt A), 2464–2476, doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.024.
- Chernyatina, A. A., Nicolet, S., Aebi, U., Herrmann, H., and Strelkov, S. V. (2012) Atomic structure of the vimentin central α -helical domain and its implications for intermediate filament assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13620–13625, doi: 10.1073/pnas.1206836109.

4. Eldirany, S., Ho, M., Hinbest, A. J., Lomakin, I. B., and Bunick, C. G. (2019) Human keratin 1/10-1B tetramer structures reveal a knob-pocket mechanism in intermediate filament assembly, *EMBO J.*, **38**, e100741, doi: 10.15252/embj.2018100741.
5. Strelkov, S. V., Herrmann, H., and Aebi, U., (2003) Molecular architecture of intermediate filaments, *Bioessays*, **25**, 243-251, doi: 10.1002/bies.10246.
6. Block, J., Schroeder, V., Pawelzyk, P., Willenbacher, N., and Koster, S. (2015) Physical properties of cytoplasmic intermediate filaments, *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 3053-3064, doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.05.009.
7. Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Ku, N. O., and Aebi, U. (1999) Characterization of distinct early assembly units of different intermediate filament proteins, *J. Mol. Biol.*, **286**, 1403-1420, doi: 10.1006/jmbi.1999.2528.
8. Brennich, M.E., Vainio, U., Wedig, T., Bauch, S., Herrmann, H., and Köster, S. (2019) Mutation-induced alterations of intra-filament subunit organization in vimentin filaments revealed by SAXS, *Soft Matter*, **15**, 1999-2008, doi: 10.1039/c8sm02281j.
9. Lee, C.-H., Kim, M.-S., Li, S., Leahy, D. J., and Coulombe, P. A. (2020) Structure-function analyses of a keratin heterotypic complex identify specific keratin regions involved in intermediate filament assembly, *Structure*, **28**, 1-8, doi: 10.1016/j.str.2020.01.002.
10. Laser-Azogui, A., Kornreich, M., Malka-Gibor, E., and Beck, R. (2015) Neurofilament assembly and function during neuronal development, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **32**, 92-101, doi: 10.1016/j.ceb.2015.01.003.
11. Veeranna, Amin, N. D., Ahn, N. G., Jaffe, H., Winters, C. A., Grant, P., and Pant, H. C. (1998) Mitogen-activated protein kinases (Erk1,2) phosphorylate Lys-Ser-Pro (KSP) repeats in neurofilament proteins NF-H and NF-M, *J. Neurosci.*, **18**, 4008-4021, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-11-04008.1998.
12. Athlan, E. S., and Mushynski, W. E. (1997) Heterodimeric associations between neuronal intermediate filament proteins, *J. Biol. Chem.*, **272**, 31073-31078, doi: 10.1074/jbc.272.49.31073.
13. Garden, M. J., and Eagles, P. A. (1986) Chemical cross-linking analyses of ox neurofilaments, *Biochem. J.*, **234**, 587-591, doi: 10.1042/bj2340587.
14. Sasaki, T., Gotow, T., Shiozaki, M., Sakaue, F., Saito, T., Julien, J.-P., Uchiyama, Y., and Hisanaga, S.-I. (2006) Aggregate formation and phosphorylation of neurofilament-L Pro22 Charcot-Marie-Tooth disease mutants, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 943-952, doi: 10.1093/hmg/ddl011.
15. Yuan, A., Rao, M. V., Julien, J.-P., and Nixon, R. A. (2003) Neurofilament transport *in vivo* minimally requires hetero-oligomer formation, *J. Neurosci.*, **23**, 9452-9458, doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09452.2003.
16. Houlden, H., and Reilly, M. M. (2006) Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease, *Neuromolecular Med.*, **8**, 43-62, doi: 10.1385/nmm:8:1-2:43.
17. Yang, Y., Li-Qiang, Gu, Burnette, W. B., and Li, J. (2016) N98S mutation in NEFL gene is dominantly inherited with a phenotype of polyneuropathy and cerebellar atrophy, *J. Neurol. Sci.*, **365**, 46-47, doi: 10.1016/j.jns.2016.04.007.
18. Rossor, A. M., Polke, J. M., Houlden, H., and Reilly, M. M. (2013) Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **9**, 562-571, doi: 10.1038/nrneurol.2013.179.
19. Stone, E. J., Kolb, S. J., and Brown, A. (2021) A review and analysis of the clinical literature on Charcot-Marie-Tooth disease caused by mutations in neurofilament protein L, *Cytoskeleton*, **78**, 97-110, doi: 10.1002/cm.21676.
20. Brownlees, J., Ackerley, S., Grierson, A. J., Jacobsen, N. J. O., Shea, K., Anderton, B. H., Nigel Leigh, P., Shaw, C. E., and Miller, C. C. J. (2002) Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 2837-2844, doi: 10.1093/hmg/11.23.2837.
21. Perez-Olle, R., Jones, S. T., and Liem, R. K. H. (2004) Phenotypic analysis of neurofilament light gene mutations linked to Charcot-Marie-Tooth disease in cell culture models, *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2207-2220, doi: 10.1093/hmg/ddh236.
22. Stone, E. J., Uchida, A., and Brown, A. (2019) Charcot-Marie-Tooth disease type 2E/1F mutant neurofilament proteins assemble into neurofilaments, *Cytoskeleton (Hoboken)*, **76**, 423-439, doi: 10.1002/cm.21566.
23. Adebola, A. A., Gastri, T. D., He, C.-Z., Salvatierra, L. A., Zhao, J., Brown, K., Lin, C.-S., Worman, H. J., and Liem, R. K. H. (2014) Neurofilament light polypeptide gene N98S mutation in mice leads to neurofilament network abnormalities and a Charcot-Marie-Tooth type 2E phenotype, *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 2163-2174, doi: 10.1093/hmg/ddu736.
24. Lee, I.-B., Kim, S.-K., Chung, S.-H., Kim, H., Kwon, T. K., Min, D. S., and Chang, J.-S. (2008) The effect of rod domain A148V mutation of neurofilament light chain on filament formation, *BMB Rep.*, **41**, 868-874, doi: 10.5483/bmbrep.2008.41.12.868.
25. Jordanova, A., De Jonghe, P., Boerkoel, C. F., Takashima, H., De Vriendt, E., Ceuterick, C., Martin, J.-J., Butler, I. J., Mancias, P., Papasozomenos, S. Ch., Terespolsky, D., Potocki, L., Brown, C.W., Shy, M., Rita, D. A., Tournev, I., Kremensky, I., Lupski, J. R., and Timmerman, V. (2003) Mutations in the neurofilament light chain gene (NEFL) cause early onset severe Charcot-Marie-Tooth disease, *Brain*, **126**, 590-597, doi: 10.1093/brain/awg059.

26. Nevzorov, I. A., and Levitsky, D. I. (2011) Tropomyosin: double helix from the protein world, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1507-1527, doi: 10.1134/S0006297911130098.
27. Nevzorov, I. A., Nikolaeva, O. P., Kainov, Y. A., Redwood, C. S., and Levitsky, D. I. (2011) Conserved noncanonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule, *J. Biol. Chem.*, **286**, 15766-15772, doi: 10.1074/jbc.M110.209353.
28. Kremneva, E., Boussof, S., Nikolaeva, O., Maytum, R., Geeves, M. A., and Levitsky, D. I. (2004) Effects of two familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in α -tropomyosin, Asp175Asn and Glu180Gly, on the thermal unfolding of actin-bound tropomyosin, *Biophys. J.*, **87**, 3922-3933, doi: 10.1529/biophysj.104.048793.
29. Matyushenko, A. M., Shchepkin, D. V., Kopylova, G. V., Popruga, K. E., Artemova, N. V., Pivovarova, A. V., Bershitsky, S. Y., and Levitsky, D. I. (2017) Structural and functional effects of cardiomyopathy-causing mutations in troponin T-binding region of cardiac tropomyosin, *Biochemistry*, **56**, 250-259, doi: 10.1021/acs.biochem.6b00994.
30. Matyushenko, A. M., Artemova, N. V., Sluchanko, N. N., and Levitsky, D. I. (2015) Effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin on the domain structure of its molecule, *Biophys. Chem.*, **196**, 77-85, doi: 10.1016/j.bpc.2014.10.001.
31. Nevzorov, I., Redwood, C., and Levitsky, D. (2008) Stability of two β -tropomyosin isoforms: effects of mutation Arg91Gly, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **29**, 173-176, doi: 10.1007/s10974-009-9171-3.
32. Schuck, P., and Rossmanith, P. (2000) Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling, *Biopolymers*, **54**, 328-341, doi: 10.1002/1097-0282(20001015)54:5<328::AID-BIP40>3.0.CO;2-P.
33. Freire, E., and Biltonen, R. L. (1978) Statistical mechanical deconvolution of thermal transitions in macromolecules. I. Theory and application to homogeneous systems, *Biopolymers*, **17**, 463-479, doi: 10.1002/bip.1978.360170212.
34. Nefedova, V. V., Sudnitsyna, M. V., and Gusev, N. B. (2017) Interaction of small heat shock proteins with light component of neurofilaments (NFL), *Cell Stress Chaperones*, **22**, 467-479, doi: 10.1007/s12192-016-0757-6.
35. Mücke, N., Wedig, T., Bürer, A., Marekov, L. N., Steinert, P. M., Langowski, J., Aebi, U., and Herrmann, H. (2004) Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin, *J. Mol. Biol.*, **340**, 97-114, doi: 10.1016/j.jmb.2004.04.039.
36. Wickert, U., Mücke, N., Wedig, T., Müller, S. A., Aebi, U., and Herrmann, H. (2005) Characterization of the in vitro co-assembly process of the intermediate filament proteins vimentin and desmin: mixed polymers at all stages of assembly, *Eur. J. Cell Biol.*, **84**, 379-391, doi: 10.1016/j.ejcb.2005.01.004.
37. Soellner, P., Quinlan, R. A., and Franke, W. W. (1985) Identification of a distinct soluble subunit of an intermediate filament protein: tetrameric vimentin from living cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 7929-7933, doi: 10.1073/pnas.82.23.7929.
38. Minin, A. A., and Moldaver, M. V. (2008) Intermediate vimentin filaments and their role in intracellular organelle distribution, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 1453-1466, doi: 10.1134/s0006297908130063.
39. Meier, M., Padilla, G. P., Herrmann, H., Wedig, T., Hergt, M., Patel, T. R., Stetefeld, J., Aebi, U., and Burkhard, P. (2009) Vimentin coil 1A – a molecular switch involved in the initiation of filament elongation, *J. Mol. Biol.*, **390**, 245-261, doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.067.
40. Vermeire, P.-J., Stalmans, G., Lilina, A. V., Fiala, J., Novak, P., Herrmann, H., and Strelkov, S. V. (2021) Molecular interactions driving intermediate filament assembly, *Cells*, **10**, 2457, doi: 10.3390/cells10092457.
41. Lilina, A. V., Leekens, S., Hashim, H. M., Vermeire, P.-J., Harvey, J. N., Strelkov, S. V. (2022) Stability profile of vimentine rod domain, *Protein Sci.*, **31**, e4505, doi: 10.1002/pro.4505.
42. Premchandrar, A., Mücke, N., Poznański, J., Wedig, T., Kaus-Drobek, M., Herrmann, H., and Dadlez, M. (2016) Structural dynamics of the vimentin coiled-coil contact regions involved in filament assembly as revealed by hydrogen-deuterium exchange, *J. Biol. Chem.*, **291**, 24931-24950, doi: 10.1074/jbc.M116.748145.
43. Simm, D., Hatje, K., and Kollmar, M. (2015) Waggawagga: comparative visualization of coiled-coil predictions and detection of stable single α -helices (SAH domains), *Bioinformatics*, **31**, 767-769, doi: 10.1093/bioinformatics/btu700.

EFFECT OF NEURODEGENERATIVE MUTATIONS IN *NEFL* GENE ON THERMAL DENATURATION OF THE NEUROFILAMENT LIGHT CHAIN PROTEIN

V. V. Nefedova^{1*}, D. S. Yampolskaya¹, S. Y. Kleymenov^{1,2}, N. A. Chebotareva¹,
A. M. Matyushenko¹, and D. I. Levitsky¹

¹ *Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: victoria.v.nefedova@mail.ru*

² *Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow 119334, Russia*

The effects of amino acid substitutions E90K, N98S and A149V in the light chain of neurofilaments (NFL) on the structure and thermal denaturation of the NFL molecule was investigated. By using the circular dichroism spectroscopy, it was shown that these substitutions do not lead to a changes in the α -helical structure of NFL, but they caused a noticeable effects on the stability of the molecule. We also identified calorimetric domains in the NFL structure by using the differential scanning calorimetry. It was shown that the E90K replacement lead to the disappearance of the low-temperature thermal transition (domain 1). The mutations lead to changes in the enthalpy of melting of NFL domains, as well as lead to significant changes in the melting temperatures (T_m) of some calorimetric domains. Thus, despite the fact that all these amino acid substitutions are associated with the development of Charcot–Marie–Tooth neuropathy, and two of them are even located very close to each other in the coiled-coil domain 1A, they differently effects on the structure and stability of the NFL molecule.

Keywords: intermediate filaments, neurofilaments, coiled-coil proteins, circular dichroism spectroscopy, differential scanning calorimetry

ПРОФИЛИ ОКСИЛИПИНОВ В КРОВИ КАК МАРКЕРЫ ПАТОГЕНЕЗА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Мини-обзор

© 2023 Д.В. Чистяков^{1*}, Л.В. Коваленко², М.Ю. Донников², М.Г. Сергеева¹

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: chistyakov@gmail.com

² БУ ВО ХМАО – Югры «Сургутский государственный университет»,
628412 Ханты-Мансийский автономный округ – Югра, Сургут, Россия

Поступила в редакцию 01.11.2022

После доработки 09.03.2023

Принята к публикации 11.03.2023

Оксилипины – сигнальные липиды, производные полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), образующиеся по разным полиферментным путям метаболизма (циклооксигеназный, липоксигеназный, эпиксигеназный, анандамидный), а также неферментативно. Эти пути трансформации ПНЖК активируются параллельно, образуя смесь физиологически активных веществ. Хотя связь оксипинов с различными опухолевыми заболеваниями известна давно, только недавно совершенствование методов инструментального анализа позволило одновременно количественно изучать оксипинов разных классов (профили). В обзоре разобраны подходы к получению профилей оксипинов методом ВЭЖХ-МС/МС. Проведено сравнение профилей оксипинов в образцах крови пациентов с онкологическими заболеваниями (рак груди, яичников, легкого, предстательной железы, печени и колоректальный рак). Делается заключение о потенциальной возможности использования профилей оксипинов крови как маркеров онкозаболеваний. Понимание общих закономерностей метаболизма ПНЖК и физиологической активности смесей оксипинов будет способствовать совершенствованию ранней диагностики и прогнозированию протекания опухолевых заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксипинов, эйкозаноиды, онкология, метаболомика, липидный профиль, полиненасыщенные жирные кислоты.

DOI: 10.31857/S0320972523050056, EDN: AXNNFT

ВВЕДЕНИЕ

Последнее десятилетие характеризуется активным внедрением новых инструментальных методов анализа и разработкой новых подходов для изучения метаболитов крови. В данном обзоре разберем те изменения, которые за последние годы произошли в области исследований оксипинов с фокусом на возможностях использования профилей оксипинов крови как маркеров онкологических заболеваний.

Оксипинов – это обширное семейство биологически активных веществ, которые

образуются при оксигенировании полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Общеизвестна группа оксипинов – эйкозаноиды, происходящая из арахидоновой кислоты (АА, C20:4 ω -6), поскольку именно эйкозаноиды изучаются несколько десятилетий (знакомые всем простагландины и лейкотриены). Также хорошо изучены ферменты их синтеза – мишени действия таких нестероидных противовоспалительных препаратов, как аспирин или ибупрофен [1]. За последние годы появились многочисленные работы о метаболизме и биологической активности оксипинов,

Принятые сокращения: ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; КРР – колоректальный рак; НИЗ – неинфекционные заболевания; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; РЛ – рак легкого; РМЖ – рак молочной железы; РПЖ – рак предстательной железы; РЯ – рак яичника; АА – арахидоновая кислота; СОХ – циклооксигеназа; СYP – цитохром P450; ДНА – докозагексаеновая кислота; ЕРА – эйкозапентаеновая кислота; LA – линолевая кислота; LOX – липоксигеназа; ROC-AUC – показатель площади под характеристической кривой ошибок.

* Адресат для корреспонденции.

происходящих из докозагексаеновой (DHA, C22:6 ω -3), эйкозапентаеновой (EPA, C20:5 ω -3), линолевой (LA, C18:2 ω -6) и других ПНЖК [1–3].

Для понимания проблем изучения оксипинов следует напомнить, что ПНЖК находятся преимущественно в положении sn-2 фосфолипидов мембран (внутренних и внешних), и при воздействии на клетки различных стимулов эти кислоты высвобождаются с помощью ферментов семейства фосфолипаз A2 и далее метаболизируются по различным полиферментным каскадам, которые называются по ключевым ферментам: циклооксигеназная ветвь (COX), липоксигеназная ветвь (LOX), эпоксигеназная ветвь (CYP) метаболизма оксипинов. Также выделяют превращение ПНЖК по анандамидному пути (ферменты эндоканнабиноидной системы) и неферментативный путь окисления [1, 4].

Помимо того, что все эти пути могут активироваться внутри одной клетки в ответ на стимуляцию, известно, что образующиеся соединения имеют специфическую активность, действуя через специфические рецепторы, преимущественно сопряженные с G-белками [1, 5]. Также оксипины могут быть лигандами ядерных рецепторов или вступать в различные неспецифические реакции [1]. Следует добавить, что исследования оксипинов затруднены не только разнообразием полиферментных путей метаболизма и сигналинга, но и коротким временем жизни этих метаболитов, а также их низкой концентрацией в биологических объектах. Остается неясным ответ на вопрос, как именно определяется результат ответа организма на сигнал, если одновременно в относительно небольших количествах синтезируются соединения разнонаправленного действия.

Интерес к изучению оксипинов связан с тем, что они являются активными участниками воспалительных процессов [1, 6, 7]. В настоящее время уже окончательно сформировалось понимание, что для неинфекционных заболеваний (НИЗ) характерны проявления хронических воспалительных процессов. НИЗ — это такие распространенные заболевания, как сердечно-сосудистые патологии (в том числе инфаркт и инсульт), онкологические и легочные заболевания, диабет 2-го типа, а также патологии нервной системы [8, 9]. Воспалительный ответ имеет системные защитные функции и направлен на устранение отклонений от гомеостаза [10, 11], а вот хроническое воспаление представляет собой ответ, который не возвращается к исходным параметрам в течение длительного времени

и может нанести организму значительный урон [10–12]. Воспаление является одним из признаков рака [13, 14]. Считается, что хронические воспалительные процессы, характеризующиеся нарушениями в метаболизме оксипинов, связаны с возникновением злокачественных трансформаций и могут влиять на их развитие [6].

Отдельные пути метаболизма оксипинов были относительно хорошо изучены уже к концу прошлого века (данные до середины нулевых годов суммированы в монографиях [1, 15]). За прошедшие два десятилетия количество публикаций, посвященных оксипинам, остается на уровне 2–3 тысячи в год. Следует отметить увеличение количества исследований по свойствам особого класса соединений, так называемых «медиаторов фазы разрешения воспаления» (pro-resolving lipid mediators, SPM), к которым относят липоксины, протектины, марезины, резольвины и другие соединения [1, 8]. Изначально предполагалось, что через стимуляцию эндогенного синтеза SPM можно будет создавать новые подходы к терапии воспалительных процессов [8]. Однако проведенный недавно детальный анализ существующих на данный момент данных по SPM ставит под сомнение их роль в качестве эндогенных медиаторов разрешения воспаления и возможность использования отдельных липидных медиаторов как модуляторов этого процесса [16]. Еще раз подчеркнем, что одна из проблем в исследованиях оксипинов заключается в том, что физиологические эффекты отдельных веществ изучают при добавлении их к модельным объектам в концентрациях, которые значительно выше физиологических. Однако в естественных условиях оксипины всегда существуют и действуют как смесь веществ. Эта смесь часто состоит из противоположных по физиологическим эффектам веществ, поэтому необходима их комплексная оценка.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОФИЛЕЙ ОКСИПИНОВ

Долгое время изучение оксипинов было затруднено технической сложностью детекции этих липидных молекул, концентрация которых в биологических жидкостях колеблется на уровне 1–100 пмоль/литр [17]. Традиционные подходы с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА) позволяют анализировать в одном исследовании небольшой набор соединений, хотя уже идентифицировано более

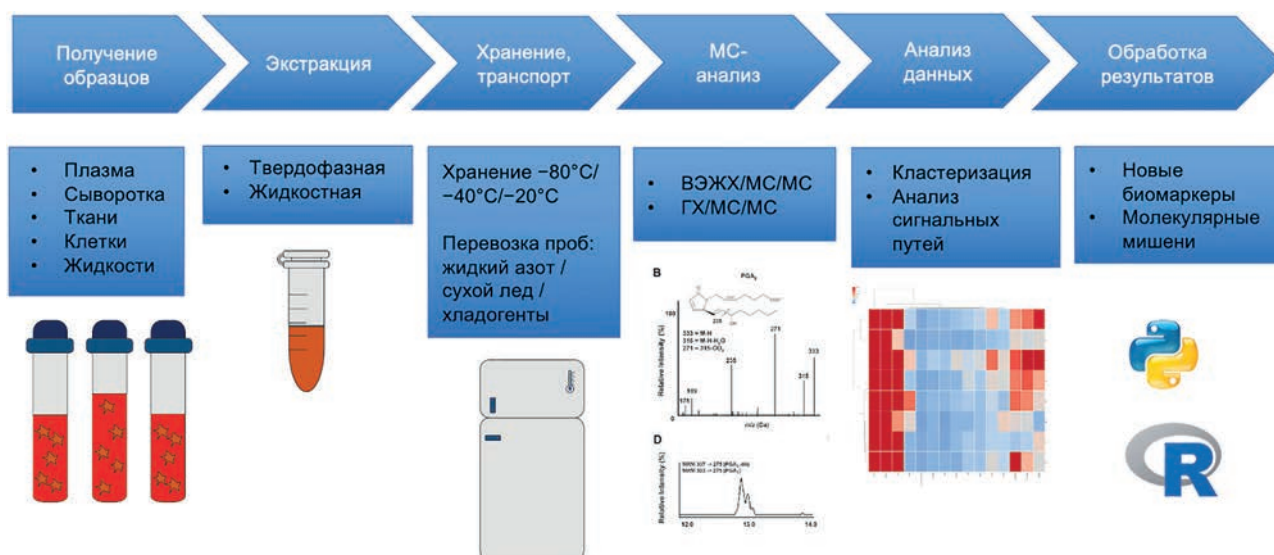


Рис. 1. Основные этапы проведения исследования профиля оксипинов в биологических объектах

200 молекул оксипинов, которые обладают физиологической активностью [2]. Развитие методов масс-спектрометрии в последнее десятилетие, в первую очередь ВЭЖХ-МС/МС, позволило проводить одновременное количественное определение многих оксипинов, что расширило представление о биологической роли этих соединений при заболеваниях и стимулировало поиск среди оксипинов биомаркеров для диагностики НИЗ [2, 18–19].

Оксипины являются частью большой группы липидных метаболитов, концентрацию которых измеряют в биологических образцах. В крови человека обнаружено более 600 липидов [20, 21]. На больших группах пациентов и здоровых людей показаны изменения липидома, характерные для различных заболеваний [21]. Для использования в клинике сформулированы условия стандартизации измерения липидома [22, 23].

Для получения достоверных результатов в области изучения липидома важно проведение регламентированной последовательности отдельных методов, которые в совокупности образуют платформу исследования. На рис. 1 приведена платформа, которая используется при «омиксном» подходе к исследованию профиля оксипинов. Каждый из приведенных этапов (включающих в себя как аспекты получения, хранения и транспортировки образцов, так и их экстракцию (жидкостная/твердофазная), масс-спектрометрию и последующую обработку данных) имеет свои особенности и непосредственно влияет на конечный результат. В настоящее время консенсусом является использование антиоксидантов при хранении проб перед исследованиями, часто используе-

мым консервантом является БГТ (бутилгидрокситолуол). Значимую роль играет транспортировка и хранение проб, выбор матрицы исследования (кровь/плазма), время забора крови у пациентов и другие особенности, которые детально разобраны в ряде методических статей по теме [1, 24–26]. Без согласованных протоколов и единой платформы исследований невозможно создание валидных баз данных, сопровождающих «омиксные» технологии.

ПРОФИЛИ ОКСИЛИПИНОВ И РАК

Метаболические нарушения, воспалительный ответ и хроническое воспаление широко рассматриваются как постоянные спутники онкологических заболеваний [13]. В этих преобразованиях насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, их метаболизм и биосинтез важны для оценки изменений в энергетическом метаболизме [13, 15, 27–29]. ПНЖК так же важны, как источник синтеза оксипинов, связанных с процессами, отражающими изменения в организме [1, 15]. Установлено, что хроническое воспаление, характеризующееся аномальным синтезом оксипинов, становится благодатной почвой для злокачественной трансформации, выхода за границы контроля организмом [30–32]. Уже не первое десятилетие в модельных экспериментах и при диагностированных заболеваниях проводятся исследования роли отдельных групп оксипинов (в первую очередь таких соединений, как простагландины, тромбоксаны и лейкотриены, которые образуются из арахидоновой кислоты) [33–35].

Существует множество работ, посвященных изучению отдельных путей метаболизма в контексте различных моделей опухолевых заболеваний, от клеток до животных и человека. Исследования в большинстве своем сосредоточены на изучении изменений метаболизма отдельных путей трансформации ПНЖК в клетках опухоли или их ближайшего микроокружения и поиске новых мишеней для лекарственных средств. Так, давно исследуется вовлеченность метаболитов LOX-пути в регуляцию опухолевых процессов (см. обзоры Schneider и Pozzi [36] и Catalano и Procopio [37]), хорошо изучен COX-путь биосинтеза АА с образованием простагландинов и возможность использования ингибиторов COX или рецепторов простагландинов для терапии при разных видах рака (см. недавний обзор Wang et al. [38]). Рассматриваются терапевтические аспекты направленного изменения профиля CYP-производных ПНЖК (см., например, обзор Luo и Liu [39]), потенциальное использование ингибиторов растворимых эпоксидгидролаз (sEH) [40] и ферментов семейства CYP [41] при различных опухолевых заболеваниях. Эндоканнабиноидная система также находится в фокусе исследований как потенциальная мишень для терапии раковых заболеваний, роль эндогенных и экзогенных каннабиноидов разобрана в обзоре Laezza et al. [42].

Полученные результаты по изучению отдельных путей метаболизма ПНЖК указывают на потенциальную возможность использования количественного измерения оксипинов крови для оценки состояния организма, поэтому мы проанализировали результаты таких исследований для онкологических заболеваний. Информацию собирали с помощью сервиса библиографического поиска PubMed. Ключевые запросы для первичного анализа были: «eicosanoids cancer plasma» — 843 публикации; «oxylipins cancer plasma» — 20 публикаций; «eicosanoids cancer serum» — 869 публикаций; «oxylipins cancer serum» — 13 публикаций; «eicosanoids cancer biomarker» — 975 публикаций; «oxylipins cancer biomarker» — 22 публикации. Из перечня публикаций в количестве 2742 были удалены обзорные статьи и дубликаты (случаи, когда статья попадалась в поисковую выдачу сразу по нескольким запросам), для 2173 оставшихся публикаций далее проводился ручной отбор по следующим критериям: 1) в исследование были включены пациенты с онкологическим заболеванием; 2) эйкозаноиды/оксипины измеряли в крови пациентов; 3) в исследовании анализировали про-

филь оксипинов (под профилем понималось наличие в группе детектируемых соединений из ≥ 2 классов липидных медиаторов: ПНЖК, метаболиты, образующиеся по циклооксигеназному, липоксигеназному, эпоксигеназному путям, анандамидному пути или образующиеся неферментативно). После отбора по указанным параметрам для анализа осталось 12 работ (таблица). Исследования профилей оксипинов в крови человека проводились на пациентах с различными типами онкологических заболеваний, включая рак молочной железы (РМЖ) [43, 44], немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) [45], колоректальный рак (КРР) [46–48], рак легкого (РЛ) [49], гепатоцеллюлярную карциному (ГЦК) [50, 51], рак предстательной железы (РПЖ) [52], перитонеальный канцероматоз (ПК) [53], рак яичника (РЯ) [54] (таблица). В зависимости от целей исследований детектировали разные наборы метаболитов от 2 до 38 (таблица).

При анализе профилей липидных медиаторов при РМЖ из 34 детектируемых соединений наблюдали изменения по 18, из которых концентрация 10 соединений была повышена, а 8 соединений — понижена [44]. Повышенная концентрация наблюдалась как для самой АА, так и для метаболитов АА, синтезируемых через COX-путь: PGA2 + PGJ2, 11-HETE и PGFM (производное PGF2 α). Помимо этого, у больных РМЖ увеличивалась концентрация в плазме метаболитов, синтезируемых по LOX-пути: 12-HETE (производное АА), 9-HODE (производное LA) и LXA5 (липоксин A5, производное EPA), а также наблюдалось повышенное количество производных DHA — 16-HDoHE и 20-HDoHE, образующихся неферментативно. Снизилась концентрация анандамида (AEA), метаболитов производного DGLA 15-HETrE, производных DHA — резолвина D1 и 11-HDoHE, образующихся ферментативно по липоксигеназному пути. Для метаболитов, синтезируемых по эпоксигеназному пути цитохрома P450 (CYP), наблюдали снижение 9,10-EpOME и 12,13-EpOME (метаболиты LA), а также снижение 20-карбоксиарахидоновой кислоты (20-COOH-AK), которая считается продуктом окисления производного 20-HETE алкогольдегидрогеназой [55]. Пример демонстрирует, что меняется метаболизм оксипинов сразу по многим путям и выбрасываются активные соединения, производные разных ПНЖК. Это требует разработки новых способов интерпретации данных не на уровне отдельных веществ, а на уровне профилей, т.е. количественного определения метаболитов разных путей. Сопоставление профилей оксипинов

Изменения профилей ПНЖК и оксилипинов в крови пациентов с различными типами рака

Тип рака	Количество детектируемых метаболитов профиля	Размер выборки больные/здоровые	Плазма/сыворотка	Выводы	Ссылка
Рак молочной железы	34	169/152	плазма	↑ (AA, PGA2 + PGJ2, 9-HODE, 12-HETE, 11-HETE, LXA5, PGFM, PGE2, 16-HDoHE, 20-HDoHE); ↓ (5-HETE, 15-HETrE, 11-HDoHE, 9,10-EpOME, 12,13-EpOME, 20-carboxy-AA, RvD1, AEA)	[44]
	21	20/20	плазма	↑ (13-HODE, 9-HODE, 13-HOTrE, 9-HOTrE и 12-HHT)	[43]
Немелкоклеточный рак легкого	8	55/165	сыворотка	↑ (AA, LA, 5-HETE, 11-HETE, 12-HETE, и 15-HETE)	[49]
	6	69/76	плазма	↓ (13-HODE и AA)	[45]
Колоректальный рак	113	55/52 и 34*	сыворотка	↓ (9-HODE, 13-HODE, 12,13-diHOME, PGD2, 15-HETE, 11-HETE, 15-KEDE, 5,15-DiHETE, 8-HETE и 13,14-dihydro-15-keto-PGD2)	[46]
	2	8/14	сыворотка	↑ (12-HETE и TXB2)	[47]
	38	25/10	сыворотка	↑ (2,3-dinor-8-iso-PGF2α); ↓ (13-HODE, 19-HETE, 9-HODE, 12-keto-LTB4)	[48]
Гепатоцеллюлярная карцинома	8	30/30 и 27**	сыворотка	↑ (AA, DGLA, 13-HODE + 9-HODE, 15-HETE, 12-HETE) ***	[50]
	22	51/39	сыворотка	↑ (PGF2α, TXB2, PGEM, 6-keto-PGF1α, LTE4, 5-HETE, 15-HETE, 12-HETE, 9-HETE, 8-HETE, 14,15-EET, 14,15-DHET, 5,6-EET, 5,6-DHET, 9,10-EpOME, 13-HODE, 9-HODE)	[51]
Рак предстательной железы	6	РПЖ 20/12 и 222****	сыворотка	у пациентов с поздними стадиями: ↑ (5-HETE, 8-HETE, 11-HETE и 15-HETE)	[52]
Перитонеальный канцероматоз	4	6/17	плазма	LTB4 детектирован только у пациентов с раком	[53]
Рак яичника	31	157/156	сыворотка	повышенный риск развития РЯ при ↑ (8-HETE, 12,13-DHOME, 13-HODE, 9-HODE и 9,12,13-THOME)	[54]

Примечание. ↑ — концентрации соединения были повышены у больных по сравнению с контролем; ↓ — концентрации соединений были понижены у больных по сравнению с контролем. * — пациенты с диагнозом энтерит; ** — контрольные пациенты с циррозом печени, вызванным вирусом гепатита С; *** — у пациентов с ГЦК по сравнению с пациентами с циррозом печени, вызванным вирусом гепатита С; **** — валидационная выборка: 222 пациента с различными уровнями ПСА.

с разными клинически выделенными стадиями позволило авторам сделать вывод о потенциальной возможности использования профилей оксипинов для ранней диагностики этого вида заболевания [44]. В другом исследовании при анализе профиля из 21 липидного медиатора у пациентов с РМЖ выявили увеличение концентрации 5 соединений: 12-ННТ (производное АА по COX-пути) и метаболиты, синтезируемые по LOX-пути, — 9-NODE, 13-NODE (производные LA) и 13-HOTrE, 9-HOTrE (производные ALA) [43]. Различия между работами объясняются различиями в наборе определяемых соединений, а также выборках, т.е. группах пациентов с разными стадиями заболевания.

В работе Nada et al. [54] проводился анализ профилей оксипинов в рамках большого проекта, направленного на скрининг рака легких, простаты, яичников и колоректального рака, проводимый в 1993–2003 гг. В скрининговом исследовании участвовало более 78 000 женщин в возрасте 55–74 года, у которых проводили регулярный медосмотр, в ходе которого отбирали пробы крови. В рамках исследования отобрали образцы 157 пациенток с диагнозом рак яичников. Определяли концентрацию 31 оксипина в сыворотке крови. Обнаружили, что профиль оксипинов не менялся при сравнении уже заболевших со здоровыми людьми, однако сравнение проб крови этих групп, отобранных до развития заболевания, показало, что люди с развившимся впоследствии раком яичников имели повышенные концентрации трех соединений, образующихся по LOX-пути: производных линолевой кислоты 13-NODE (9-NODE и 9,12,13-THOME) и производного АА (8-HETE), а также образующегося по COX-пути производного LA (12,13-DHOME), т.е. определение профиля оксипинов может иметь прогностическое значение при данном виде заболевания. На текущий момент остается неясным, связаны ли эти изменения с ранними этапами заболевания или они отражают предрасположенность организма к возникновению заболевания.

Для колоректального рака в таблицу попали три работы: два исследования [46, 48] были опубликованы одними и теми же авторами со схожими методами. В одном случае [48] на выборке из 25 пациентов с КРР и 10 здоровых контролей показано, что у пациентов с КРР наблюдалось повышение 2,3-dinor-8-iso-PGF2 α и снижение концентрации метаболитов, синтезируемых по LOX-пути — 13-NODE, 19-HETE, 9-NODE и 12-keto-LTB4. В другом — с расширенным количеством пациентов (55 больных КРР, 52 контрольных образца и 34 паци-

ента с диагнозом энтерит) [46], было показано снижение концентрации 10 метаболитов, куда также преимущественно входили соединения, синтезируемые по LOX-пути — 9-NODE, 13-NODE, 15-KEDE, 15-HETE, 8-HETE, 5,15-diHETE, дополнительно наблюдалось снижение 12,13-DiHOME (CYP-пути) и трех метаболитов, синтезируемых по COX-пути (11-HETE, PGD2, 13,14-dihydro-15-keto-PGD2). В работе Guo et al. [47] на относительно небольшой выборке из 8 пациентов и 14 доноров наблюдалось повышение концентрации производных АА — 12-HETE и TXB2 — у пациентов с КРР.

Исследование профиля оксипинов в крови при гепатоцеллюлярной карциноме приведено в двух работах [50, 51], при этом в работе Fitian et al. [50] отмечается, что при метаболических исследованиях ГЦК важно проводить сравнение не только со здоровыми контролями, поскольку более 90% ГЦК диагностируются у пациентов с циррозом печени. Сравнение метаболических профилей, в том числе для пациентов с циррозом, может быть более клинически значимым, чем сравнение пациентов с ГЦК и здоровыми контролями. В работе Fitian et al. [50] было получено, что у пациентов с ГЦР наблюдалась повышенная концентрация как ПНЖК АА и DGLA, так и окисленных метаболитов, синтезирующихся по LOX-пути: 13-NODE + 9-NODE, 15-HETE, 12-HETE, по сравнению с пациентами с циррозом печени. В работе Gong et al. [51] детектировали 22 метаболита профиля оксипинов, из которых 17 соединений были повышены в сыворотке больных ГЦР, куда вошли как соединения, синтезируемые по COX-пути (PGF2 α , TXB2, PGEM, 6-keto-PGF1 α), так и большое количество LOX-метаболитов (LTE4, 5-HETE, 15-HETE, 12-HETE, 9-HETE, 8-HETE, 13-NODE, 9-NODE и CYP-метаболитов: 14,15-EET, 14,15-DHET, 5,6-EET, 5,6-DHET, 9,10-EpOME).

При немелкоклеточном раке легких [49] и раке предстательной железы [52] наблюдали увеличение производных АА — 11-HETE, 5-HETE и 15-HETE. В то же время в работе Zhen et al. [45] у пациентов с немелкоклеточным раком легкого при детекции 6 оксипинов обнаружили снижение концентрации двух липидных соединений — 13-NODE и АА. Данное различие может быть связано с особенностями подбора пациентов для исследований (в когортах пациентов): в работе Liu et al. [49] в исследование были включены 55 пациентов, из которых у 34 была III–IV стадия рака, тогда как в работе Zhen et al. [45] из 69 пациентов у 42 была I стадия.

Интересно отметить, что изменения в детектируемом количестве свободных ПНЖК в крови не коррелируют с изменениями образующих из них метаболитов. Например, детектируемая концентрация свободной АА в крови уменьшалась в случае РПЖ [52], но увеличивалась — в случае РЛ [49] и рака груди [44]. При РЛ также наблюдали снижение LA [49]. Эти данные подтверждают высказанное ранее предположение, что процессы, отвечающие за высвобождение ПНЖК из фосфолипидов и их перенос в кровь, и процессы, осуществляющие внутриклеточный метаболизм ПНЖК в оксипирины, имеют разную регуляцию и не связаны напрямую между собой [56].

На данный момент сложно обсуждать биологические процессы, лежащие в основе наблюдаемых различий, поскольку исследования профилей оксипиринов только начинаются и необходимы дальнейшие скрининговые исследования. Тем не менее, как диагностические маркеры, профили оксипиринов уже обсуждаются. Для оценки эффективности предлагаемых диагностических маркеров часто используют показатель площади под характеристической кривой ошибок, обозначаемый ROC-AUC. Чем больше площадь под кривой ROC в диапазоне от 0 до 1, тем лучше предлагаемый тест различает пациентов с наличием болезни или без нее. Данный показатель был рассчитан в ряде работ, где предложили использовать профили оксипиринов как маркеры диагностики различных видов заболевания [45, 46, 49, 51]. При анализе плазмы пациентов с HMPЛ отмечалось снижение концентрации 13-NODE и АА по сравнению со здоровыми контролями, и эти липидные медиаторы были предложены как диагностическая панель; значение ROC-AUC для метода опорных векторов составило 0,900, а средняя точность предсказания составила 0,852 [45]. Для разделения группы пациентов с КРР и группы пациентов без КРР предложена панель — 13,14-dihydro-15-keto-PGD2, 15-KEDE, 11-NETE, 15-NETE, 8-NETE и 5,15-diNETE, поскольку значение ROC-AUC для этих оксипиринов составило 0,9 [46]. Для заболевания ГЦК предложена диагностическая панель из 4 эйкозаноидов сыворотки — PGF2 α , TXB2, 5-NETE и 15-NETE, для которой значение ROC-AUC составило 0,843 при отделении пациентов с ГЦК от здоровых контролей [51]. Интересно, что при разделении больных ГЦК и здоровых доноров с помощью альфа-фетопротейна (АФП), традиционного маркера крови для диагностики ГЦК, значение ROC-AUC составило 0,832, что схоже с результатами панели оксипиринов. В то же

время при разделении больных ГЦК и больных с циррозом печени, вызванным вирусом гепатита В, значение ROC-AUC для маркера АФП составило 0,657, а для панели оксипиринов — 0,784, т.е. использование панели оксипиринов дает более точное определение, чем традиционный маркер [51]. В работе Fitian et al. [50] при анализе сыворотки пациентов с ГЦК 15-NETE идентифицирован, как потенциально важный метаболический признак ГЦК, обладающий чувствительностью 83,3 и специфичностью 59,3 для диагностики (значение ROC-AUC составило 0,705). При исследовании профилей оксипиринов у больных РЛ показано, что АА, LA и 15-NETE продемонстрировали наилучшее сочетание чувствительности и специфичности ($> 0,70$) и значение ROC-AUC (диапазон 0,76–0,82) для разделения больных с РЛ и здоровых доноров [49]. Таким образом, в настоящее время уже идут перспективные исследования по использованию оксипиринов как диагностических маркеров при различных онкологических заболеваниях.

На рис. 2 приведена общая схема путей метаболизма ПНЖК и их наиболее часто встречающиеся окисленные метаболиты. Изменения в концентрациях соединений, выявленных в работах, рассмотренных в таблице, дополнительно выделены синим полужирным цветом. Среди оксипиринов, синтезирующихся по СОХ-пути, в крови человека изменения наблюдали только для метаболитов производных АА; для метаболитов, образующихся по СYP-пути, наблюдали изменение метаболитов LA и АА (рис. 2). Наиболее выраженные изменения в оксипиринах крови происходят с метаболитами LOX-пути — меняются метаболиты всех 6 приведенных кислот (рис. 2). Важно отметить, что изменение концентраций метаболитов, синтезируемых по LOX-пути, характерно для всех указанных в таблице типов рака. В зависимости от типа заболевания вовлеченность других путей биосинтеза оксипиринов менялась, но очевидно, что происходит одновременная трансформация ПНЖК по различным метаболическим путям (таблица). Пока непонятно, какие процессы отражают составы смесей оксипиринов в крови, как на них влияет вид, стадия заболевания или терапевтические подходы.

Известно, что оксипирины способны синтезироваться непосредственно в клетках опухоли [2, 57], в пораженном органе вокруг опухоли [57], в клетках крови [58, 59], эндотелиальных клетках сосудов [60] и других частях организма [3]. Что вносит основной вклад

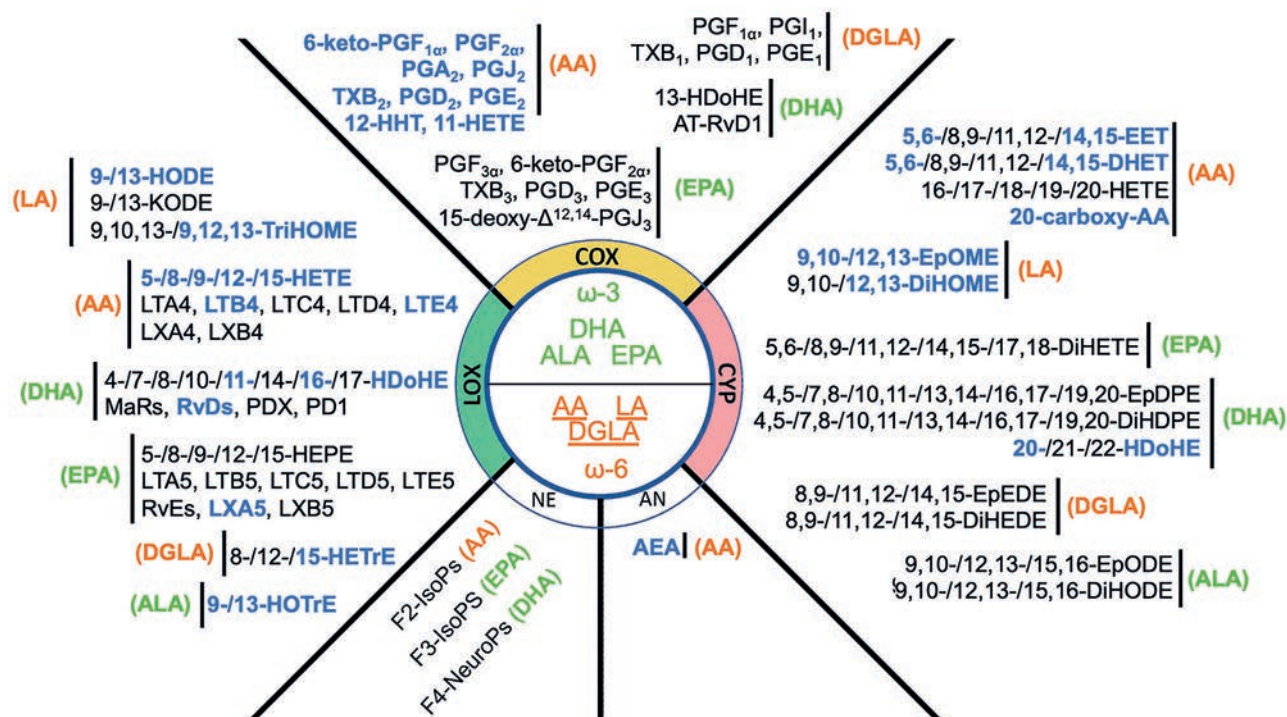


Рис. 2. Схема превращений полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) в наиболее распространенные оксипирины по различным путям метаболизма. Синим полужирным цветом выделены соединения, изменившиеся в профилях оксипиринов пациентов с онкологическими заболеваниями. Аббревиатуры: COX — циклооксигеназа; LOX — липоксигеназа; CYP — цитохром P450; NE — неферментативное окисление; AN — путь биосинтеза анандамида; AA — арахидоновая кислота; DHA — докозагексаеновая кислота; LA — линолевая кислота; ALA — α-линоленовая кислота; EPA — эйкозапентаеновая кислота; DGLA — дигомо-γ-линоленовая кислота; HETE — гидроксикоикозатетраеновые кислоты; HDoHE — гидроксидокозагексеновые кислоты; HODE — гидроксикоикозадекадиеновая кислота; EET — эпоксиэйкоза-триеновые кислоты; HOTrE — гидроксикоикозатетраеновая кислота; LTB4 — лейкотриен E4; TriHOME — тригидроксикоикозадекадиеновая кислота; PG — простагландины; TX — тромбоксаны; HHT — гидроксигептадекатриеновые кислоты; DHET — дигидроксикоикозатриеновые кислоты; DiHOME — дигидроксикоикозадекадиеновые кислоты; EpOME — эпоксиоктадекадиеновые кислоты; AEA — анандамид; IsoPs — изопростаны; NeuroPs — нейлопростаны; RVD — резольвины серии D

в профиль оксипиринов в крови (сыворотке или плазме)? Это непосредственно клетки опухоли, окружение опухоли или уже общий системный ответ организма на заболевание? На данный момент этот вопрос остается открытым.

Исследования профилей оксипиринов активно проводятся последние годы. На данный момент установлено, что профиль оксипиринов имеет как общие, так и специфические характеристики для каждого заболевания (таблица). В ряде работ обсуждается использование профилей оксипиринов как диагностических маркеров онкологических заболеваний. В то же время требуется дальнейшее накопление данных для анализа возможностей диагностики различных видов рака, определения их стадий или прогнозов выживаемости пациентов на основе профилей оксипиринов. Важны, в свою очередь, и академические исследования для выяснения функционирования метаболизма оксипиринов на системном

уровне, что позволит комплексно понимать механизмы процессов, возникающих в ходе жизни организма, а также его реакции на стимулы и нарушения в процессах восстановления гомеостаза.

Вклад авторов. Д.В. Чистяков, М.Г. Сергеева — концепция и руководство работой; Д.В. Чистяков, М.Г. Сергеева, Л.В. Коваленко, М.Ю. Донников — написание текста; Д.В. Чистяков, М.Г. Сергеева — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2022-05-04.

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. Сергеева М. Г., Варфоломеева А. Т. (2006) *Каскад арахидоновой кислоты*, Народное образование, Москва.
2. Gabbs, M., Leng, S., Devassy, J. G., Monirujjaman, M., and Aukema, H. M. (2015) Advances in our understanding of oxylipins derived from dietary PUFAs, *Adv. Nutr.*, **6**, 513-540, doi: 10.3945/an.114.007732.
3. Hajeyah, A. A., Griffiths, W. J., Wang, Y., Finch, A. J., and O'Donnell, V. B. (2020) The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids, *Front. Endocrinol.*, **11**, 591819, doi: 10.3389/FENDO.2020.591819.
4. Генрихс Е. Е., Бобров М. Ю., Андрианова Е. Л., Грецкая Н. М., Лыжин А. А., Блаженкова А. В., Фрумкина Л. Е., Безуглов В. В., Хаспеков Л. Г. (2010) Модуляторы эндогенной каннабиноидной системы как нейропротекторы, *Анналы клин. эксп. неврол.*, **4**, 37-42.
5. Buczynski, M. W., Dumlao, D. S., and Dennis, E. A. (2009) An integrated omics analysis of eicosanoid biology, *J. Lipid Res.*, **50**, 1015-1038, doi: 10.1194/jlr.R900004-JLR200.
6. Johnson, A. M., Kleczko, E. K., and Nemenoff, R. A. (2020) Eicosanoids in cancer: new roles in immunoregulation, *Front. Pharmacol.*, **11**, 595498, doi: 10.3389/FPHAR.2020.595498.
7. Dennis, E. A., and Norris, P. C. (2015) Eicosanoid storm in infection and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.*, **15**, 511-523, doi: 10.1038/nri3859.
8. Serhan, C. N. (2014) Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology, *Nature*, **510**, 92-101, doi: 10.1038/nature13479.
9. Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Gilroy, D., Fasano, A., Miller, G., Miller, A., Mantovani, A., Weyand, C., Barzilai, N., Goronzy, J., Rando, T., Effros, R., Lucia, A., Kleinstreuer, N., and Slavich, G. (2019) Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span, *Nat. Med.*, **25**, 1822-1832, doi: 10.1038/S41591-019-0675-0.
10. Medzhitov, R. (2021) The spectrum of inflammatory responses, *Science*, **374**, 1070-1075, doi: 10.1126/SCIENCE.ABI5200.
11. Medzhitov, R. (2008) Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, **454**, 428-435, doi: 10.1038/nature07201.
12. Van Praet, L., Jacques, P., Van den Bosch, F., and Elewaut, D. (2012) The transition of acute to chronic bowel inflammation in spondyloarthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.*, **8**, 288-295, doi: 10.1038/nrrheum.2012.42.
13. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, **144**, 646-674, doi: 10.1016/J.CELL.2011.02.013.
14. Coussens, L. M., and Werb, Z. (2002) Inflammation and cancer, *Nature*, **420**, 860-867, doi: 10.1038/nature01322.
15. Акимов М. Г., Бобров М. Ю., Безуглов В. В., Коновалов С. С. (2009) *Липиды и рак: очерки липидологии онкологического процесса*, Прайм-Еврознак.
16. Schebb, N. H., Kühn, H., Kahnt, A. S., Rund, K. M., O'Donnell, V. B., Flamand, N., Peters-Golden, M., Jakobsson, P., Weylandt, K. H., Rohwer, N., Murphy, R. C., Geisslinger, G., FitzGerald, G. A., Hanson, J., Dahlgren, C., Alnouri, M. W., Offermanns, S., and Steinhilber, D. (2022) Formation, signaling and occurrence of specialized pro-resolving lipid mediators-what is the evidence so far? *Front. Pharmacol.*, **13**, 838782, doi: 10.3389/FPHAR.2022.838782.
17. Burla B., Arita M., Arita M., Bendt, A. K., Cazenave-Gassiot, A., Dennis, E. A., Ekroos, K., Han, X., Ikeda, K., Liebisch, G., Lin, M. K., Loh, T. P., Meikle, P. J., Orešič, M., Quehenberger, O., Shevchenko, A., Torta, F., Wakelam, M. J. O., Wheelock, C. E., and Wenk, M. R. (2018) MS-based lipidomics of human blood plasma: a community-initiated position paper to develop accepted guidelines, *J. Lipid Res.*, **59**, 2001-2017, doi: 10.1194/jlr.S087163.
18. Morris, J. K., Piccolo, B. D., John, C. S., Green, Z. D., Thyfault, J. P., and Adams, S. H. (2019) Oxylipin profiling of Alzheimer's disease in nondiabetic and type 2 diabetic elderly, *Metabolites*, **9**, 177, doi: 10.3390/metabo9090177.
19. Gao, B., Lang, S., Duan, Y., Wang, Y., Shawcross, D. L., Louvet, A., Mathurin, P., Ho, S. B., Stärkel, P., and Schnabl, B. (2019) Serum and fecal oxylipins in patients with alcohol-related liver disease, *Digest. Dis. Sci.*, **64**, 1878-1892, doi: 10.1007/s10620-019-05638-y.
20. Quehenberger, O., Armando, A. M., Brown, A. H., Milne, S. B., Myers, D. S., Merrill, A. H., Bandyopadhyay, S., Jones, K. N., Kelly, S., Shaner, R. L., Sullards, C. M., Wang, E., Murphy, R. C., Barkley, R. M., Leiker, T. J., Raetz, C. R., Guan, Z., Laird, G. M., Six, D. A., Russell, D. W., McDonald, J. G., Subramaniam, S., Fahy, E., and Dennis, E. A. (2010) Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma, *J. Lipid Res.*, **51**, 3299-3305, doi: 10.1194/JLR.M009449.
21. Huynh, K., Barlow, C. K., Jayawardana, K. S., Weir, J. M., Mellett, N. A., Cinel, M., Magliano, D. J., Shaw, J. E., Drew, B. G., and Meikle, P. J. (2019) High-throughput plasma lipidomics: detailed mapping of the associations with cardiometabolic risk factors, *Cell Chem. Biol.*, **26**, 71-84.e4, doi: 10.1016/J.CHEMBIOL.2018.10.008.
22. Lam, S. M., Tian, H., and Shui, G. (2017) Lipidomics, en route to accurate quantitation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, **1862**, 752-761, doi: 10.1016/J.BBALIP.2017.02.008.

23. Bowden, J. A., Heckert, A., Ulmer, C. Z., Jones, C. M., Koelmel, J. P., Abdullah, L., Ahonen, L., Alnouti, Y., Armando, A. M., Asara, J. M., Bamba, T., Barr, J. R., Bergquist, J., Borchers, C. H., Brandsma, J., Breitkopf, S. B., Cajka, T., Cazenave-Gassiot, A., Checa, A., Cinel, M. A., Colas, R. A., Cremers, S., Dennis, E. A., Evans, J. E., Fauland, A., Fiehn, O., Gardner, M. S., Garrett, T. J., Gotlinger, K. H., Han, J., Huang, Y., Neo, A. H., Hyötyläinen, T., Izumi, Y., Jiang, H., Jiang, H., Jiang, J., Kachman, M., Kiyonami, R., Klavins, K., Klose, C., Köfeler, H. C., Kolmert, J., Koal, T., Koster, G., Kuklenyik, Z., Kurland, I. J., Leadley, M., Lin, K., Maddipati, K. R., McDougall, D., Meikle, P. J., Mellett, N. A., Monnin, C., Moseley, M. A., Nandakumar, R., Oresic, M., Patterson, R., Peake, D., Pierce, J. S., Post, M., Postle, A. D., Pugh, R., Qiu, Y., Quehenberger, O., Ramrup, P., Rees, J., Rembiesa, B., Reynaud, D., Roth, M. R., Sales, S., Schuhmann, K., Schwartzman, M. L., Serhan, C. N., Shevchenko, A., Somerville, S. E., St John-Williams, L., Surma, M. A., Takeda, H., Thakare, R., Thompson, J. W., Torta, F., Triebel, A., Trötschmüller, M., Ubhayasekera, S. J. K., Vuckovic, D., Weir, J. M., Welti, R., Wenk, M. R., Wheelock, C. E., Yao, L., Yuan, M., Zhao, X. H., and Zhou, S. (2017) Harmonizing lipidomics: NIST interlaboratory comparison exercise for lipidomics using SRM 1950-metabolites in frozen human plasma, *J. Lipid Res.*, **58**, 2275-2288, doi: 10.1194/JLR.M079012.
24. Mainka, M., Dalle, C., Pétéra, M., Dalloux-Chioccioli, J., Kampschulte, N., Ostermann, A. I., Rothe, M., Bertrand-Michel, J., Newman, J. W., Gladine, C., and Schebb, N. H. (2020) Harmonized procedures lead to comparable quantification of total oxylipins across laboratories, *J. Lipid Res.*, **61**, 1424-1436, doi: 10.1194/jlr.RA120000991.
25. Koch, E., Mainka, M., Dalle, C., Ostermann, A. I., Rund, K. M., Kutzner, L., Froehlich, L. F., Bertrand-Michel, J., Gladine, C., and Schebb, N. H. (2020) Stability of oxylipins during plasma generation and long-term storage, *Talanta*, **217**, 121074, doi: 10.1016/j.talanta.2020.121074.
26. Liakh, I., Pakiet, A., Sledzinski, T., and Mika, A. (2020) Methods of the analysis of oxylipins in biological samples, *Molecules*, **25**, 349, doi: 10.3390/molecules25020349.
27. Frezza, C. (2020) Metabolism and cancer: the future is now, *Br. J. Cancer*, **122**, 133-135, doi: 10.1038/s41416-019-0667-3.
28. Koundouros, N., and Poulogiannis, G. (2020) Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer, *Br. J. Cancer*, **122**, 4-22, doi: 10.1038/S41416-019-0650-Z.
29. Butler, L. M., Perone, Y., Dehairs, J., Lupien, L. E., de Laat, V., Talebi, A., Loda, M., Kinlaw, W. B., and Swinnen, J. V. (2020) Lipids and cancer: emerging roles in pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **159**, 245-293, doi: 10.1016/j.addr.2020.07.013.
30. Pakiet, A., Kobiela, J., Stepnowski, P., Sledzinski, T., and Mika, A. (2019) Changes in lipids composition and metabolism in colorectal cancer: a review, *Lipids Health Dis.*, **18**, 29, doi: 10.1186/S12944-019-0977-8.
31. Wang, D., and DuBois, R. N. (2018) Role of prostanoids in gastrointestinal cancer, *J. Clin. Invest.*, **128**, 2732-2742, doi: 10.1172/JCI97953.
32. Patrignani, P., Sacco, A., Sostres, C., Bruno, A., Dovizio, M., Piazuelo, E., Di Francesco, L., Contursi, A., Zucchelli, M., Schiavone, S., Tacconelli, S., Patrono, C., and Lanasa, A. (2017) Low-dose aspirin acetylates cyclooxygenase-1 in human colorectal mucosa: implications for the chemoprevention of colorectal cancer, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **102**, 52-61, doi: 10.1002/CPT.639.
33. Edin, M. L., Duval, C., Zhang, G., and Zeldin, D. C. (2020) Role of linoleic acid-derived oxylipins in cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, **39**, 581-582, doi: 10.1007/s10555-020-09904-8.
34. Azrad, M., Turgeon, C., and Demark-Wahnefried, W. (2013) Current evidence linking polyunsaturated fatty acids with cancer risk and progression, *Front. Oncol.*, **3**, 224, doi: 10.3389/FONC.2013.00224.
35. Markosyan, N., Chen, E. P., and Smyth, E. M. (2014) Targeting COX-2 abrogates mammary tumorigenesis: breaking cancer-associated suppression of immunosurveillance, *Oncoimmunology*, **3**, e29287, doi: 10.4161/ONCI.29287.
36. Schneider, C., and Pozzi, A. (2011) Cyclooxygenases and lipoxygenases in cancer, *Cancer Metastasis Rev.*, **30**, 277-294, doi: 10.1007/S10555-011-9310-3.
37. Catalano, A., and Procopio, A. (2005) New aspects on the role of lipoxygenases in cancer progression, *Histol. Histopathol.*, **20**, 969-975, doi: 10.14670/HH-20.969.
38. Wang, Q., Morris, R. J., Bode, A. M., and Zhang, T. (2022) Prostaglandin pathways: opportunities for cancer prevention and therapy, *Cancer Res.*, **82**, 949-965, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-2297.
39. Luo, Y., and Liu, J. Y. (2020) Pleiotropic functions of cytochrome *p450* monooxygenase-derived eicosanoids in cancer, *Front. Pharmacol.*, **11**, 580897, doi: 10.3389/FPHAR.2020.580897.
40. Mahapatra, A. D., Choubey, R., and Datta, B. (2020) Small molecule soluble epoxide hydrolase inhibitors in multitarget and combination therapies for inflammation and cancer, *Molecules*, **25**, 5488, doi: 10.3390/MOLECULES25235488.
41. Bruno, R. D., and Njar, V. C. O. (2007) Targeting cytochrome P450 enzymes: a new approach in anti-cancer drug development, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 5047-5060, doi: 10.1016/J.BMC.2007.05.046.

42. Laezza, C., Pagano, C., Navarra, G., Pastorino, O., Proto, M. C., Fiore, D., Piscopo, C., Gazzerro, P., and Bifulco, M. (2020) The endocannabinoid system: a target for cancer treatment, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 747, doi: 10.3390/IJMS21030747.
43. Chocholoušková, M., Jirásko, R., Vrána, D., Gatěk, J., Melichar, B., and Holčápek, M. (2019) Reversed phase UHPLC/ESI-MS determination of oxylipins in human plasma: a case study of female breast cancer, *Anal. Bioanal. Chem.*, **411**, 1239-1251, doi: 10.1007/s00216-018-1556-y.
44. Chistyakov, D. V., Guryleva, M. V., Stepanova, E. S., Makarenkova, L. M., Ptitsyna, E. V., Goriainov, S. V., Nikolskaya, A. I., Astakhova, A. A., Klimenko, A. S., Bezborodova, O. A., Rasskazova, E. A., Potanina, O. G., Abramovich, R. A., Nemtsova, E. R., and Sergeeva, M. G. (2022) Multi-omics approach points to the importance of oxylipins metabolism in early-stage breast cancer, *Cancers*, **14**, 2041, doi: 10.3390/cancers14082041.
45. Zheng, J., Zheng, Y., Li, W., Zhi, J., Huang, X., Zhu, W., Liu, Z., and Gong, L. (2022) Combined metabolomics with transcriptomics reveals potential plasma biomarkers correlated with non-small-cell lung cancer proliferation through the Akt pathway, *Clin. Chim. Acta*, **530**, 66-73, doi: 10.1016/J.CCA.2022.02.018.
46. Zhang, J., Yang, Q., Li, J., Zhong, Y., Zhang, L., Huang, Q., Chen, B., Mo, M., Shen, S., Zhong, Q., Liu, H., and Cai, C. (2017) Distinct differences in serum eicosanoids in healthy, enteritis and colorectal cancer individuals, *Metabolomics*, **14**, 4, doi: 10.1007/S11306-017-1293-9.
47. Guo, J., Pan, Y., Chen, J., Jin, P., Tang, S., Wang, H., Su, H., Wang, Q., Chen, C., Xiong, F., Liu, K., Li, Y., Su, M., Tang, T., He, Y., and Sheng, J. (2023) Serum metabolite signatures in normal individuals and patients with colorectal adenoma or colorectal cancer using UPLC-MS/MS method, *J. Proteomics*, **270**, 104741, doi: 10.1016/J.JPROT.2022.104741.
48. Zhang, L. J., Chen, B., Zhang, J. J., Li, J., Yang, Q., Zhong, Q. S., Zhan, S., Liu, H., and Cai, C. (2017) Serum polyunsaturated fatty acid metabolites as useful tool for screening potential biomarker of colorectal cancer, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **120**, 25-31, doi: 10.1016/J.PLEFA.2017.04.003.
49. Liu, J., Mazzone, P. J., Cata, J. P., Kurz, A., Bauer, M., Mascha, E. J., and Sessler, D. I. (2014) Serum free fatty acid biomarkers of lung cancer, *Chest*, **146**, 670-679, doi: 10.1378/CHEST.13-2568.
50. Fitian, A. I., Nelson, D. R., Liu, C., Xu, Y., Ararat, M., and Cabrera, R. (2014) Integrated metabolomic profiling of hepatocellular carcinoma in hepatitis C cirrhosis through GC/MS and UPLC/MS-MS, *Liver Int.*, **34**, 1428-1444, doi: 10.1111/LIV.12541.
51. Gong, Z. G., Zhao, W., Zhang, J., Wu, X., Hu, J., Yin, G. C., and Xu, Y. J. (2017) Metabolomics and eicosanoid analysis identified serum biomarkers for distinguishing hepatocellular carcinoma from hepatitis B virus-related cirrhosis, *Oncotarget*, **8**, 63890-63900, doi: 10.18632/ONCOTARGET.19173.
52. Rodríguez-Blanco, G., Burgers, P. C., Dekker, L. J. M., Ijzermans, J. J. N., Wildhagen, M. F., Schenk-Braat, E. A. M., Bangma, C. H., Jenster, G., and Luidier, T. M. (2014) Serum levels of arachidonic acid metabolites change during prostate cancer progression, *Prostate*, **74**, 618-627, doi: 10.1002/PROS.22779.
53. Pruimboom, W. M., Bac, D. J., van Dijk, A. P. M., Garrelds, I. M., Tak, C. J., Bonta, I. L., Wilson, J. H., and Zijlstra, F. J. (1995) Levels of soluble intercellular adhesion molecule 1, eicosanoids and cytokines in ascites of patients with liver cirrhosis, peritoneal cancer and spontaneous bacterial peritonitis, *Int. J. Immunopharmacol.*, **17**, 375-384, doi: 10.1016/0192-0561(95)00015-T.
54. Hada, M., Edin, M. L., Hartge, P., Lih, F. B., Wentzensen, N., Zeldin, D. C., and Trabert, B. (2019) Prediagnostic serum levels of fatty acid metabolites and risk of ovarian cancer in the prostate, lung, colorectal, and ovarian (PLCO) cancer screening trial, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **28**, 189-197, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0392.
55. Wu, C. C., Gupta, T., Garcia, V., Ding, Y., and Schwartzman, M. L. (2014) 20-HETE and blood pressure regulation: clinical implications, *Cardiol. Rev.*, **22**, 1-12, doi: 10.1097/CRD.0B013E3182961659.
56. Murakami, M., Sato, H., and Taketomi, Y. (2020) Updating phospholipase A2 biology, *Biomolecules*, **10**, 1-33, doi: 10.3390/BIOM10101457.
57. Nagarajan, S. R., Butler, L. M., and Hoy, A. J. (2021) The diversity and breadth of cancer cell fatty acid metabolism, *Cancer Metab.*, **9**, 2, doi: 10.1186/s40170-020-00237-2.
58. Yeung, J., Hawley, M., and Holinstat, M. (2017) The expansive role of oxylipins on platelet biology, *J. Mol. Med.*, **95**, 575-588, doi: 10.1007/s00109-017-1542-4.
59. Lone, A. M., and Taskén, K. (2013) Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells, *Front. Immunol.*, **4**, 130, doi: 10.3389/FIMMU.2013.00130.
60. Bogatcheva, N. V., Sergeeva, M. G., Dudek, S. M., and Verin, A. D. (2005) Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology, *Microvasc. Res.*, **69**, 107-127, doi: 10.1016/j.mvr.2005.01.007.

BLOOD OXYLIPIN PROFILES AS A MARKER OF THE PATHOGENESIS OF ONCOLOGICAL DISEASES

Mini-Review

D.V. Chistyakov^{1*}, L. V. Kovalenko², M. Y. Donnikov², and M. G. Sergeeva¹

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: chistyakov@gmail.com*

² *Surgut State University, 628412 Ugra, Surgut, Russia*

Oxylipins are signal lipids derived from polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are formed by polyenzymatic multi-acid pathways of danger (cyclooxygenase, lipoxygenase, epoxygenase, anandamide), as well as non-enzymatically. These PUFA transformation pathways are activated in parallel, forming a mixture of active inclusions. Although the combination of oxylipins with tumor secretions was performed a long time ago, the methods of instrumental analysis have only recently been improved, measurements of oxylipins of different classes (profiles) have been compared. The review considers approaches to obtaining the profile of oxylipins by HPLC-MS/MS. The profiles of oxylipins in samples of patients with oncological diseases (breast cancer, colorectal cancer, ovarian cancer, lung cancer, prostate cancer, liver cancer) were compared. The conclusion is made about the possible possibilities of using the profile of blood oxylipins as markers of oncological diseases. Understanding the high level of exceeding the level of PUFAs and the physiological activity of oxylipin mixtures will be accompanied by the perfection of early diagnosis and prediction of the course of tumor diseases.

Keywords: oxylipins, eicosanoids, oncology, metabolomics, lipid profile, polyunsaturated fatty acids

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ЭФФЕКТОВ МЕЖЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НА СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТУЮ СИСТЕМУ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА СВЯЗЕЙ «СТРУКТУРА–АКТИВНОСТЬ»

© 2023 В.С. Сухачёв*, С.М. Иванов, А.В. Дмитриев

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, Россия; электронная почта: withstanding@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.02.2023

После доработки 17.03.2023

Принята к публикации 17.03.2023

Совместное применение лекарственных средств часто приводит к межлекарственным взаимодействиям, которые могут сопровождаться различными нежелательными лекарственными реакциями (НЛР), представляющими угрозу для жизни и здоровья пациентов. Воздействие, обусловленное НЛР на сердечно-сосудистую систему, является одним из наиболее значимых проявлений межлекарственных взаимодействий (МЛВ). Клиническая оценка НЛР, возникающих в результате МЛВ между всеми используемыми в терапевтической практике парами лекарств, невозможна. Цель данной работы заключалась в построении при помощи анализа «структура–активность» (Q)SAR-моделей для прогнозирования НЛР со стороны сердечно-сосудистой системы, опосредованных взаимодействиями между парами лекарств при их совместном приёме. Данные о неблагоприятных эффектах, возникающих в результате МЛВ, были получены из базы данных DrugBank. Необходимые для построения точных (Q)SAR-моделей данные о парах лекарств, которые не вызывают соответствующие эффекты, получены из базы данных TwoSides, содержащей результаты анализа спонтанных сообщений. Для описания пары структур лекарств были использованы два типа дескрипторов: RoSMNA-дескрипторы и вероятностные оценки прогноза биологических активностей, полученные при помощи программы PASS. Связи «структура–активность» были установлены с использованием метода «Random Forest». Точность прогноза была вычислена посредством пятикратного скользящего контроля. Наибольшие значения точности были получены с использованием вероятностных оценок PASS в качестве дескрипторов. Площадь под ROC-кривой составила 0,94 – для брадикардии, 0,96 – для тахикардии, 0,90 – для аритмии, 0,90 – для удлинения QT-интервала на ЭКГ, 0,91 – для гипертонии и 0,89 – для гипотонии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межлекарственные взаимодействия; (Q)SAR; нежелательные лекарственные реакции.

DOI: 10.31857/S0320972523050068, **EDN:** AXVAFQ

ВВЕДЕНИЕ

Приём лекарственных средств (ЛС) сопряжён с риском возникновения нежелательных лекарственных реакций (НЛР), некоторые из которых могут нести серьёзные риски для жизни и здоровья пациентов [1, 2]. Зачастую возникновение НЛР связано с нежелательным взаимодействием лиганда со сторонней, не связанной с терапевтическим эффектом, мишенью в организме человека как напрямую, так и опосредованно через метаболиты, обра-

зующиеся в результате биотрансформации. Данная проблема усугубляется в случае, когда осуществляется приём нескольких ЛС одновременно [3]. Поскольку число потенциальных мишеней и число связанных с ними сигнальных и метаболических путей при совместном приёме становится значительно больше, чем в случае независимого друг от друга приёма лекарств, в ряде случаев создаются условия для существенного роста риска возникновения НЛР. О большинстве клинически значимых межлекарственных взаимодействий (МЛВ)

Принятые сокращения: ЛС – лекарственное средство; МЛВ – межлекарственные взаимодействия; НЛР – нежелательные лекарственные реакции; AUC – площадь под ROC-кривой; MNA – многоуровневые окрестности атомов; PRR – пропорциональные коэффициенты отчётности.

* Адресат для корреспонденции.

становится известно, как правило, постфактум [4]. В частности, пункт 4 статьи 64 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» регламентирует обязанность производителей лекарственных препаратов собирать данные о МЛВ и принимать меры в случае, если они вызывают угрожающие здоровью последствия. В свою очередь, недостаточная информированность врачей о рисках МЛВ также является причиной большого числа НЛР у пациентов. Для иллюстрации данного факта достаточно указать на то, что большинство врачебных рекомендаций составляются под одну нозологию, а рекомендации на случаи мультиморбидности зачастую отсутствуют [5]. Данная проблема особенно актуальна для педиатрии, где среднее количество нозологий в зависимости от возраста может варьироваться от 4 до 10 [6].

Одним из важнейших источников знаний о НЛР, и в особенности о МЛВ, является анализ спонтанных сообщений [7]. Спонтанное сообщение (англ. spontaneous report) — это извещение о возникновении НЛР, не задокументированной на стадии клинических испытаний лекарств, поданное в контрольные органы. Главным же недостатком метода спонтанных сообщений можно назвать тот факт, что не все медицинские работники пользуются им по ряду причин [8].

Алгоритмы анализа спонтанных сообщений в том или ином виде основаны на нахождении соотношения частот встречаемости (отношения шансов) для поиска ассоциаций между лекарствами или их комбинациями и НЛР [9].

По состоянию на 2013 г., НЛР, связанные с МЛВ, составили 19,8% всех спонтанных сообщений, полученных Росздравнадзором [10]. В Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (англ. Food and Drug Administration, FDA) ежегодно поступает приблизительно 0,25 миллиона сообщений, среди которых на МЛВ приходится порядка 30% [11].

Вследствие этого возникает необходимость в прогнозировании МЛВ на как можно более ранней стадии разработки ЛС и на ранней стадии применения препарата в клинической практике [12]. Это позволит избежать как ущерба для здоровья пациентов, так и экономических издержек для представителей фармацевтической промышленности. Метод прогноза МЛВ должен предоставить возможность предсказывать конкретные НЛР при приёме парных комбинаций ЛС, что, в свою очередь, позволит быстрее и эффективнее отслеживать НЛР в целом. На данный момент существуют

методы предсказания МЛВ, опирающиеся на различные биомедицинские данные, такие как профили экспрессии генов [13], молекулярные сети белок-белковых взаимодействий [14] или же данные молекулярной динамики [15]. Используемые в подобных работах методы построения моделей также отличаются, начиная с методов анализа сети взаимодействия белков [14] и заканчивая методами машинного обучения [16]. Все эти подходы объединяет повышенная трудоёмкость как при сборе данных, так и непосредственно при построении моделей, заключающаяся в поиске данных по белок-белковым взаимодействиям и адекватном описании системы.

Модели для предсказания НЛР, вызванных МЛВ, уже существуют, но имеют ряд недостатков. В частности, найденные в литературе модели не способны выполнить прогноз для новых соединений, поскольку они основаны на данных об известных мишенях [16]. Другие модели используют данные, полученные из спонтанных сообщений без предварительной обработки [17], что снижает точность прогноза из-за неточного представления связей между лекарствами и НЛР.

Цель данной работы заключалась в построении моделей для прогнозирования НЛР со стороны сердечно-сосудистой системы, обусловленных МЛВ между парами лекарств, на основе анализа связей «структура–активность» (англ. (Quantitative) Structure-Activity Relationships, (Q)SAR) с использованием данных из открытых источников и результатов анализа спонтанных сообщений, в частности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение данных об эффектах межлекарственных взаимодействий. Данные о неблагоприятных эффектах МЛВ были получены из базы данных DrugBank [18] и приведены к табличному виду с помощью процедуры парсинга с использованием регулярных выражений на языке R: 4.2.1 (2022-06-23) (<https://www.r-project.org>) в среде RStudio 2021.09.0+351 «Ghost Orchid». Названия НЛР были заменены на синонимичные названия в соответствии с медицинским словарём для регуляторной деятельности MedDRA (<https://www.meddra.org/>). Таким образом было получено 127 294 пары лекарств, состоящих из 1632 индивидуальных соединений и ассоциированных с шестью сердечно-сосудистыми НЛР: аритмией, тахикардией, брадикардией, удлинением интервала QT на электрокардиограмме, гипертензией и гипотензией.

Получение отрицательных примеров. Полученные данные представлены парами лекарств, взаимодействие которых приводит к возникновению шести НЛР. Для построения (Q)SAR-моделей этого недостаточно, поскольку обучающая выборка в равной мере должна включать как связанные с НЛР пары лекарств («положительные примеры»), так и те пары, которые однозначно не связаны с рассматриваемым эффектом («отрицательные примеры»).

В рамках данной работы применялся подход, согласно которому отрицательными примерами считались те пары, для которых имеется информация о способности вызывать какие-либо эффекты, кроме исследуемого. Наличие такой информации для пары лекарств свидетельствует об изученности её профиля эффектов МЛВ и повышает вероятность отсутствия исследуемого эффекта в соответствующем профиле. Информация о парах лекарств, которые с высокой вероятностью не вызывают исследуемые НЛР, была получена из базы данных TwoSides [19]. TwoSides предоставляет результаты анализа диспропорциональности, примененного к данным из спонтанных сообщений [20]. Каждое спонтанное сообщение содержит информацию о лекарствах, которые принимал пациент, и о возникших НЛР. Сущность анализа диспропорциональности заключается в сравнении доли сообщений по лекарству, где упоминается НЛР, к доле соответствующих сообщений в базе по всем лекарствам с последующим расчётом величины Proportional Reporting Ratio (PRR). Эта величина отражает силу и вероятность связи между лекарством и НЛР [19]. TwoSides предоставляет информацию о величинах PRR, вычисленных для индивидуальных лекарств и их пар, по отношению ко всем НЛР. Ранее было показано, что соответствующая информация может быть использована для предсказания пар лекарств, которые способны и, наоборот, не способны вызывать конкретные НЛР [7]. Информация о НЛР для пар лекарств из TwoSides была дополнена информацией о НЛР одиночных лекарств из базы данных OffSides. Первая содержит информацию о PRR и его стандартной ошибке для пар лекарств и НЛР, вторая содержит те же параметры, но уже для индивидуальных лекарств, а не для пар. Обе выборки были объединены таким образом, что конечная выборка содержала следующие величины:

PRR, PRR1, PRR2 — величины, отражающие силу и вероятность связи с НЛР, относящиеся к паре и к отдельным лекарствам соответственно.

Поскольку спонтанные сообщения могут содержать ошибки и неточности, авторы баз данных TwoSides и OffSides предложили оценивать статистическую значимость величин PRR по логарифмической формуле (1):

$$\log(\text{PRR} \dots) - 1,96 \times \text{PRRError} \dots > \log 2, \quad (1)$$

где PRRError, PRRError1, PRRError2 — стандартные ошибки вычисления PRR.

Ассоциации пар лекарств с НЛР, удовлетворяющие данному неравенству, считаются значимыми, а прочие — незначимыми. Более подробное описание способов вычисления указанных выше величин можно получить из публикации базы данных TwoSides [19].

В рамках данной работы были выделены две группы ассоциаций пар с НЛР.

1. Ассоциации, в которых обе величины, PRR1 и PRR2, удовлетворяют неравенству (1). Такие ассоциации могут являться примерами аддитивного взаимодействия.

2. Ассоциации, в которых величина PRR для пары удовлетворяет неравенству (1) и превышает максимальную из двух величин PRR1 и PRR2. Такие ассоциации могут являться примерами синергетического взаимодействия.

Для дальнейшего анализа был составлен список пар, принадлежащих как минимум к одной из двух групп и ассоциированных хотя бы с двумя НЛР, относящимися к нарушениям сердечного ритма и артериального давления соответственно. Эти пары были исключены из дальнейшего рассмотрения, поскольку отрицательные примеры не должны содержать пар лекарств, ассоциированных с искомой НЛР. Оставшиеся пары, упоминающиеся хотя бы в 100 спонтанных сообщениях, были использованы в качестве отрицательных примеров (рис. 1).

Генерация дескрипторов. Для компьютерного описания структур каждой пары лекарств применялись два типа дескрипторов: биологические активности, предсказанные с помощью программы PASS [21], и PoSMNA-дескрипторы [22].

Дескрипторы на основе спектра биологической активности. Программа PASS позволяет прогнозировать 7017 видов биологической активности по структурной формуле соединения со средней точностью 0,96 и минимальной точностью 0,85. Спектр биологической активности PASS включает фармакотерапевтические эффекты, молекулярные механизмы действия, взаимодействие с ферментами метаболизма и транспортёрами, побочные и токсические эффекты, влияние на транскрипцию генов.

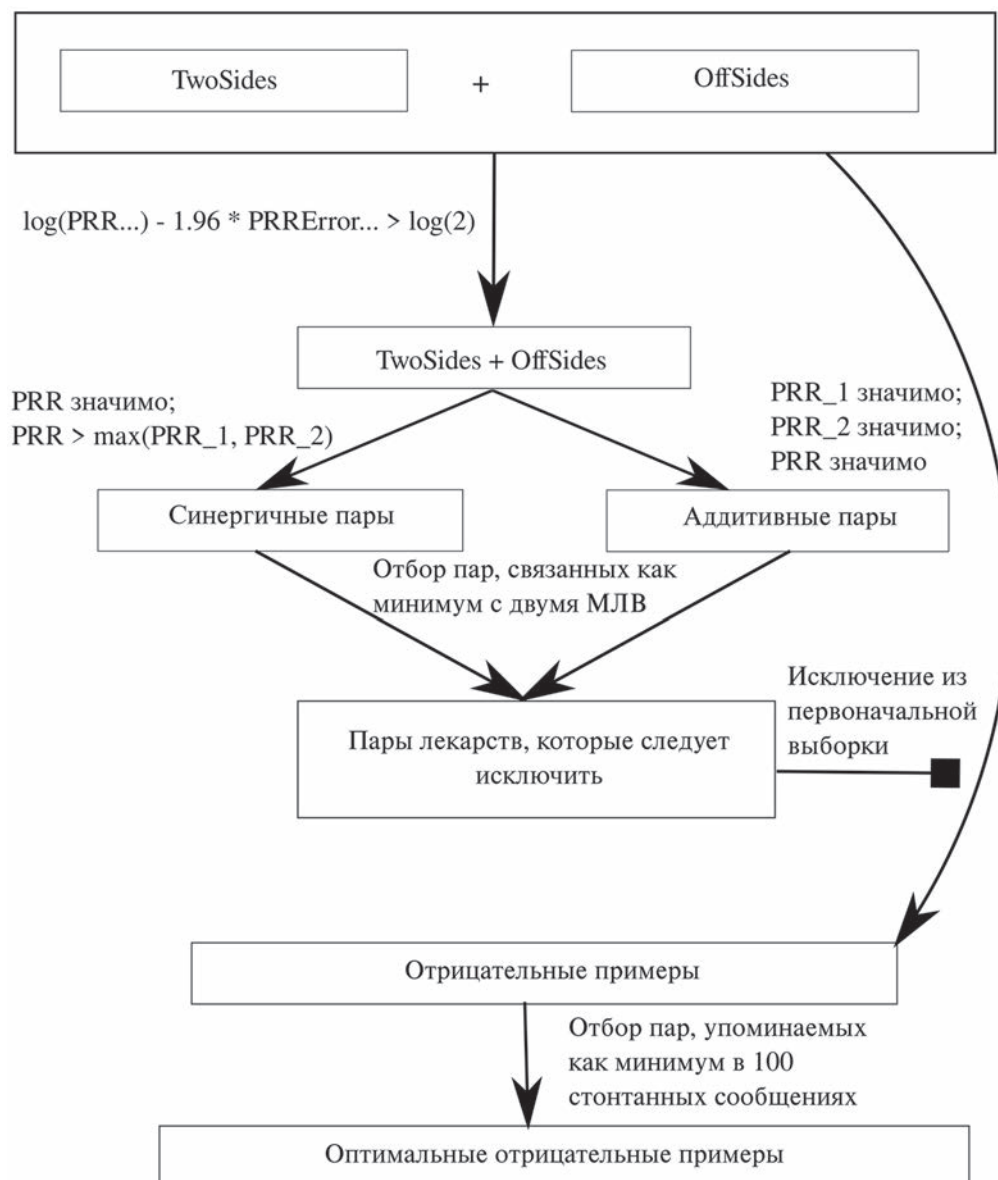


Рис. 1. Схема генерации отрицательных примеров с использованием баз данных TwoSides и OffSides

PASS вычисляет две оценки для каждой биологической активности: P_a — вероятность наличия активности и P_i — вероятность отсутствия активности. Для дальнейших вычислений была использована величина P , полученная на основе этих оценок, по формуле (2):

$$P = \frac{P_a}{P_a + P_i}, \quad (2)$$

где P_a — вероятность наличия активности, P_i — вероятность отсутствия активности, P — объединение P_a и P_i .

Возможные значения полученной величины P лежат в интервале от 0 до 1. Для вычисления числовых дескрипторов, описывающих пару соединений, были найдены нормализованные суммы и модули разностей величин P ,

полученных для индивидуальных соединений (P_1 и P_2) (формула (3)):

$$D_1 = \frac{P_1 + P_2}{2}; \quad D_2 = \frac{|P_1 - P_2|}{2}, \quad (3)$$

где P_1 и P_2 — величины, отражающие вероятность наличия активности для индивидуальных соединений в составе пары. D_1 и D_2 — это дескрипторы пары, представляющие собой суммы и модули разностей величин P_1 и P_2 соответственно. Таким образом, для каждой пары соединений было получено 14 032 числовых дескриптора, значения которых лежат в интервале от 0 до 1.

Структурные дескрипторы PoSMNA. PoSMNA-дескрипторы являются линейными комбинациями фрагментных MNA-дескрипторов вто-

рого порядка [23], которые, в свою очередь, представляют описание структуры молекулы ЛС с точки зрения ближайшего окружения каждого атома. Таким образом, MNA-дескрипторы второго порядка состоят из уникальных строк, соответствующих каждому атому и его окружению через 1 или 2 связи. MNA-дескрипторы позволяют однозначно описать структуру молекулы ЛС. Поскольку каждый MNA-дескриптор представляет собой строку символов, то для генерации PoSMNA-дескрипторов эти строки «склеивают» между собой [23]. Если соединение А описывается двенадцатью MNA-дескрипторами, соединение Б описывается шестью, то пара соединений будет описана 72 PoSMNA-дескрипторами, представляющими собой комбинации MNA-дескрипторов.

Для того чтобы полученные PoSMNA-дескрипторы можно было использовать для построения моделей, применяя метод машинного обучения, каждый элемент PoSMNA был конвертирован в целое положительное число через операцию хэширования с помощью пакета digest (<https://CRAN.R-project.org/package=digest>).

При данном подходе всё многообразие структурных фрагментов пар лекарств в выборке описывается вектором конечной длины, каждое значение в котором указывает на наличие или отсутствие определённого структурного фрагмента в данной паре лекарств. Поскольку при высокой длине вектора дескрипторы получаются слишком разреженными для прогноза, а при слишком короткой — теряется часть данных о структуре, в рамках данной работы длина вектора подбиралась эмпирическим путём. Наилучшие значения точности прогноза были достигнуты при длине вектора в 15 000 значений. Таким образом каждой паре лекарств была поставлена в соответствие строка нулей и единиц длиной 15 000 знаков (так называемый молекулярный отпечаток). В итоге было достигнуто две цели: 1) дескрипторы приняли форму, приемлемую для машинного обучения и 2) за счёт незначительных потерь данных была достигнута значительная экономия вычислительных ресурсов и существенно уменьшено время, необходимое для вычислений.

Построение и оценка моделей. Классификационные модели были построены при помощи метода Random Forest, имплементированного в пакете R ranger [24, 25] со значениями гиперпараметров по умолчанию (число деревьев (ntree) — 500, число дескрипторов, отбираемых для построения каждого дерева (mtry) — корень квадратный от общего числа дескрипторов) с использованием двух

типов описания пар лекарств: дескрипторов, сгенерированных на основе результатов прогноза PASS, и PoSMNA-дескрипторов. Точность моделей была определена с использованием пакетов ROCR [26] и caret (<https://topepo.github.io/caret/>) при помощи процедуры пятикратного скользящего контроля.

Результатом применения алгоритмов классификации является вероятностная оценка принадлежности к определённому классу. Полученные оценки могут как совпадать, так и отличаться от известных значений класса, представленных в контрольной выборке. Исходя из этого, возможны четыре типа оценок результатов прогноза.

1) Истинно позитивный (англ., True Positive, TP) — случай, при котором модель определила класс как положительный, и он является таковым на самом деле.

2) Ложноположительный (англ., False Positive, FP) — случай, при котором модель ошибочно определила класс как положительный, в то время как он является отрицательным.

3) Истинно негативный (англ., True Negative, TN) — случай, при котором модель определила класс как отрицательный, и он является таковым на самом деле.

4) Ложноотрицательный (англ., False Negative, FN) — случай, при котором модель ошибочно определила класс как отрицательный, в то время как он является положительным.

На базе этих оценок рассчитываются такие показатели точности прогноза, как площадь под ROC-кривой (англ., area under the ROC curve, AUC) [26], чувствительность и специфичность.

AUC — это площадь под ROC-кривой. ROC-кривая строится следующим образом: на оси ординат откладывается доля правильно классифицированных положительных примеров, на оси абсцисс — доля ложноположительных предсказаний. Таким образом, исходя из свойства непрерывности функции вероятности, следует, что ROC-кривая выражает точность прогноза для каждого порога отсечения вероятности.

Чувствительность (TPR, от англ., true positive rate) — точность предсказания наличия НЛР. В данном случае это вероятность того, что пара, вызывающая конкретную НЛР, будет верно распознана. Рассчитывается по формуле (4):

$$TPR = \frac{TP}{TP + FP}, \quad (4)$$

где TP — истинно позитивные случаи, FP — ложноположительные случаи.

Специфичность (TNR, от англ., true negative rate) – точность предсказания отсутствия НЛР. В данном случае это вероятность того, что модель не обнаружит НЛР там, где её нет. Рассчитывается по формуле (5):

$$TNR = \frac{TN}{FN + TN}, \quad (5)$$

где FN – ложно отрицательные случаи, TN – истинно отрицательные случаи.

Этот показатель так же важен, как и чувствительность, поскольку позволяет избежать так называемой ошибки второго рода, при ко-

торой потенциально безвредная пара лекарств может классифицироваться как опасная для здоровья.

Сбалансированная точность (BA, от англ., Balanced accuracy) – среднее арифметическое от значений специфичности и чувствительности, как и AUC, является объективным показателем точности прогноза модели (формула (6)).

$$BA = \frac{TPR + TNR}{2}, \quad (6)$$

где TPR – чувствительность, TNR – специфичность.

Таблица 1. Характеристики выборок «положительных» и «отрицательных» примеров для шести НЛР

НЛР	Количество пар (положительные примеры)	Количество пар (отрицательные примеры)	Количество лекарств (положительные примеры)	Количество лекарств (отрицательные примеры)
Аритмия	9231	9231	366	685
Удлинение интервала QT	19 371	19 371	484	740
Брадикардия	4848	4848	186	634
Тахикардия	6506	6506	216	666
Гипертензия	24 040	24 040	501	752
Гипотензия	22 890	22 890	925	750

Таблица 2. Результаты прогноза для двенадцати моделей

Оценки точности модели	Брадикардия	Аритмия	Удлинение интервала QT	Тахикардия	Гипертензия	Гипотензия
PoSMNA						
AUC	0,91	0,88	0,88	0,93	0,94	0,89
Чувствительность	0,71	0,69	0,69	0,73	0,75	0,67
Специфичность	0,97	0,99	0,91	0,98	0,95	0,91
Сбалансированная точность	0,84	0,84	0,80	0,86	0,85	0,79
PASS						
AUC	0,94	0,90	0,90	0,96	0,91	0,89
Чувствительность	0,65	0,55	0,76	0,70	0,85	0,77
Специфичность	0,97	0,96	0,86	0,97	0,82	0,85
Сбалансированная точность	0,81	0,76	0,81	0,83	0,83	0,81

Примечание. Даны результаты прогноза для шести НЛР с использованием двух типов дескрипторов.

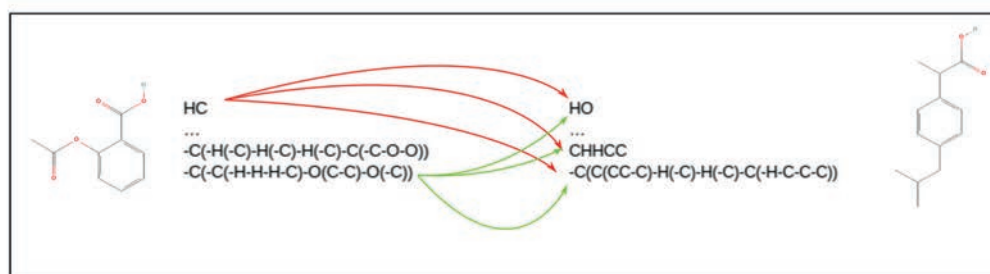
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристики полученных выборок. На основе анализа информации, полученной из баз данных DrugBank и TwoSides, были созданы выборки пар ЛС, которые в результате взаимодействия вызывают и не вызывают шесть сердечно-сосудистых НЛР (табл. 1). Четыре НЛР (аритмия, тахикардия, брадикардия и удлинение интервала QT) связаны с нарушениями сердечного ритма и две НЛР (гипертензия и гипотензия) связаны с изменением артериального давления. Выборки

были опубликованы в общем доступе и свободно доступны по ссылке (https://github.com/allaroundddi/DDI_samples).

Оценки полученных моделей. На основе полученных выборок, с использованием двух типов дескрипторов (см. раздел «Материалы и методы») и метода Random Forest, были построены классификационные модели для прогноза соответствующих НЛР. Схема получения PoSMNA-дескрипторов представлена на рис. 2, а схема перекрёстного контроля — на рис. 3. В результате были получены следующие показатели точности прогноза (табл. 2).

MNA-дескрипторы двух соединений объединялись таким образом, что m дескрипторов одного соединения и n другого давали $m \cdot n$ PoSMNA дескрипторов для пары.



Таким образом получилось $m \cdot n$ текстовых строк, описывающих пару через комбинацию структурных фрагментов двух отдельных соединений.

$$\begin{array}{l} \text{HC_HO} \\ \text{...} \\ \text{-C-(C-(H-H-H-C)-O(C-C)-O(-C))_CHHCC} \\ \text{-C-(C-(H-H-H-C)-O(C-C)-O(-C))_C(C(CC-C)-H(-C)-H(-C)-C(-H-C-C-C))} \end{array}$$

Каждой строке PoSMNA дескриптора ставилось в соответствие целое положительное число.

HC_HO	→	20716703
...	...	...
-C(-C(-H-H-H-C)-O(-C-C)-O(-C))_CHHCC	→	72765052
-C(-C(-H-H-H-H-C)-O(-C-C)-O(-C))_C(-C(CC-C)-H(-C)-H(-C)-C(-H-C-C-C))	→	26207620

2035
521
...
2620

	2035	521	...	2620
Аспирин + ибупрофен	1	1	...	
Аспирин + флурбипрофен	1	0	...	
...			...	
Изониазид + транилципромин	0	0	...	

Таким образом была составлена таблица, в которой каждая строка — это пара лекарств, а каждый столбец — наличие или отсутствие определённого структурного фрагмента в этой паре. Таким образом каждой паре поставлена в соответствие битовая строка.

Рис. 2. Иллюстрация алгоритма получения хэшированных PoSMNA-дескрипторов

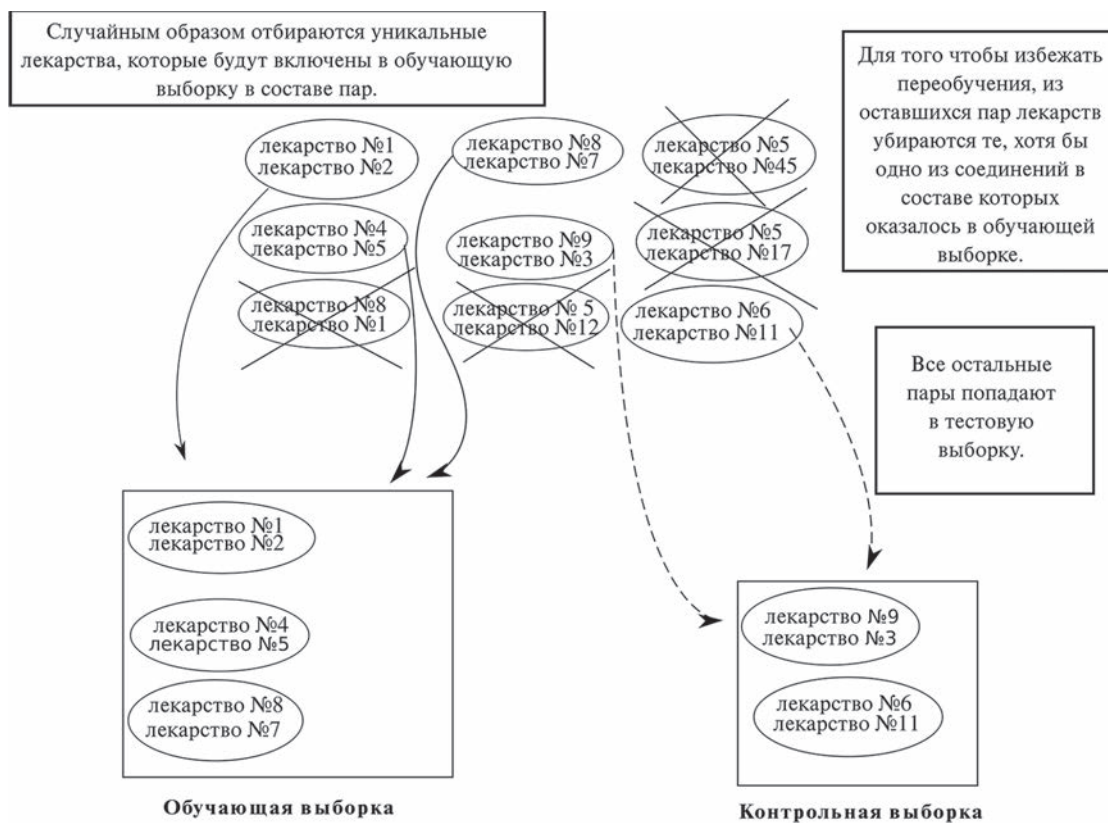


Рис. 3. Иллюстрация метода скользящего контроля, примененного в исследовании

С использованием моделей, построенных на двух типах дескрипторов, был выполнен консенсусный прогноз с различными вариантами комбинирования оценок вероятностей. Наибольшее увеличение показателей точности прогноза было достигнуто для отбора оценок по максимальному значению: в среднем по выборке AUC увеличилась на 1,8%, а сбалансированная точность — на 4,1%. Результаты представлены в табл. 3.

Ретроспективный анализ. Для демонстрации применимости разработанного подхода был выполнен прогноз для нескольких пар лекарств. Из базы данных DrugBank и сайта Drugs.com (<https://www.drugs.com/>) случайным образом были отобраны шесть пар лекарств, три из которых вызывают удлинение интервала QT на электрокардиограмме, и три — нет. Данная НЛР была выбрана потому, что для неё имеется больше всего данных по МЛВ. Три пары лекарств были выбраны таким образом, чтобы факт наличия у них НЛР был подтверждён литературными источниками, а оставшиеся три пары (отрицательные примеры) были выбраны произвольным образом. После этого данные пары были исключены на этапе построения и валидации моделей, и с использованием перестроенных моделей был осуществлён прогноз. Результаты приведены в табл. 4.

Как видно по последним двум столбцам, известная способность пар лекарств вызывать удлинение интервала QT на ЭКГ предсказана верно.

Сравнение с имеющимися работами. В рамках данной работы были построены (Q)SAR-модели, которые позволяют предсказывать конкретные неблагоприятные эффекты МЛВ, в то время как большая часть работ посвящена прогнозированию факта наличия МЛВ.

В работе Liu et al. [28] выборки были получены с использованием базы данных по взаимодействиям лекарство—белок STITCH, которые послужили признаками отдельных лекарств и ранее упомянутой в текущей работе базы данных МЛВ TwoSides. В качестве отрицательных примеров применялись те пары, для которых нет данных по их способности вызывать конкретную НЛР. Построение моделей производилось методом, основанным на статистике Байеса. Полученные модели обладали следующими средними показателями точности прогноза: чувствительность — 63%, специфичность — 90%, AUC — 86%. Соответствующие значения для нашей работы равны 70%, 90% и 90%.

В работе Shankar et al. [17] использовались данные о МЛВ из TWOSIDES и данные о влиянии лекарств на экспрессию генов

Таблица 3. Консенсус-прогноз для шести НЛР с усреднением оценок вероятности, выбором наибольшей оценки, а также оценками без использования консенсуса

НЛР	Оценка точности модели	Max	Mean	PASS	PoSMNA
Аритмия	AUC	0,95	0,95	0,90	0,88
	сбалансированная точность	0,89	0,81	0,76	0,84
	чувствительность	0,82	0,69	0,55	0,69
	специфичность	0,96	0,99	0,96	0,99
Брадикардия	AUC	0,94	0,94	0,94	0,91
	сбалансированная точность	0,88	0,82	0,81	0,84
	чувствительность	0,81	0,64	0,65	0,71
	специфичность	0,95	0,99	0,97	0,97
Гипертензия	AUC	0,95	0,95	0,91	0,94
	сбалансированная точность	0,88	0,89	0,84	0,85
	чувствительность	0,92	0,83	0,85	0,75
	специфичность	0,83	0,94	0,82	0,95
Гипотензия	AUC	0,92	0,92	0,89	0,89
	сбалансированная точность	0,85	0,83	0,81	0,79
	чувствительность	0,85	0,74	0,77	0,67
	специфичность	0,85	0,91	0,85	0,91
Тахикардия	AUC	0,96	0,97	0,96	0,93
	сбалансированная точность	0,91	0,86	0,84	0,86
	чувствительность	0,84	0,72	0,70	0,73
	специфичность	0,97	0,99	0,97	0,98
QT	AUC	0,92	0,92	0,90	0,88
	сбалансированная точность	0,85	0,84	0,81	0,75
	чувствительность	0,82	0,76	0,76	0,69
	специфичность	0,88	0,91	0,86	0,80

из LINC S L1000 с построением моделей посредством искусственных нейронных сетей. В отличие от нашей работы, данные из TWOSIDES в работе Shankar et al. используются в полном объёме без предварительного отбора и контроля качества. К сожалению, авторы не приводят средних значений оценки прогноза, тем не менее для перечисленных в

работе моделей среднее значение AUC равняется 70%, в то время как в нашей работе оно равно 90%.

Область применимости метода. Разработанный нами метод позволяет предсказывать НЛР при совместном приёме нескольких лекарственных средств. Тем не менее у метода существуют определённые ограничения применимости метода.

Таблица 4. Ретроспективный анализ точности модели для прогноза удлинения интервала QT

Лекарство № 1	Лекарство № 2	Характеристика пары	Вызывает удлинение интервала QT, согласно известным данным	Спрогнозированная вероятность удлинения интервала QT
Рамиприл	Ранолазин	кардиопротектор + + антиангинальное средство	нет	0,38
Варденафил	Энкорafenиб	ингибитор фосфодиэстеразы + + ингибитор киназ	да ¹	0,68
Такролимус	Ломефлоксацин	иммуносупрессор + + антибиотик	да [27]	0,69
Псевдоэфедрин	Серталиин	адрено- и симпатомиметик + + антидепрессант	нет	0,08
Розувастин	Трандолаприл	гиполипидемический препарат + ингибитор ангиотензинпревращающего фермента	нет	0,02
Гранисетрона	Гареноксацин	противорвотное средство + + диагностическое средство	да ²	0,84

Примечание. Нет — означает, что для данной комбинации лекарств не удалось найти информации о риске возникновения удлинения интервала QT, в ином случае указано слово «да» и дана ссылка на источник.

¹ «Product Information. Bravado (encorafenib)» Array BioPharma Inc., Boulder, CO.

² «Product Information. Definity (perflutren)» Lantheus Medical Imaging Inc., North Billerica, MA.

Во-первых, это программные ограничения: программа PASS, с помощью которой были получены соответствующие дескрипторы, имеет программное ограничение по молекулярной массе рассматриваемых веществ (1250 кДа), а также не различает оптические изомеры и супрамолекулярные структуры. Во-вторых, это ограничение в доступности данных. Несмотря на то что наш метод не требует каких-либо данных, кроме взаимосвязи пар лекарств с МЛВ, не для всех НЛР удаётся собрать достаточное число данных. Так, в данной работе не проводилось построения моделей для оценки инфаркта миокарда и мерцательной аритмии, поскольку для них крайне мало доступных данных. В-третьих, это ограниченность метода структурой соединений, входящих в состав обучающей выборки. Вследствие этого данные модели не смогут привести адекватный прогноз для лекарств с принципиально новой химической структурой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построены модели для предсказания шести наиболее важных сердечно-сосудистых НЛР, обусловленных МЛВ, на базе двух видов дескрипторов. Показатели точности, вычислен-

ные при помощи пятикратного скользящего контроля, превышают 80%. Также был выполнен консенсус-прогноз для двух типов моделей, что привело к небольшому увеличению оценок точности прогноза. Средние значения величины AUC (~ 90%) для шести эффектов, связанных с сердечно-сосудистой системой, свидетельствуют о высокой точности бинарной классификации, а близость значений чувствительности и специфичности говорит о правильно выбранном подходе к созданию отрицательных примеров. Кроме того, использование выбранных дескрипторов позволяет добиться приемлемой точности без использования анализа дополнительных биомедицинских данных, включая анализ профилей экспрессии генов, методы сетевой фармакологии и молекулярной динамики [13–15]. С использованием построенных моделей нами был выполнен прогноз для случайно отобранных пар ЛС с известным риском возникновения конкретной НЛР. Результаты прогноза полностью подтверждаются ретроспективным анализом, подкреплённым литературными данными. Таким образом, полученные модели могут быть использованы для прогнозирования НЛР, возникающих при совместном приёме произвольной пары лекарств. Высокие значения точности прогноза говорят о потенциальной возможности приме-

нения аналогичного алгоритма при построении моделей для прогнозирования НЛР МЛВ, относящихся к другим системам органов.

Вклад авторов. Иванов С.М. — концепция и руководство работой; Сухачёв В.С. — выполнение работы и написание текста статьи; Дмитриев А.В. — консультация, помощь в подготовке рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 17-75-20250).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rekić, D., Reynolds, K. S., Zhao, P., Zhang, L., Yoshida, K., Sachar, M., Piquette, M. M., Huang, S. M., and Zineh, I. (2017) Clinical drug–drug interaction evaluations to inform drug use and enable drug access, *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2214–2218, doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.016.
2. Carpenter, M., Berry, H., and Pelletier, A. L. (2019) Clinically relevant drug–drug interactions in primary care, *Am. Fam. Physician*, **99**, 558–564.
3. Kim, J., and Parish, A. L. (2017) Polypharmacy and medication management in older adults, *Nurs. Clin. North Am.*, **52**, 457–468, doi: 10.1016/j.cnur.2017.04.007.
4. Triaridis, S., Tsiropoulos, G., Rachovitsas, D., Psillas, G., and Vital, V. (2009) Spontaneous haematoma of the pharynx due to a rare drug interaction, *Hippokratia*, **13**, 175–177.
5. Костылева М. Н., Строк А. Б., Постников С. С., Грацианская А. Н., Ермилин А. Е. (2022) Фармакотерапия в многопрофильном педиатрическом стационаре: полипрагмазия и риск лекарственных взаимодействий на примере клинического случая, *Безопасность и риск фармакотерапии*, **10**, 302–314, doi: 10.30895/2312-7821-2022-10-3-302-314.
6. Ключников С. О. (2014) Полипрагмазия: пути решения проблемы, *Детские инфекции*, **13**, 36–41, doi: 10.22627/2072-8107-2014-13-4-36-41.
7. Ivanov, S., Lagunin, A., Filimonov, D., and Poroikov, V. (2019) Assessment of the cardiovascular adverse effects of drug–drug interactions through a combined analysis of spontaneous reports and predicted drug–target interactions, *PLoS Comput. Biol.*, **15**, e1006851, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006851.
8. Зырянов С. К., Затолочина К. Э., Казаков А. С. (2022) Актуальные вопросы обеспечения безопасности пациентов: роль фармаконадзора, *Общественное здоровье*, **2**, 25–34, doi: 10.21045/2782-1676-2021-2-3-25-34.
9. Noguchi, Y., Tachi, T., and Teramachi, H. (2020) Comparison of Signal detection algorithms based on frequency statistical model for drug–drug interaction using spontaneous reporting systems, *Pharm. Res.*, **37**, 86, doi: 10.1007/s11095-020-02801-3.
10. Казаков А. С., Лепяхин В. К., Астахова А. В. (2013) Осложнения фармакотерапии, связанные с взаимодействием лекарственных средств, *Рос. мед. биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова*, **21**, 70–76, doi: 10.17816/pavlovj2013370-76.
11. Chen, Z., Elizabeth, R., Lin, L., Nicole, P., and Jiuyong, L. (2020) Detecting high-quality signals of adverse drug–drug interactions from spontaneous reporting data, *JBI*, **112**, 103603, doi: 10.1016/j.jbi.2020.103603.
12. Strandell, J., Bate, A., Lindquist, M., and Edwards, I. R. (2008) Drug–drug interactions – a preventable patient safety issue? *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **65**, 144–146, doi: 10.1111/j.1365-2125.2007.02981.x.
13. Taguchi, Y., and Turki, T. (2021) Novel method for the prediction of drug–drug interaction based on gene expression profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **160**, 105742, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105742.
14. Huang, J., Niu, C., Green, C. D., Yang, L., Mei, H., and Han, J. D. (2013) Systematic prediction of pharmacodynamic drug–drug interactions through protein–protein–interaction network, *PLoS Comput. Biol.*, **9**, e1002998, doi: 10.1371/journal.pcbi.1002998.
15. Varma, M. V., Pang, K. S., Isoherranen, N., and Zhao, P. (2015) Dealing with the complex drug–drug Interactions: towards mechanistic models, *Biopharm. Drug Dispos.*, **36**, 71–92, doi: 10.1002/bdd.1934.
16. Kastrin, A., Ferk, P., and Leskošek, B. (2018) Predicting potential drug–drug interactions on topological and semantic similarity features using statistical learning, *PLoS One*, **13**, e0196865, doi: 10.1371/journal.pone.0196865.
17. Shankar, S., Bhandari, I., Okou, D. T., Srinivasa, G., and Athri, P. (2021) Predicting adverse drug reactions of two-drug combinations using structural and transcriptomic drug representations to train an artificial neural network, *Chem. Biol. Drug. Des.*, **97**, 665–673, doi: 10.1111/cbdd.13802.
18. Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A.,

- Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C., and Wilson, M. (2018) DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D1074-D1082, doi: 10.1093/nar/gkx1037.
19. Tatonetti, N. P., Ye, P. P., Daneshjou, R., and Altman, R. B. (2012) Data-driven prediction of drug effects and interactions, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 125, doi: 10.1126/scitranslmed.3003377.
20. Hazell, L., and Shakir, S. A. W. (2006) Under-reporting of adverse drug reactions: a systematic review, *Drug Saf.*, **29**, 385-396, doi: 10.2165/00002018-200629050-00003.
21. Filimonov, D. A., and Poroikov, V. V. (2008) *Probabilistic Approaches in Activity Prediction. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening*, RSC Publishing, Cambridge, pp. 182-216, doi: 10.1039/97818475558879-00182.
22. Dmitriev, A., Filimonov, D., Lagunin, A., Karasev, D., Pogodin, P., Rudik, A., and Poroikov, V. (2019) Prediction of severity of drug-drug interactions caused by enzyme inhibition and activation, *Molecules*, **24**, E3955, doi: 10.3390/molecules24213955.
23. Filimonov, D., Poroikov, V., Borodina, Y., and Gloriovova, T. (1999) Chemical similarity assessment through multilevel neighborhoods of atoms: definition and comparison with the other descriptors, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **39**, 666-670, doi: 10.1021/ci980335o.
24. Breiman, L. (2001) Random forests, *Mach. Learn.*, **45**, 5-32, doi: 10.1023/A:1010933404324.
25. Wright, M. N., and Ziegler, A. (2017) Ranger: a fast implementation of Random Forests for high dimensional data in C++ and R, *J. Stat. Softw.*, **77**, 1-17, doi: 10.18637/jss.v077.i01.
26. Sing, T., Sander, O., Beerenwinkel, N., and Lengauer, T. (2005) ROCRC: visualizing classifier performance in R, *Bioinformatics*, **21**, 3940-3941, doi: 10.1093/bioinformatics/bti623.
27. Witchel, H. J., Hancox, J. C., and Nutt, D. J. (2003) Psychotropic drugs, cardiac arrhythmia, and sudden death, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **23**, 58-77, doi: 10.1097/00004714-200302000-00010.
28. Liu, R., AbdulHameed, M. D. M., Kumar, K., Yu, X., Wallqvist, A., and Reifman, J. (2017) Data-driven prediction of adverse drug reactions induced by drug-drug interactions, *BMC Pharmacol. Toxicol.*, **18**, 44, doi: 10.1186/s40360-017-0153-6.

PREDICTION OF ADVERSE EFFECTS OF DRUG–DRUG INTERACTIONS ON THE CARDIOVASCULAR SYSTEM BASED ON THE ANALYSIS OF STRUCTURE–ACTIVITY RELATIONSHIPS

V. S. Sukhachev*, S. M. Ivanov, and A. V. Dmitriev

Institute of Biomedical Chemistry, 119121 Moscow, Russia; e-mail: withstanding@yandex.ru

The co-administration of drugs often leads to drug–drug interactions, which may be accompanied by various adverse drug reactions that pose a threat to the life and health of patients. The effect caused by adverse drug reactions from the cardiovascular system is one of the most significant manifestations of drug–drug interaction. Clinical assessment of adverse drug reactions resulting from drug–drug interaction between all drug pairs used in therapeutic practice is not possible. The purpose of this work was to build models using structure-activity analysis to predict the effects of adverse drug reactions on the cardiovascular system, mediated by interactions between drug pairs when they are taken together. Data on adverse effects resulting from drug–drug interaction were obtained from the DrugBank database. The data on drug pairs that do not cause the corresponding effects, necessary for building accurate structure–activity models, were obtained from the TwoSides database, which contains the results of the analysis of spontaneous reports. Two types of descriptors were used to describe a pair of drug structures: PoSMNA descriptors and probabilistic estimates of the prediction of biological activities obtained using the PASS program. Structure–activity relationships were established using the Random Forest method. Prediction accuracy was calculated by means of a five-fold cross-validation. The highest accuracy values were obtained using PASS probabilistic estimates as descriptors. The area under the ROC curve was 0.94 for bradycardia, 0.96 for tachycardia, 0.90 for arrhythmia, 0.90 for ECG QT prolongation, 0.91 for hypertension, 0.89 for hypotension.

Keywords: drug–drug interaction, (Q)SAR, adverse drug reactions

УДК 578.32;578.865;539.26

НУКЛЕОИД-АССОЦИИРОВАННЫЕ БЕЛКИ HU И IHF: ОЛИГОМЕРИЗАЦИЯ В РАСТВОРЕ И ГИДРОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2023 Л.А. Дадинова¹, М.В. Петухов¹, А.М. Гордиенко¹, В.А. Манувера^{2,3},
В.Н. Лазарев^{2,3}, Т.В. Ракитина^{4,5}, А.А. Можжев^{1,4}, Г.С. Петерс⁵, Э.В. Штыкова^{1*}

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

² Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

⁵ НИЦ «Курчатовский институт», 123182 Москва, Россия

Поступила в редакцию 28.12.2022

После доработки 10.03.2023

Принята к публикации 23.03.2023

Структура и функция бактериального нуклеоида контролируются нуклеоид-ассоциированными белками NAP. В любой фазе роста различные NAP, действуя последовательно, уплотняют нуклеоид и обеспечивают его транскрипционно активную структуру. Однако в поздней стационарной фазе происходит мощная экспрессия только одного из NAP, белка Dps, и формируются ДНК-белковые кристаллы, трансформирующие нуклеоид в статическую структуру, эффективно защищённую от внешних воздействий. Обнаружение кристаллических структур в живых клетках и связь этого феномена с бактериальной резистентностью к антибиотикам вызвало огромный интерес к изучению этого явления. Целью настоящей работы является получение и сравнительное исследование структур двух родственных NAP (HU и IHF), поскольку именно они накапливаются в клетке на поздней стационарной стадии роста, предшествующей началу формирования защитного ДНК–Dps кристаллического комплекса. Для структурных исследований в работе применялись два взаимодополняющих метода: малоугловое рентгеновское рассеяние (МУРР) в качестве основного метода изучения структуры белков в растворе и динамическое рассеяние света — в качестве дополнительного. Для интерпретации данных МУРР использовались различные подходы и компьютерные программы (в частности, использовался анализ структурных инвариантов, метод молекулярной тектоники и анализ олигомерных смесей в терминах объёмных долей компонентов), что позволило определить макромолекулярные характеристики и получить структурные 3D-модели различных олигомерных форм белков HU и IHF с типичным для МУРР разрешением ~2 нм. Было показано, что эти белки олигомеризуются в растворе в разной степени, и для IHF характерно присутствие крупных олигомеров, состоящих из исходных димеров, выстроенных в цепочку. Анализ экспериментальных и литературных данных позволил высказать гипотезу, что именно этот белок непосредственно перед экспрессией Dps формирует наблюдавшиеся ранее *in vivo* тороидальные структуры и подготавливает платформу для образования кристаллов ДНК–Dps. Полученные результаты необходимы для дальнейшего исследования феномена формирования биокристаллов в бактериальных клетках и нахождения путей преодоления резистентности различных патогенов к внешнему воздействию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеоид-ассоциированные белки, гистонотипные белки HU и IHF, олигомеризация, малоугловое рентгеновское рассеяние, динамическое светорассеяние.

DOI: 10.31857/S032097252305007X, EDN: AXWAAN

Принятые сокращения: ДРС — динамическое светорассеяние; МУРР — малоугловое рентгеновское рассеяние; Dps — ДНК-связывающий белок голодающих клеток; Fis — фактор инверсионной стимуляции; H-NS — гистонотипный белок, структурирующий нуклеоид; Lrp — регуляторный, чувствительный к лейцину белок; NAP — нуклеоид-ассоциированные белки.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Хранение и реализация генетической программы функционирования живой клетки происходит в хромосомах, которые представляют собой комплексы нуклеиновых кислот с белками. В отличие от эукариотических клеток, где различные ДНК-содержащие структуры в компактном виде находятся в ядре, хромосомы безъядерных прокариот, в том числе бактерий, в большинстве случаев содержат только одну кольцевую макромолекулу ДНК (нуклеоид) и находятся в цитоплазме в свободном состоянии. Нуклеоид содержит от 1 до 5 млн пар оснований (п.о.) и имеет длину порядка 1–2 мм, что вызывает необходимость его компактной упаковки, не превышающей объём клетки. Компактизация ДНК в нуклеоиде достигается за счёт молекулярного краудинга и суперспирализации ДНК, происходящих при участии нуклеоид-ассоциированных белков (Nucleoid-Associated Proteins, NAP) [1–7]. Эти архитектурные белки взаимодействуют с ДНК нуклеоида, заставляя её складываться в компактную структуру. Большая часть NAP представляет собой небольшие, основные, дили или мультимерные белки с мономерами, состоящими примерно из 100 аминокислотных остатков. Эти белки часто называют гистоноподобными белками по аналогии с гистонами эукариот. Помимо участия в организации и компактизации хроматина, NAP играют значительную роль в процессах, связанных с функционированием ДНК: рекомбинации, репарации, репликации и транскрипции [8–11], а также выполняют ДНК-защитные функции [12]. Такое сочетание структурных и регуляторных ролей NAP оказывает серьёзное влияние как на функционирование нуклеоида, так и на жизнеспособность и вирулентность бактерий.

Условно NAP можно разделить на три основные группы [13, 14]: 1) белки, соединяющие отдельные участки ДНК; 2) белки, изгибающие ДНК; 3) белки, участвующие в альтернативных механизмах организации и компактизации ДНК.

К первой группе относится гистоноподобный белок, структурирующий нуклеоид (Histone-like Nucleoid Structuring protein, H-NS). H-NS имеет молекулярную массу 15,6 кДа и участвует в регуляции бактериальной транскрипции путём репрессии определённых генов [15, 16]. Основными функциональными единицами H-NS являются димеры, которые, в свою очередь, олигомеризуются, формируя сложные структуры, связывающие между собой различ-

ные участки ДНК, в результате чего происходит компактизация нуклеоида [17]. Характерной особенностью H-NS является наличие двух ДНК-связывающих доменов, которые могут взаимодействовать одновременно с двумя дуплексами ДНК, соединяя их наподобие застёжки-молнии [18].

Другим важным представителем первой группы является регуляторный, чувствительный к лейцину белок (Leucine-responsive regulatory protein, Lrp). Lrp обладает молекулярной массой 15 кДа и функционально реагирует на изменение концентрации лейцина. Основной функциональной единицей Lrp является октамер, но могут существовать и более крупные олигомеры [19]. Октамеры Lrp образуют «дисковидные» структуры, которые наматывают на себя ДНК как нить на катушку, сближая удалённые друг от друга участки ДНК и тем самым эффективно её уплотняя [20]. Присутствие лейцина вызывает диссоциацию Lrp и, соответственно, влияет на его ДНК-связывающие свойства [21, 22].

К первой группе NAP также относят белок SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), являющийся высококонсервативным во всём живом царстве от бактерий до человека и обладающий высокой молекулярной массой (выше 150–200 кДа) [23, 24]. Димер SMC образует V-образную структуру с двумя длинными двуспиральными плечами, которые могут взаимодействовать сразу с несколькими регионами ДНК, что позволяет ему участвовать в сепарации вновь реплицированных хромосом [25].

Важнейшими представителями NAP 2-й группы (белков, изгибающих ДНК) являются белки IHF (Integration Host Factor) и HU [26]. Название HU означает гистоноподобный (H) и (U), где U93 — штамм *Escherichia coli*, откуда белок был выделен, а не heat unstable, что до сих пор встречается в литературе [27]. HU и IHF имеют сходные первичные и пространственные структуры, но отличаются пространственностью в бактериальном царстве и особенностями ДНК-связывания.

HU — это наиболее широко распространённый и высокопредставленный в делящейся клетке NAP бактерий [28, 29]. У большинства бактерий HU является гомодимером с массой мономеров около 10 кДа. HU относят к α - или β -типу в зависимости от сходства с α - и β -субъединицами HU-белка *E. coli*, который является гетеродимером HU ($\alpha\beta$), как и все HU из энтеробактерий. Субъединицы гетеродимерных HU гомологичны на 70%, и их пространственные структуры исключительно консервативны [28].

В них можно выделить димеризационный домен, представляющий собой стабильное ядро из α -спиралей, переходящих в β -лист, и ДНК-связывающий домен, представляющий собой подвижные β -тяжи («руки»), обхватывающие двойную спираль ДНК. Расположенные на концах «рук» остатки пролина интеркалируют в малую бороздку ДНК и изгибают её [26]. HU не имеет специфических сайтов связывания с ДНК, но имеет повышенное сродство к ДНК со структурными искажениями, такими как разрывы одной или двух цепей, а также репликативные вилки [10, 27]. Профили специфичности к ДНК-структурам у разных HU-белков заметно отличаются, другие различия связаны с длиной сайта связывания, углом изгиба ДНК и степенью кооперативности [28, 30]. Предполагается также, что взаимодействия HU–ДНК играют критическую функцию в ремоделировании нуклеоидов, которое может служить общим микробным механизмом регуляции транскрипции и адаптации к изменяющимся условиям [31].

INF встречается только в энтеробактериях и является гомологом HU (30–40% идентичности) [28]. В отличие от HU, INF представляет собой облигатный гетеродимер, субъединицы которого гомологичны примерно на 25%, при этом α -субъединица имеет молекулярную массу около 11 кДа, а β -субъединица – порядка 9,5 кДа. Как и HU, INF использует интеркаляцию двух консервативных остатков пролина в малую бороздку ДНК на расстоянии 9 п.о. друг от друга, индуцируя или стабилизируя изгиб ДНК [26]. В отличие от HU, INF специфически распознаёт последовательности из 13 п.о. с консенсусом 5'-(A/T)ATCAANNNTT(A/G)-3', где N – это любой нуклеотид [32].

Ко второй группе NAP относится также семейство Fis (Factor for inversion stimulation). Белки этого семейства представляют собой гомодимеры, каждая субъединица которых состоит из 98 аминокислот [33]. *In vitro* в высоких концентрациях Fis связывается с ДНК неспецифически, однако *in vivo* белок выбирает определённые последовательности длиной 15 п.о.: (G/T)NN(C/T)(A/G)NN(A/T)NN(C/T)(A/G)NN(C/A), где N – любой из нуклеотидов [34–36].

К третьей группе NAP относится ДНК-связывающий белок голодающих клеток (DNA-binding protein from starved cells, Dps), который, связываясь с ДНК, обеспечивает наиболее упорядоченный уровень её организации, так как при этом образуется не просто компактная структура, а устойчивый кристаллический комплекс Dps–ДНК, защищающий дезоксирибонуклеиновую кислоту от внешнего нега-

тивного воздействия, в том числе от антибиотиков [37–40]. Обнаружение кристаллических структур в живых клетках и связь этого феномена с бактериальной резистентностью к лекарственным препаратам вызвало огромный интерес к структуре самого Dps и его комплекса с ДНК [41–51].

Dps представляет собой додекамер, мономер которого состоит из четырёх α -спиралей и имеет молекулярную массу 18,7 кДа [52]. Dps может также существовать в виде тримера, который, однако, не образует с ДНК кристаллических форм [53]. Предполагается, что Dps связывает ДНК за счёт электростатических связей богатых лизином N-концевых доменов с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом ДНК [36, 37, 54].

Изменчивость качественного и количественного состава NAP у разных бактерий и на разных стадиях жизненного цикла [4, 7], их способность компенсировать отсутствие друг друга и менять функциональные свойства в ответ на изменение клеточной среды препятствуют изучению вклада индивидуальных NAP в поддержание как структуры нуклеоида, так и жизнеспособности и вирулентности бактериальной клетки. В этой ситуации, когда имитировать сложные процессы, происходящие в бактериальном нуклеоиде, *in vitro* не представляется возможным, традиционным решением является последовательное изучение структуры и свойств отдельных белков, а затем на базе полученных данных – результата их взаимодействия.

Ранее методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) и криоэлектронной микроскопии нами были определены типы кристаллической упаковки сокристаллов Dps–ДНК в растворе в зависимости от состава буфера [44, 45], а также проведено изучение влияния конформационной подвижности N-концевых областей Dps из *E. coli* на характер взаимодействия белка с ДНК в разных условиях [46, 47].

Целью настоящей работы является получение и сравнительное исследование структур двух родственных NAP (HU и INF), которые накапливаются в клетке на поздней стационарной стадии роста, предшествующей началу формирования защитного кристаллического комплекса Dps–ДНК. Для достижения этой цели, во-первых, были использованы два разных метода получения рекомбинантных белков HU и INF. Белок HU представляет собой гомодимер HUa *E. coli* и был получен по методу, описанному в работе Agarova et al. [55]. INF является гетеродимером, и для его получения использовался оригинальный метод,

описанный в данной работе ниже и основанный на экспрессии бицистронных оперонов. Во-вторых, для структурных исследований применялись два независимых, взаимодополняющих метода: малоугловое рентгеновское рассеяние в качестве основного метода изучения структуры белков в растворе и динамическое рассеяние света (ДРС) — в качестве дополнительного.

МУРР представляет собой упругое рассеяние рентгеновского излучения на неоднородностях электронной плотности вещества [56]. Пространственное распределение электронной плотности, в свою очередь, зависит от структуры рассеивающего объекта и определяет профиль экспериментальной кривой рассеяния $I(s)$, анализ которой даёт возможность вычислить радиус инерции R_g и максимальный размер $D_{\max}$ рассеивающих частиц. Современные методы интерпретации данных МУРР и созданное для них программное обеспечение позволяют определить не только упомянутые инварианты малоуглового рассеяния, но также построить 3D структурные модели рассеивающих объектов с разрешением порядка 1–2 нм [56].

ДРС основано на эффекте Доплера (изменение частоты падающего света) и броуновского движения частиц в растворе, и с его помощью измеряется флуктуация рассеяния света, непосредственно связанная с диффузией частиц в растворе, что даёт возможность определить гидродинамический радиус R_h , через уравнение Стокса–Эйнштейна.

Важно отметить, что МУРР и ДРС позволяют проводить изучение биологических объектов в среде, максимально приближенной к естественной, т.е. в растворе при заданных температуре, pH, солевом составе и других параметрах среды [56]. В отличие от классических биохимических техник разделения белков (таких как хроматография или электрофорез), оба метода могут детектировать и изучать нестабильные (слабые и короткоживущие) комплексы. Необходимость совместного использования данных методов состоит в том, что ДРС позволяет определить степень олигомеризации белков, которую необходимо учитывать при построении пространственных структурных моделей по данным МУРР.

Результаты настоящей работы будут служить основой для дальнейшего исследования феномена формирования биокристаллов в бактериальных клетках и нахождения путей преодоления резистентности различных патогенов к внешнему воздействию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного белка HUa *E. coli*. Использовали плазмиду pBAD-hupA и клетки *E. coli* с делетированными генами HU-белка. Плазида и клетки были любезно предоставлены J. Oberto (Институт физико-химической биологии, Париж, Франция). Предварительно в плазмиду по сайтам рестрикции BamHI и NdeI был встроено олигонуклеотидный дуплекс, кодирующий последовательности 6-гистидинового тага и сайта протеазы вируса гравировки табака (MGSDKINNNNNHENLYFQ*GH, * — сайт расщепления). Полученной плазмидой pBad-HisTEVhupA трансформировали клетки *E. coli* штамма С600 (hupA:Cm, hupB:Km). Клетки штамма-продуцента культивировали в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (25 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл) при 37 °C в течение ночи. Ночную культуру разводили в 100 раз средой LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и подращивали при 37 °C до оптической плотности $OD_{600} = 0,8$. Экспрессию индуцировали добавлением арабинозы до 0,2% (v/v) и проводили в течение ночи (16 ч) при 25 °C. Клетки осаждали центрифугированием (6000 g, 10 °C, 20 мин). Выделение рекомбинантного белка проводили, как описано ранее [55]. Схема выделения включала две стадии металлохелатной аффинной хроматографии (MXAX), разделённые обработкой TEV-протеазой, и финальную очистку белка с помощью ионообменной хроматографии. Все хроматографии проводили с использованием хроматографической системы AKTA Prime («GE Healthcare», США).

Биомассу (около 10 г), полученную из 1 литра бактериальной культуры, лизировали в 25 мл охлаждённого буферного раствора А (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 500 mM NaCl), который содержал 5% глицерина, 0,2% Triton X-100 и 1 mM PMSF, и обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора Ultrasonic Processor («Cole Parmer», США) в режиме (5 × 30 с), охлаждая во льду. Нерастворимые компоненты осаждали центрифугированием (20 000 g, 4 °C, 20 мин). Осветлённый лизат наносили на колонку с металлоаффинной смолой Ni-NTA Superflow («Qiagen», Германия), уравновешенную буфером А. Для удаления неспецифически-связавшихся белков и фрагментов ДНК колонку промывали буфером А, содержащим 1 M NaCl и 40 mM имидазола. Элюцию целевого белка проводили буфером А, содержащим 300 mM имидазола. Фракции, содержащие целевой белок,

объединяли и инкубировали с протеазой TEV при комнатной температуре в течение 2 ч с последующим диализом против буфера А в течение 16 ч при 4 °С. Для освобождения от 6-гистидинового тага и TEV-протеазы проводили повторную МХАХ, собирая фракции, не связавшиеся со смолой. Финальную очистку проводили с помощью ионообменной хроматографии, проводимой на колонке ResourceQ («GE Healthcare»), уравновешенной буфером (20 mM Tris-HCl (pH 7,8), 50 mM NaCl) с использованием градиента NaCl (50 mM–1 M). Для обессоливания и концентрирования препарата до и после ионообменной хроматографии использовали колонки PD10 («GE Healthcare») и центрифужные концентраторы Amicon Ultra 3kDa, («Millipore», США). Все белковые фракции, полученные в процессе выделения белка, анализировали с помощью электрофореза в 15%-ном ПААГ в денатурирующих условиях с последующим окрашиванием Кумасси G-250.

Получение рекомбинантного белка INF. Белок INF, в отличие от HU, представляет собой гетеродимер. В литературе описано, что для получения INF требуется экспрессировать гены обеих его цепей в одной клетке, иначе белок не образует правильной структуры [57]. Для решения этой задачи мы получили генетическую конструкцию, содержащую двусторонний оперон, на базе плазмиды семейства pET. С помощью ПЦР нарабатывали три фрагмента ДНК, два из них кодировали альфа- и бета-цепи INF, а третий представлял собой практически полноразмерную плазмиду pET-22b без участка между промоторно-операторной областью и T7-терминатором. Три фрагмента объединяли в одну плазмиду

по методу PIPE [58]. В результате была получена плаزمида pET-INFab, содержащая двусторонний оперон под контролем промотора T7, кодирующий обе цепи INF. В короткую нетранслируемую область между участками ДНК, кодирующими альфа- и бета-цепи, был введен сайт связывания рибосомы (RBS) для трансляции второго цистрона.

Для ПЦР-амплификации участков ДНК, кодирующих альфа- и бета-цепи INF, использовали пары праймеров INFa-F и INFa-R, INFb-F и INFb-R соответственно и ДНК *E. coli* K-12 MG1655 в качестве матрицы. Для амплификации плазмиды использовались праймеры PETPIPE-1 и PETPIPE-2, а также плазмиды pET-22b («Novagen», США) в качестве матрицы. ДНК-фрагменты были очищены с помощью препаративного электрофореза в агарозном геле и выделены с помощью набора diaGene («Диаэм», Россия). Далее три ПЦР-фрагмента объединяли в экспрессионную плазмиду по методу PIPE [58]. Для этого их смешивали в эквимольных количествах и без лигирования трансформировали смесью компетентные клетки *E. coli* TOP10. За счёт наличия у фрагментов ДНК перекрывающихся частей в клетке *E. coli* происходило восстановление полной плазмиды. Клоны, содержащие рекомбинантные плазмиды, отбирали с помощью ПЦР клеточной суспензии с использованием праймеров T7 и T7t. Последовательности праймеров, использованных в работе («Литех», Россия), представлены в табл. 1. Из отобранных клонов выделяли плазмидную ДНК и подтверждали соответствие её структуры ожидаемой с помощью автоматического секвенирования по Сэнгеру на секвенаторе ABI Prism («Applied biosystems», США).

Таблица 1. Последовательности праймеров, используемых в работе

Название	Последовательность 5'→3'
INFa-F	GAAGGAGATATACATATGGCGCTTACAAAAGCTGA
INFa-R	CATTATTTACCTCCTTTATTTACTCGTCTTTGGGCGAAG
INFb-F	GTAATAAAGGAGGTAATAATGACCAAGTCAGAATTGATAG
INFb-R	GTGGTGGTGCTCGAGTTAACCGTAAATATTGGCGCGA
PETPIPE-1	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAG
PETPIPE-2	CTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T7t	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

Для наработки белка INF плазмидой pET-INFab трансформировали клетки *E. coli* BL21(DE3) gold («Novagen», США). Далее в колбу, содержащую 50 мл среды LB и 150 мг/литр ампициллина, помещали отдельную колонию *E. coli* BL21-gold(DE3)/pET-INFab. Колбу инкубировали в течение ночи при 30 °C в шейкере-инкубаторе. Затем 50 мл ночной культуры переносили в 1 литр свежей среды LB (ампициллин 100 мг/литр) и подращивали в шейкере-инкубаторе при 37 °C до момента достижения культурой OD600 = 0,8. Далее к культуре добавляли IPTG до конечной концентрации 0,5 mM и инкубировали 4 ч при температуре 37 °C в шейкере-инкубаторе. Клетки осаждали центрифугированием. Клеточную массу ресуспендировали в 50 мл 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) и разрушали клетки с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 20 мин при ускорении 15 000 g. Полученный раствор фильтровали через фильтр с порами 0,22 мкм и наносили на хроматографическую колонку, содержащую 5 мл сорбента DEAE Sepharose FF («GE Healthcare») и уравнивавшую 20 mM Tris-HCl (pH 7,5). Собирали фракцию белков, не связавшихся с колонкой. Большая часть белков из клеточного лизата в этих условиях связывалась с сорбентом, в то время как INF проходил колонку без связывания. После первичной очистки с помощью DEAE-сефарозы INF специфично очищали с помощью хроматографии на колонке с гепарин-сефарозой [59]. Для этого использовали колонку HiTrap Heparin HP 1ml («GE Healthcare») в соответствии с рекомендациями производителя. В результате был получен электрофоретически гомогенный препарат белка INF.

Подготовка образцов для анализа. Замена буфера и концентрирование белковых растворов проводили с помощью центрифужных концентраторов Amicon Ultra-4 с порогом отсеивания — 3 кДа. Образцы переводили в буфер (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂) и концентрировали до 5 мг/мл. Также образцы перед измерениями центрифугировали в течение часа при 11 000 g в охлаждаемой настольной центрифуге.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Эксперимент по малоугловому рентгеновскому рассеянию проводился на станции «БиоМУР» [60, 61] Курчатовского источника синхротронного излучения (НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия) в геометрии на пропускание. Растворы с образцами помещали в тонкостенные кварцевые капилляры диаметром 2 мм и толщиной стенок 0,01 мм.

Для регистрации рентгенограмм использовали двухкоординатный детектор DECTRIS Pilatus3 1M с площадью рабочей поверхности 168,7 × 179,4 мм, разрешением 981 × 1043 точек и размером пикселя — 172 мкм, установленный на расстоянии около 750 мм от образца. Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений векторов рассеяния $0,09 < s < 4 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin\theta)/\lambda$, 2θ — угол рассеяния и $\lambda = 0,1445 \text{ нм}$ — длина волны рассеяния. Для каждого образца было снято по 12 экспериментальных кривых рассеяния со временем экспозиции 300 с каждая (суммарное время облучения 60 мин) с целью контроля возможных радиационных повреждений. Точная калибровка расстояния образец–детектор осуществлялась в программе Fit2D [62] по образцу бегената серебра («Sigma-Aldrich», Германия).

Первичная обработка данных, включающая усреднение кривых рассеяния и вычет сигнала от буфера, а также определение структурных инвариантов МУРР, проводилась с помощью программы PRIMUS [63]. Дальнейшая обработка полученных данных проводилась с помощью программ специального пакета ATSAS [64].

Для определения максимального размера рассеивающих частиц в растворе и построения функций распределения по расстояниям $p(r)$ использовалась программа GNOM [65].

Сравнение экспериментальных данных и кривых МУРР, полученных от моделей, осуществлялось программой CRY SOL [66]. Программа использует мультипольное разложение амплитуд рассеяния для расчёта сферически усреднённой картины рассеяния и учитывает гидратную оболочку. Экспериментальные данные МУРР приближаются путём оптимизации расчётной кривой рассеяния, минимизируя расхождение между ними. Критерием сходимости является значение невязки χ^2 :

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

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 моделирования структуры олигомеров HU и INF нами была также разработана программа NEMIX. Данная программа позволяет строить мультичастичные образования, в которых каждый следующий строительный блок получается из предыдущего путём одинаковой

трансформации первого блока для получения второго из первого, третьего из второго и т.д. Затем программа рассматривает все возможные конфигурации таких строительных блоков внутри олигомера и с помощью их комбинации приближает данные МУРР от олигомерной смеси, содержащей как полный олигомер, так и его составные части. В данной работе при моделировании строительным блоком для IHF был гетеродимер (PDB ID: 1ihf) и гомодимер (PDB ID: 5l8z) — для HU, а в качестве компонентов смеси, соответственно, использовали один (димер), два (тетрамер, как часть олигомера) и три (полный олигомер) строительных блока.

Количественный состав равновесных смесей, состоящих из компонентов, для каждого из которых имеется кривая рассеяния (либо измеренная экспериментально, либо посчитанная от модели программой CRY SOL [66]), определялся программой OLIGOMER [63]. OLIGOMER с помощью линейной комбинации кривых МУРР от компонентов приближает экспериментальные данные от смеси. При этом весовые коэффициенты компонентов определяют их объёмные доли v_k в такой смеси:

$$I(s) = \sum_{k=1}^K v_k I_k(s), \quad (2)$$

где $I_k(s)$ — интенсивность рассеяния компонентой.

Следует заострить внимание, что в формулу (2) входят объёмные доли компонентов, а не их молярные фракции, из чего следует, что вклад больших олигомеров будет более существенным, чем, например, димеров. Таким образом, при одних и тех же объёмных долях количество олигомеров в единицах будет обратно пропорционально их молекулярному весу.

Моделирование методом молекулярной тектоники по данным от олигомерной смеси проводилось программой SASREFMX [67]. Данная программа восстанавливает четвертичную структуру комплекса путём вращения и сдвига относительно друг друга атомной структуры субъединиц, формирующих комплекс. При этом экспериментальная кривая МУРР приближается смесью кривых рассеяния от целого комплекса и от его компонентов, а в качестве дополнительных параметров моделирования используются объёмные доли компонентов. В данной работе комплексом являлся высокий олигомер белка, а в качестве субъединиц использовались составляющие его димеры.

Эксперимент и анализ результатов динамического светорассеяния. Анализ проводили с использованием прибора Zetasizer™ NanoS («Malvern Panalytical», Великобритания). Технические характеристики — 4 мВт He-Ne-лазер, $\lambda_0 = 633$ нм, $\theta = 173^\circ$.

Настройки прибора оптимизировались автоматически с помощью программного обеспечения ZS XPLOER («Malvern Panalytical»). Для каждого образца проведено пять повторных измерений при 25°C с термостабилизацией 120 с. Динамическое рассеяние света измеряет автокорреляционную функцию, т.е. корреляцию флуктуации света, рассеянного наночастицами, находящимися в броуновском движении в растворе. Коэффициент диффузии наночастиц рассчитывается путём подбора автокорреляционной функции и используется для определения диаметра (или радиуса) частиц через уравнение Стокса–Эйнштейна:

$$d(H) = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h}, \quad (3)$$

где k_B — константа Больцмана, T — абсолютная температура, η — вязкость жидкости, R_h — гидродинамический радиус частицы. Анализ полученных данных проводится в предположении сферической аппроксимации исследуемого объекта. Распределение по гидродинамическим размерам белков и индекс полидисперсности растворов получены с помощью программного обеспечения Zetasizer («Malvern Panalytical»). Вязкость воды была установлена на уровне $0,08872$ мПа·с с рефракционным индексом 1,33. Ошибка измерений определена как стандартное отклонение пяти повторных измерений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ гидродинамического поведения белков HU и IHF с помощью динамического светорассеяния. Имеющиеся литературные данные указывают на способность гистонподобных белков олигомеризоваться в растворе [17, 31, 68–70]. Поэтому степень олигомеризации, т.е. распределение по гидродинамическим размерам и объёмные доли отдельных компонент, белков HU и IHF были определены с помощью динамического рассеяния света (рис. 1).

Полученные распределения по гидродинамическим размерам демонстрируют асимметричные профили для обоих белков, что свидетельствует о наличии в растворе не только димерных форм HU и IHF, но и более крупных

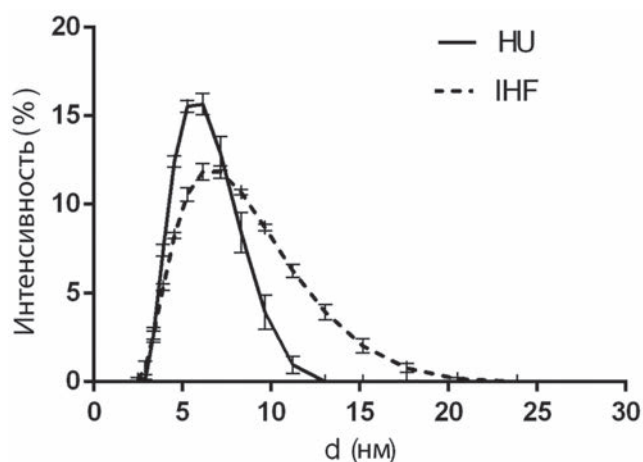


Рис. 1. Распределение по гидродинамическим размерам для гистоноподобных белков HU и IHF

образований. Тем не менее основной фракцией рассеивающих частиц являются частицы с z -средними гидродинамическими размерами порядка 8–10 нм, что хорошо соответствует размерам димеров исследуемых белков с учётом гидратной оболочки. Расчёты с помощью программы Zetasizer показывают, что в растворе присутствует 83% (v/v) димеров HU и око-

ло 17% (v/v) более крупных частиц. Для этого белка профиль распределения по размерам сравнительно узок (индекс полидисперсности равен 0,32), в то время как для IHF степень полидисперсности высокая (0,75): в растворе присутствуют 45% (v/v) димеров, 35% (v/v) более высоких олигомеров и порядка 20% (v/v) ещё более крупных частиц.

Интегральные структурные характеристики гистоноподобных белков HU и IHF. Кривые малоуглового рассеяния гистоноподобных белков HU и IHF были измерены в буферном растворе, содержащем катионы Mg^{2+} . Выбор солевого состава, содержащего бивалентные катионы магния, был основан на результатах ранее проведённых экспериментов по оптимизации условий формирования ДНК-белковых комплексов белка Dps, способного образовывать сокристаллы Dps–ДНК [46, 47]. Из литературных данных также известно, что присутствие бивалентных катионов магния имеет решающее значение для образования сокристаллов Dps–ДНК [46, 47, 71] и, следовательно, может оказать влияние на структуру белков HU и IHF, которые предшествуют Dps на поздних фазах роста клеток [13, 29].

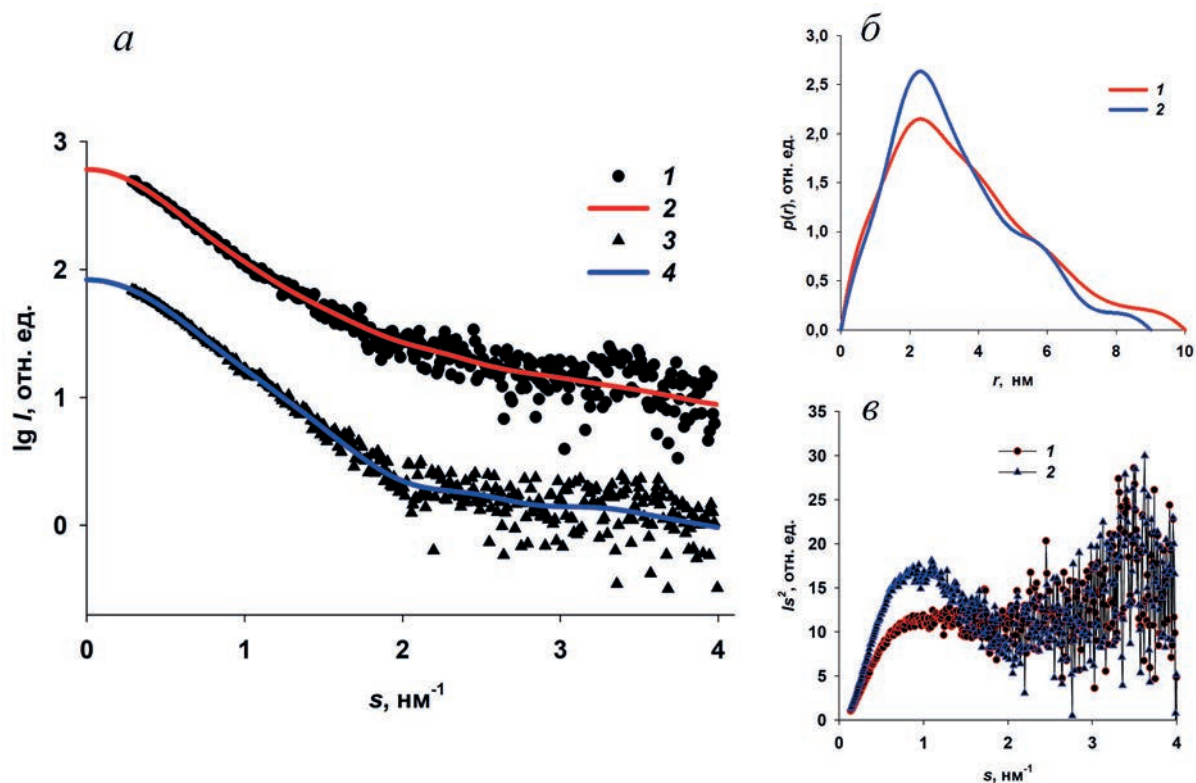


Рис. 2. Анализ кривых МУРР от гистоноподобных белков HU и IHF. *a* – Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от IHF (1) и HU (3) и кривые, рассчитанные от функций распределения по расстояниям $p(r)$ для IHF (2) и HU (4). Кривые разнесены попарно по вертикали на один логарифмический порядок для лучшей визуализации; *б* – функции распределения по расстояниям $p(r)$, рассчитанные для IHF (1) и HU (2); *в* – графики в координатах Кратки для IHF (1) и HU (2)

Таблица 2. Интегральные структурные характеристики гистоноподобных белков HU и IHF в растворе

Образец	V_p , нм ³	$M_{\text{эксп}}$, кДа	$M_{\text{теор}}$, кДа	R_g , нм	R_g^* , нм	D_{max} , нм
HU	45 ± 5	27 ± 3	20,5	2,62 ± 0,02	2,2	9,0
IHF	55 ± 5	33 ± 3	21,5	2,89 ± 0,03	2,1	10,0

Примечание. R_g^* — теоретические значения радиуса инерции R_g .

Белки HU и IHF были измерены при концентрациях 2 мг/мл и 4,8 мг/мл. Поскольку концентрационной зависимости в этом интервале концентраций не наблюдалось, для дальнейших расчётов и структурного моделирования использовались кривые с концентрацией 4,8 мг/мл, как наиболее информативные и с меньшими экспериментальными шумами (рис. 2, а; кривые 1 и 3).

Поскольку кривые МУРР для обоих белков имеют тенденцию увеличения интенсивности рассеяния в самых малых углах (больше — для IHF и в меньшей степени — для HU), можно предположить, что в растворах могут присутствовать олигомеры более высоких степеней — тетрамеры, гексамеры и другие. Рассчитанные с помощью программы PRIMUS такие инварианты, как породовский объём V_p и молекулярные массы (табл. 2), явно указывают на наличие некоторого количества олигомеров выше, чем димер, в обоих растворах: средние молекулярные массы $M_{\text{эксп}}$, определённые по кривым МУРР из соотношения $V_p/1,65$ [72], существенно превышают теоретические ($M_{\text{теор}}$).

Важнейшей структурной характеристикой белков является функция распределения по расстояниям $p(r)$ (рис. 2, б), связанная с интенсивностью рассеяния $I(s)$ преобразованием Фурье и необходимая для анализа структуры рассеивающих объектов:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty s r I(s) \sin(sr) ds. \quad (4)$$

Функция $p(r)$ представляет собой совокупность расстояний между каждыми двумя точками в интервале между r и $r + dr$ и распространяется на весь интервал $[0, D_{\text{max}}]$, где D_{max} — максимальное расстояние между двумя точками внутри рассеивающей частицы. Таким образом, эта функция содержит информацию о форме, размере и структуре образца и позволяет оценивать его максимальный размер D_{max} из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{\text{max}}$. Профиль $p(r)$ отражает основные особенности рассеивающего объекта и для монодисперсных соединений используется для *ab initio* восстановления структуры по данным МУРР [73]. В данном

случае такое восстановление невозможно из-за присутствия разных олигомерных форм белков HU и IHF в растворе. Однако с помощью функции $p(r)$ можно определить усреднённые максимальный размер D_{max} и радиус инерции R_g . В этом случае из-за полидисперсности образцов R_g определяется не с помощью графика Guinier [74], а как усреднённая величина, рассчитанная программой GNOM из функции распределения по расстояниям $p(r)$. Как видно из табл. 2, усреднённые значения R_g для HU и IHF заметно превышают полученные с помощью программы CRY SOL [66] теоретические значения R_g^* , особенно для белка IHF. Усреднённый максимальный размер D_{max} IHF больше такового для белка HU, хотя геометрические размеры их кристаллических структур (IHF PDB ID: 1ihf и HU PDB ID: 5l8z) равны соответственно для IHF — 6,6 нм и для HU — 7,3 нм. Для моделирования использовали структуру HU-белка *Spiroplasma melliferum*, имеющую одно из максимальных разрешений, полученных для белков данного класса [75], так как в доступных кристаллических структурах HUa (PDB ID: 1MUL, 2O97) не разрешены подвижные β -листовые «руки», а сравнительный анализ, проведённый в работе Kamashev et al. [28], показал исключительно высокую консервативность пространственных структур HU-белков.

Представленные на рис. 2, б функции распределения по расстояниям $p(r)$ характерны для сильно вытянутых рассеивающих объектов — максимум смещён влево, и отношение D_{max} к размеру поперечного сечения, равного 2,3 нм и примерно соответствующего размеру белкового ядра, равно 3,9 для белка HU и 4,4 — для IHF. Максимумы на спаде функции $p(r)$ справа могут соответствовать рассеянию от повторяющихся в структуре форм, предположительно, димерам.

На рис. 2, в представлены также графики в координатах Кратки для обоих белков, позволяющие оценить степень свернутости/упорядоченности рассеивающих частиц. Колоколообразная форма максимума на графиках в целом свидетельствует об упорядоченных рассеивающих структурах, но для белка IHF этот

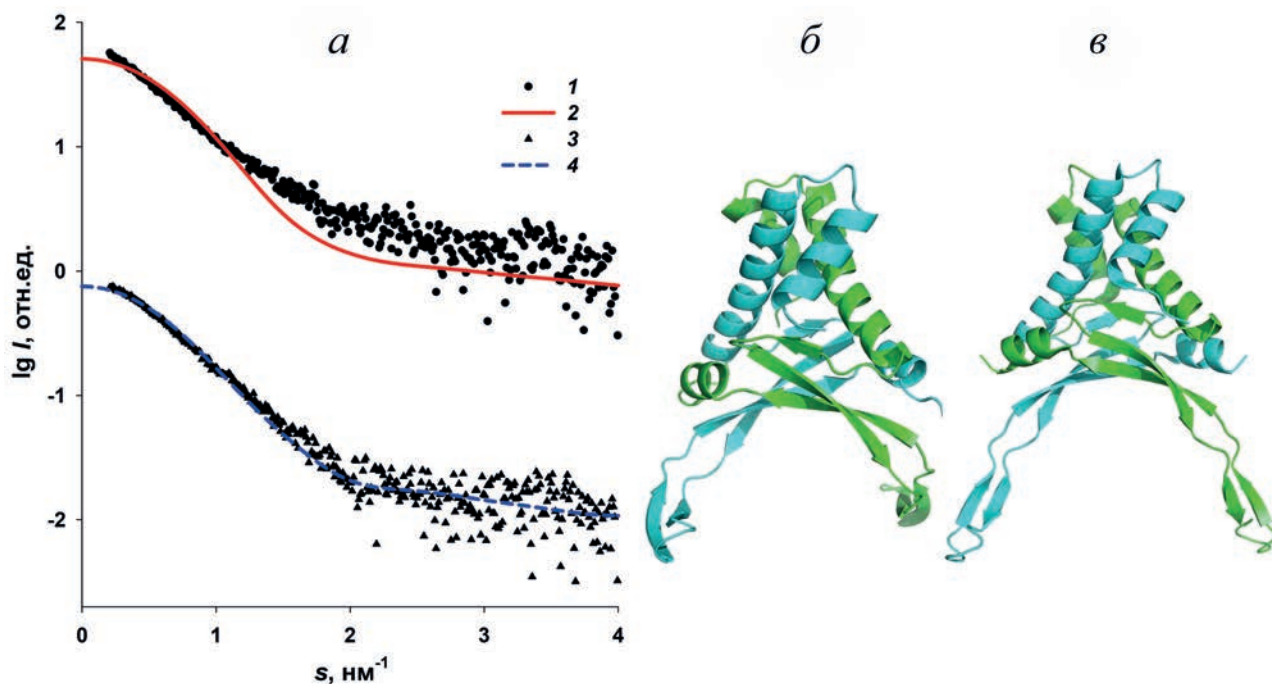


Рис. 3. Сравнение рассеяния от структур высокого разрешения белков IHF и HU с экспериментальными кривыми МУРР. *а* – Экспериментальные данные от IHF (1) и HU (3), приближение атомной моделью димера IHF (IHF PDB ID: 1ihf) (2) и HU (HU PDB ID: 5l8z) (4); *б* – структура высокого разрешения димера IHF; *в* – структура высокого разрешения димера HU. Мономеры белков IHF и HU показаны разными цветами

максимум менее выражен и характерен для более развёрнутой и вытянутой структуры [76].

Структурное моделирование белков HU и IHF по данным МУРР. Полученные нами интегральные структурные характеристики HU и IHF ясно свидетельствуют об олигомеризации белков в растворе. Хотя основным компонентом для обоих белков является димер, в растворе явно присутствуют олигомеры более высокого порядка, и особенно ярко это выражено для белка IHF. Ещё одним доказательством мультимеризации HU и IHF является сравнение теоретического рассеяния от структур высокого разрешения с экспериментальными кривыми МУРР (рис. 3).

Для белка IHF сравнение экспериментальной (рис. 3, кривая 1) и теоретической, рассчитанной программой CRY SOL [66] из атомных координат димера IHF (PDB ID: 1ihf) (рис. 3, кривая 2), кривых рассеяния свидетельствует об их несовпадении на всех диапазонах угловых векторов, что подтверждает сделанный выше вывод о наличии в растворе этого белка более высоких, чем димер, олигомеров, причём в достаточно больших количествах.

Для белка HU такое несовпадение не столь очевидно. Однако теоретическая кривая МУРР для этого белка (использовались атомные координаты его димера PDB ID: 5l8z) (рис. 3, кривая 4) не вполне удовлетворительно при-

ближает экспериментальные данные, полученные от раствора HU (рис. 3, кривая 3). В частности, в районе самых малых углов расчётная кривая систематически отличается от экспериментальной, что, по всей видимости, также связано с частичной мультимеризацией HU в растворе. Если в образце HU наряду с димерами предположить наличие определённого количества тетрамеров (использующих димер как функциональную строительную единицу), то возможно приблизить данные МУРР. Исходно был опробован тетрамер, образованный двумя соседними димерами в элементарной ячейке кристаллической структуры, полученный с помощью сервера PISA [77]. С учётом наличия в растворе определённого количества такого тетрамера экспериментальные данные удалось приблизить во всём диапазоне углов рассеяния (рис. 4, *а*; кривая 2). Полученные при этом программой OLIGOMER [63] объёмные доли димера и тетрамера в их равновесной смеси составили 75% и 25% соответственно.

Использование тетрамера из кристаллической структуры позволяет ограничить количество степеней свободы при моделировании четвертичной структуры мультимера в растворе, но в то же время такая конфигурация может быть артефактом. Стоит отметить, что в действительности в растворе может присутствовать тетрамер и с другой четвертичной

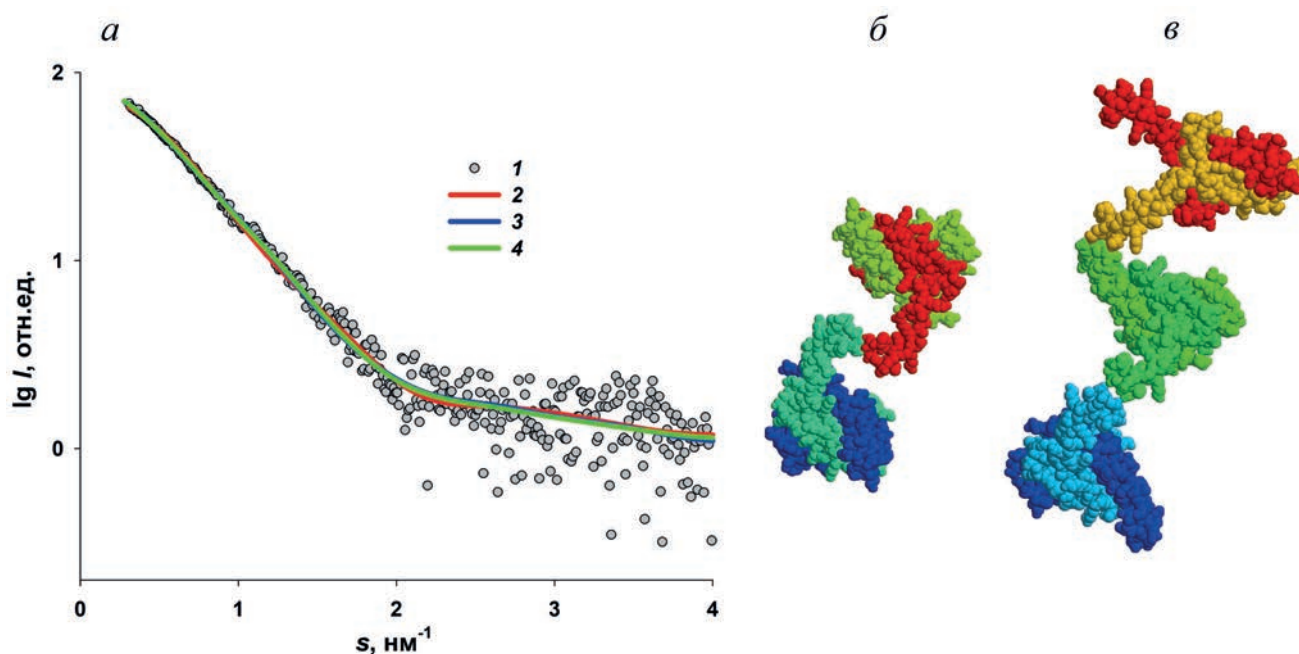


Рис. 4. Приближение экспериментальных данных МУРР от НУ равновесными смесями (а): 1 — экспериментальные данные; 2 — кривая рассеяния от смеси димеров и тетрамеров, полученных с помощью PISA; 3 — кривая рассеяния от смеси димеров и тетрамеров, полученных с помощью SASREFMX; 4 — кривая рассеяния от смеси димеров, тетрамеров и гексамеров, полученных в HEMIX. б — Модель тетрамера, построенная из двух димеров программой SASREFMX. Отдельные мономеры показаны разным цветом. в — Модель гексамера, построенная HEMIX из трёх кристаллографических димеров

структурой, имеющий интерфейс, отличный от кристаллической упаковки. С использованием программы расчёта четвертичной структуры с помощью метода молекулярной тектоники для приближения данных МУРР от полидисперсного раствора SASREFMX [67], использовавшей димер в качестве твёрдого тела, были построены несколько различных тетрамеров с разными интерфейсами димер-димер. Одна из полученных моделей, показанная на рис. 4, б, также приближает всю кривую МУРР (рис. 4, а; кривая 3). Несмотря на различия в конфигурации тетрамеров, полученные в отдельных восстановлении, объёмные доли тем не менее варьировались в узком диапазоне 20–23%. Такой вклад тетрамера хорошо согласуется с данными ДРС, предсказывающими наличие 17% частиц больших, чем димер, в растворе НУ. Были также предприняты попытки построить более длинные олигомеры (гексамеры) с помощью программы HEMIX, представляющую раствор как равновесную смесь димеров, тетрамеров и гексамеров. В этом случае приближение экспериментальных данных было также хорошим (рис. 4, а; кривая 4) при объёмных долях димера, тетрамера и гексамера 83%, 10% и 7% соответственно, что ещё лучше согласуется с данными ДРС. Получившийся интерфейс между отдельными димерами в гексамере (рис. 4, в) хорошо воспроизводит

тип контакта, полученный в модели тетрамера с помощью SASREFMX (рис. 4, б и в). Однако следует учесть, что полученные объёмные доли тетрамеров и гексамеров соответствуют меньшим молярным долям этих олигомеров. По сравнению с димером, молярные фракции снижаются в 2 и в 3 раза для тетрамера и гексамера соответственно. Таким образом, в молярном выражении присутствие высоких олигомеров достаточно ограничено.

Предположительное присутствие в растворе высоких олигомеров ИНФ (например, гексамеров) не позволяет провести структурное моделирование этого белка по той же схеме, как это было сделано для белка НУ. Например, анализ с помощью PISA не мог быть проведён, т.к. в элементарной ячейке кристаллографической модели (PDB ID: 1ihf) отсутствуют связанные фрагменты, состоящие из 6 мономеров белка.

Для моделирования гексамера ИНФ также не могла быть использована программа SASREFMX, поскольку её алгоритм предполагает возможное наличие только двух фракций в смеси (полная структура и один продукт диссоциации). В данном случае необходимо было принимать во внимание три фракции в растворе: димеры, тетрамеры и гексамеры, поэтому для структурного моделирования этого белка была использована программа HEMIX.

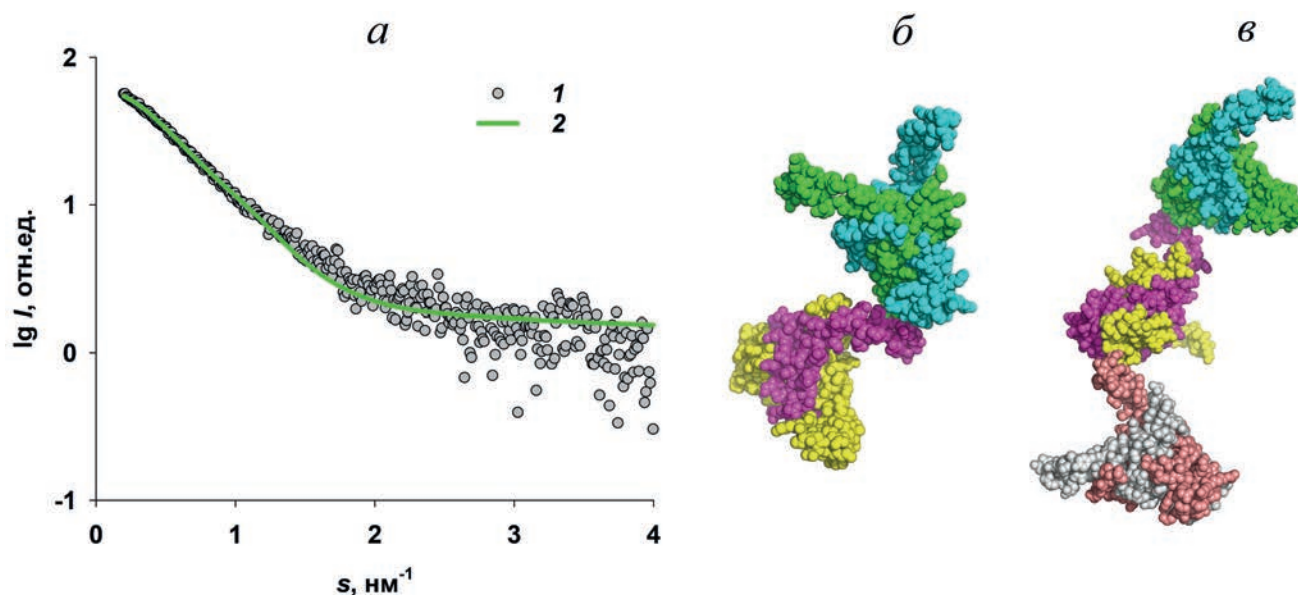


Рис. 5. Приближение экспериментальных данных МУРР от ИНФ равновесными смесями (а): 1 — экспериментальные данные; 2 — кривая рассеяния от смеси димеров, тетрамеров и гексамеров, полученных в NEMIX. б — Модель, состоящая из 2 димеров. в — Модель, состоящая из 3 димеров

С помощью программы NEMIX были построены тетрамер и гексамер, где в качестве строительного блока использовался димер. Программа перебирает все возможные конфигурации таких строительных блоков. Модели, построенные таким образом, представлены на рис. 5, б и в.

Для оценки объёмной доли компонентов в растворе белка ИНФ, полученных программой NEMIX (димера, тетрамера и гексамера), использовалась программа OLIGOMER. Хорошее приближение к экспериментальным данным для ИНФ (рис. 5, а; кривая 2) получилось при объёмных долях димера, тетрамера и гексамера 45%, 33% и 22%. Молекулярная масса такой смеси оказалась равной 38 кДа, что совпадает со значением этой величины, полученным по экспериментальным данным (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Организация и уплотнение ДНК служит нескольким целям. С одной стороны, уменьшение полезного объёма бактериальной хромосоме требуется, чтобы поместиться в клетке. С другой стороны, становится всё более очевидным, что ответ на стимулы окружающей среды в значительной степени опосредуется действием архитектурных белков — NAP. Эти белки, весьма разнообразные по своим структурным и функциональным особенностям (см. «Введение»), либо действуют однонаправленно, формируя репрессивные мультис-

ковые комплексы, или, наоборот, проявляют антагонизм, противодействуя друг другу. Разнообразие функций, контролируемых NAP на разных этапах жизненного цикла клетки, приводит к изменению их экспрессии в разные периоды роста клеточной популяции [4, 7]. При этом в каждой фазе роста присутствует по крайней мере один из белков NAP, который экспрессируется максимально [13]. В соответствии с данными, приведёнными в работе Luijsterburg et al. [13] для 5 архитектурных белков *E. coli* (Н-NS, HU, INF, Fis и Dps), на ранней экспоненциальной стадии доминирует Fis, на экспоненциальной — HU, в стационарной — INF и поздней стационарной фазе — Dps. Белок Н-NS присутствует всегда, но никогда не доминирует, и его экспрессия резко уменьшается в стационарной и поздней стационарной фазах. Существенно, что в любой фазе роста в значительном количестве присутствуют белки, изгибающие ДНК (HU, INF, Fis) и противодействующие влиянию соединяющих белков 1-й группы (Н-NS). Эти NAP модулируют петлевую структуру нуклеоида, тем самым обеспечивая транскрипционно активную структуру нуклеоида во время фаз относительно быстрого роста [8–11]. И только в поздней стационарной фазе Dps образует кристаллы с ДНК и в результате трансформирует динамический нуклеоид в статическую, и, как предполагалось ранее, транскрипционно неактивную структуру, эффективно защищённую от внешних воздействий [13, 78]. Однако недавние исследования *in vitro* продемонстрирова-

ли, что Dps блокирует эндонуклеазы рестрикции, но не РНК-полимеразы от связывания с ДНК [79].

Для выяснения сложного механизма функциональных взаимоотношений среди белков NAP необходимо сначала детально разобраться в молекулярных особенностях функционирования индивидуальных белков. На настоящий момент основная структурная информация о белках NAP получена с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА) и не отражает их поведения в растворе, о чём свидетельствуют структурные исследования методом ЯМР, проведённые, к сожалению, для незначительного числа белков. В этой ситуации именно малоугловые исследования могут выявить важные особенности поведения индивидуальных NAP в нативном (не кристаллическом) состоянии.

Результаты проведённых в данной работе исследований с помощью МУРР показывают, что белки HU и IHF олигомеризуются в растворе, причём в разной степени: для IHF характерно присутствие крупных олигомеров, состоящих из исходных димеров, выстроенных в цепочку. Это наблюдение очень важно с точки зрения взаимодействия этих белков с ДНК на поздних стадиях роста клеток. В работе Frenkiel-Krispin et al. [43] с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и томографической реконструкции в эксперименте *in vivo* было показано, что в начале стационарной фазы роста бактериальный хроматин претерпевает массивную реорганизацию и формируется в упорядоченные тороидальные структуры. Авторами был сделан вывод, что основным фактором такой реорганизации является белок Dps. Тороидальная форма хроматина характерна для периода 24-часового голодания бактерий *E. coli*. Далее, по мере голодания тороидальная морфология, по мнению авторов, действуя как структурный шаблон, способствует формированию гексагональных кристаллических решёток ДНК–Dps посредством эпитаксиального роста, и после 48-часового голодания тороидальные структуры полностью исчезают. Интерпретация, предложенная Frenkiel-Krispin et al. [43], несколько противоречива, поскольку в полученных тороидальных формах расстояние между чередующимися слоями, предположительно ДНК–Dps, оценивалось в 6,8–7,5 нм, что недостаточно для наличия в этих слоях белка Dps с размерами 9 нм в присутствии нитей ДНК толщиной порядка 2,4 нм, учитывая даже 20%-ную возможную усадку под электронным лучом. Нами с помощью МУРР и криоэлектронной микроскопии было показано, что в

зависимости от состава буфера *in vitro* кристаллическая упаковка комплекса ДНК–Dps в растворе может меняться от гексагональной до кубической с межслоевыми расстояниями соответственно 9,97 и 9,81 нм [44, 45], и ДНК в этих структурах располагается во впадинах между сферическими молекулами белка.

На основании анализа приведённых выше литературных данных и результатов нашей работы мы можем предложить гипотезу, которая несколько иначе представляет процесс формирования комплексов ДНК–Dps, где вместо крупных сферических молекул Dps в ранней стационарной фазе присутствует более компактный белок IHF, который доминирует в этой фазе и предшествует появлению Dps в доминантных количествах. Как мы показали, IHF образует олигомеры в виде цепочек, что предполагает возможность слоевой укладки ДНК, изгибая её в тороидальную структуру в соответствии с функциональной особенностью белка этого класса. Кроме того, геометрические размеры и форма IHF могут объяснить формирование тороидов в ранней стационарной фазе с межплоскостным расстоянием 6,8–7,5 нм, как это было определено Frenkiel-Krispin et al. [43]. В этом случае можно предположить, что в поздней стационарной фазе молекулы IHF заменяются на Dps, который даже без ДНК образует мультислоевую структуру с гексагональной упаковкой додекамера [80] и тем самым определяет структуру возникающего кристаллического комплекса ДНК–Dps.

Мы предполагаем, что именно таким образом белки-предшественники HU и IHF на разных стадиях жизненного цикла бактериальной клетки готовят формирование защитного кристаллического комплекса ДНК–Dps. Будучи гомологами, схожими по форме, HU и IHF могут действовать и последовательно, и вместе. В целом, можно заключить, что переход от активного роста бактерий к стационарной фазе влечёт за собой скоординированный процесс, в котором энергезависимый динамический порядок хроматина последовательно заменяется равновесным кристаллическим порядком. Тем не менее возможен и обратный переход. Так, в работе Lee et al. [81] показано, что изменение факторов окружающей среды в физиологическом диапазоне, например, повышение pH и концентрации $MgCl_2$, приводит к переключению связывания ДНК с Dps на IHF-связывание, т.е. к возвращению к транскрипционно активной структуре нуклеоида, когда клетки могут перейти к экспоненциальной фазе и способны продолжать свою метаболическую активность.

Важно отметить, что подобные процессы в бактериальных клетках происходят посредством мультимеризации NAP. Эти процессы, а также формирование комплексов NAP с ДНК являются обратимыми (см. выше), так как бактерии нуждаются в динамической модуляции своих нуклеоидных структур на разных фазах роста, а также в ответ на изменения окружающей среды. При этом большая часть физиологически значимых белок-белковых и белок-геномных взаимодействий являются транзиентными, что позволяет белкам легко переходить из одного комплекса в другой при изменении условий среды.

Олигомеризация NAP вызывает интерес многих научных групп, и эти процессы ещё далеко не полностью исследованы. С помощью малоуглового рентгеновского рассеяния нам удалось не только детектировать образующиеся при сравнительно низких концентрациях белка (2–5 мг/мл) мультимеры HU и IHF, но также определить их пространственную структуру. Полученные нами результаты станут основой для дальнейшего изучения процессов биокристаллизации и помогут выявить важные в научном (понимание механизма действия) и практическом (разработка фармакологических ингибиторов) плане особенности

поведения индивидуальных NAP в нативном (не кристаллическом) состоянии.

Вклад авторов. Л.А. Дадинова, Э.В. Штыкова — концепция и руководство работой; Л.А. Дадинова, М.В. Петухов, А.М. Гордиенко, Г.С. Петерс — проведение экспериментов; В.А. Манувера, В.Н. Лазарев, Т.В. Ракитина, А.А. Можаяев — получение образцов; Л.А. Дадинова, М.В. Петухов, А.М. Гордиенко, В.А. Манувера, В.Н. Лазарев, Т.В. Ракитина, А.А. Можаяев, Г.С. Петерс, Э.В. Штыкова — написание текста; М.В. Петухов, Т.В. Ракитина, Э.В. Штыкова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-74-10071) в части исследований белка IHF и при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части исследований белка HU.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dame, R. T. (2005) The role of nucleoid-associated proteins in the organization and compaction of bacterial chromatin, *Mol. Microbiol.*, **56**, 858–870, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04598.x.
2. Johnson, R. C., Johnson, L. M., Schmidt, J. W., and Gardner, J. F. (2005) *Major Nucleoid Proteins in the Structure and Function of the Escherichia coli Chromosome*, in *The Bacterial Chromosome* (Patrick Higgins, N., ed.) ACM Press, Washington, DC, pp. 65–131.
3. Travers, A., and Muskhelishvili, G. (2005) Bacterial chromatin, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 507–514, doi: 10.1016/j.gde.2005.08.006.
4. Dillon, S. C., and Dorman, C. J. (2010) Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression, *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 185–195, doi: 10.1038/nrmicro2261.
5. Glinkowska, M., Waldminghaus, T., and Riber, L. (2021) Editorial: bacterial chromosomes under changing environmental conditions, *Front. Microbiol.*, **12**, 633466, doi: 10.3389/fmicb.2021.633466.
6. Norris, V., Kayser, C., Muskhelishvili, G., and Kontoghiorghi, Y. (2022) The roles of nucleoid-associated proteins and topoisomerases in chromosome structure, strand segregation and the generation of phenotypic heterogeneity in bacteria, *FEMS Microbiol. Rev.*, fuac049, doi: 10.1093/femsre/fuac049.
7. Amemiya, H. M., Schroeder, J., and Freddolino, P. L. (2021) Nucleoid-associated proteins shape chromatin structure and transcriptional regulation across the bacterial kingdom, *Transcription*, **12**, 182–218, doi: 10.1080/21541264.2021.1973865.
8. Wold, S., Crooke, E., and Skarstad, K. (1996) The *Escherichia coli* Fis protein prevents initiation of DNA replication from oriC *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3527–3532, doi: 10.1093/nar/24.18.3527.
9. Atlung, T., and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression, *Mol. Microbiol.*, **24**, 7–17, doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.3151679.x.
10. Kamashev, D., and Rouviere-Yaniv, J. (2000) The histone-like protein HU binds specifically to DNA recombination and repair intermediates, *EMBO J.*, **19**, 6527–6535, doi: 10.1093/emboj/19.23.6527.
11. Shahul Hameed, U. F., Liao, C., Radhakrishnan, A. K., Huser, F., Aljedani, S. S., Zhao, X., Momin, A. A., Melo, F. A., Guo, X., Brooks, C., Li, Y., Cui, X., Gao, X., Ladbury, J. E., Jaremko, L.,

- Jaremko, M., Li, J., and Arold, S. T. (2019) H-NS uses an autoinhibitory conformational switch for environment-controlled gene silencing, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 2666-2680, doi: 10.1093/nar/gky1299.
12. Holowka, J., and Zakrzewska-Czerwinska, J. (2020) Nucleoid associated proteins: the small organizers that help to cope with stress, *Front. Microbiol.*, **11**, 590, doi: 10.3389/fmicb.2020.00590.
13. Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, G. J., and Dame, R. T. (2006) The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective, *J. Struct. Biol.*, **156**, 262-272, doi: 10.1016/j.jsb.2006.05.006.
14. Wang, W., Li, G. W., Chen, C., Xie, X. S., and Zhuang, X. (2011) Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria, *Science*, **333**, 1445-1449, doi: 10.1126/science.1204697.
15. Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A., and Bertin, P. (2001) Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS, *Mol. Microbiol.*, **40**, 20-36, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02358.x.
16. Tendeng, C., and Bertin, P. N. (2003) H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins, *Trends Microbiol.*, **11**, 511-518, doi: 10.1016/j.tim.2003.09.005.
17. Dorman, C. J., Hinton, J. C., and Free, A. (1999) Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria, *Trends Microbiol.*, **7**, 124-128, doi: 10.1016/s0966-842x(99)01455-9.
18. Thanbichler, M., Wang, S. C., and Shapiro, L. (2005) The bacterial nucleoid: a highly organized and dynamic structure, *J. Cell. Biochem.*, **96**, 506-521, doi: 10.1002/jcb.20519.
19. Leonard, P. M., Smits, S. H., Sedelnikova, S. E., Brinkman, A. B., de Vos, W. M., van der Oost, J., Rice, D. W., and Rafferty, J. B. (2001) Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus*, *EMBO J.*, **20**, 990-997, doi: 10.1093/emboj/20.5.990.
20. Beloin, C., Jeusset, J., Revet, B., Mirambeau, G., Le Hagarat, F., and Le Cam, E. (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein, *J. Biol. Chem.*, **278**, 5333-5342, doi: 10.1074/jbc.M207489200.
21. Calvo, J. M., and Matthews, R. G. (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*, *Microbiol. Rev.*, **58**, 466-490, doi: 10.1128/mr.58.3.466-490.1994.
22. Brinkman, A. B., Ettema, T. J., de Vos, W. M., and van der Oost, J. (2003) The Lrp family of transcriptional regulators, *Mol. Microbiol.*, **48**, 287-294, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03442.x.
23. Losada, A., and Hirano, T. (2005) Dynamic molecular linkers of the genome: the first decade of SMC proteins, *Genes Dev.*, **19**, 1269-1287, doi: 10.1101/gad.1320505.
24. Nasmyth, K., and Haering, C. H. (2005) The structure and function of SMC and kleisin complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 595-648, doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133219.
25. Strunnikov, A. V. (2006) SMC complexes in bacterial chromosome condensation and segregation, *Plasmid*, **55**, 135-144, doi: 10.1016/j.plasmid.2005.08.004.
26. Swinger, K. K., and Rice, P. A. (2004) IHF and HU: flexible architects of bent DNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **14**, 28-35, doi: 10.1016/j.sbi.2003.12.003.
27. Kamashev, D. E., Rakitina, T. V., Matyushkina, D. S., Evsyutina, D. V., Vanyushkina, A. A., Agapova, Y. K., Anisimova, V. E., Drobyshev, A. L., Butenko, I. O., Pobeguts, O. V., and Fisunov, G. Y. (2019) Proteome of HU-Lacking *E. coli* studied by means of 2D Gel electrophoresis, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **45**, 366-373, doi: 10.1134/S1068162019050029.
28. Kamashev, D., Agapova, Y., Rastorguev, S., Talyzina, A. A., Boyko, K. M., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A., Vasilov, R., Timofeev, V. I., and Rakitina, T. V. (2017) Comparison of histone-like HU protein DNA-binding properties and HU/IHF protein sequence alignment, *PLoS One*, **12**, e0188037, doi: 10.1371/journal.pone.0188037.
29. Stojkova, P., Spidlova, P., and Stulik, J. (2019) Nucleoid-associated protein HU: A lilliputian in gene regulation of bacterial virulence, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **9**, 159, doi: 10.3389/fcimb.2019.00159.
30. Prieto, A. I., Kahramanoglou, C., Ali, R. M., Fraser, G. M., Seshasayee, A. S., and Luscombe, N. M. (2012) Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3524-3537, doi: 10.1093/nar/gkr1236.
31. Remesh, S. G., Verma, S. C., Chen, J. H., Ekman, A. A., Larabell, C. A., Adhya, S., and Hammel, M. (2020) Nucleoid remodeling during environmental adaptation is regulated by HU-dependent DNA bundling, *Nat. Commun.*, **11**, 2905, doi: 10.1038/s41467-020-16724-5.
32. Hales, L. M., Gumpert, R. I., and Gardner, J. F. (1994) Determining the DNA sequence elements required for binding integration host factor to two different target sites, *J. Bacteriol.*, **176**, 2999-3006, doi: 10.1128/jb.176.10.2999-3006.1994.
33. Kostrewa, D., Granzin, J., Koch, C., Choe, H. W., Raghunathan, S., Wolf, W., Labahn, J., Kahmann, R., and Saenger, W. (1991) Three-dimensional structure of the *E. coli* DNA-binding protein FIS, *Nature*, **349**, 178-180, doi: 10.1038/349178a0.
34. Pan, C. Q., Finkel, S. E., Cramton, S. E., Feng, J. A., Sigman, D. S., and Johnson, R. C. (1996) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by

- flanking DNA-protein contacts, *J. Mol. Biol.*, **264**, 675-695, doi: 10.1006/jmbi.1996.0669.
35. Shao, Y., Feldman-Cohen, L. S., and Osuna, R. (2008) Biochemical identification of base and phosphate contacts between Fis and a high-affinity DNA binding site, *J. Mol. Biol.*, **380**, 327-339, doi: 10.1016/j.jmb.2008.04.075.
 36. Azam, T. A., and Ishihama, A. (1999) Twelve species of the nucleoid-associated protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33105-33113, doi: 10.1074/jbc.274.46.33105.
 37. 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, doi: 10.1101/gad.6.12b.2646.
 38. Nair, S., and Finkel, S. E. (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase, *J. Bacteriol.*, **186**, 4192-4198, doi: 10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004.
 39. 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, doi: 10.1016/j.jsb.2006.05.014.
 40. Martinez, A., and Kolter, R. (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps, *J. Bacteriol.*, **179**, 5188-5194, doi: 10.1128/jb.179.16.5188-5194.1997.
 41. Reich, Z., Wachtel, E. J., and Minsky, A. (1994) Liquid-crystalline mesophases of plasmid DNA in bacteria, *Science*, **264**, 1460-1463, doi: 10.1126/science.8197460.
 42. Wolf, S. G., Frenkiel, D., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (1999) DNA protection by stress-induced biocrystallization, *Nature*, **400**, 83-85, doi: 10.1038/21918.
 43. Frenkiel-Krispin, D., Ben-Avraham, I., Englander, J., Shimoni, E., Wolf, S. G., and Minsky, A. (2004) Nucleoid restructuring in stationary-state bacteria, *Mol. Microbiol.*, **51**, 395-405, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03855.x.
 44. Dadinova, L. A., Chesnokov, Y. M., Kamyshinsky, R. A., Orlov, I. A., Petoukhov, M. V., Mozhaev, A. A., Soshinskaya, E. Y., Lazarev, V. N., Manuvera, V. A., Orekhov, A. S., Vasiliev, A. L., and Shtykova, E. V. (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, doi: 10.1002/1873-3468.13439.
 45. Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Dadinova, L., Mozhaev, A., Orlov, I., Petoukhov, M., Orekhov, A., Shtykova, E., and Vasiliev, A. (2019) Polymorphic protective Dps-DNA co-crystals by cryo electron tomography and small Angle X-Ray scattering, *Biomolecules*, **10**, 39, doi: 10.3390/biom10010039.
 46. Dadinova, L., Kamyshinsky, R., Chesnokov, Y., Mozhaev, A., Matveev, V., Gruzinov, A., Vasiliev, A., and Shtykova, E. (2021) Structural rearrangement of Dps-DNA complex caused by divalent Mg and Fe cations, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 6056, doi: 10.3390/ijms22116056.
 47. Сошинская Е. Ю., Дадина 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, doi: 10.31857/S0023476120060338.
 48. Dubrovin, E. V., Dadinova, L. A., Petoukhov, M. V., Soshinskaya, E. Y., Mozhaev, A. A., Klinov, D. V., Schaffer, T. E., Shtykova, E. V., and Batishchev, O. V. (2021) Spatial organization of Dps and DNA-Dps complexes, *J. Mol. Biol.*, **433**, 166930, doi: 10.1016/j.jmb.2021.166930.
 49. Shtykova, E. V., Petoukhov, M. V., and Mozhaev, A. A. (2022) Formation of iron oxide nanoparticles in the internal cavity of ferritin-like Dps protein: studies by anomalous X-ray scattering, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 511-523, doi: 10.1134/S0006297922060037.
 50. Loiko, N., Danilova, Y., Moiseenko, A., Kovalenko, V., Tereshkina, K., Tutukina, M., El'-Registan, G., Sokolova, O., and Krupyanskii, Y. (2020) Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells, *PLoS One*, **15**, e0231562, doi: 10.1371/journal.pone.0231562.
 51. Krupyanskii, Y. F., Kovalenko, V. V., Loiko, N. G., Generalova, A. A., Moiseenko, A. V., Tereshkin, E. V., Sokolova, O. S., Tereshkina, K. B., El'-Registan, G. I., and Popov, A. N. (2022) Architecture of condensed DNA in the nucleoid of *Escherichia coli* bacterium, *Biophysics*, **67**, 506-517, doi: 10.1134/S0006350922040133.
 52. 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, doi: 10.1038/nsb0498-294.
 53. 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, doi: 10.1074/jbc.M208825200.
 54. Ceci, P., Cellai, S., Falvo, E., Rivetti, C., Rossi, G. L., and Chiancone, E. (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, doi: 10.1093/nar/gkh915.
 55. Agapova, Y. K., Altukhov, D. A., Timofeev, V. I., Stroylov, V. S., Mityanov, V. S., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A. V., Smirnova, E. V., Bocharov, E. V., and Rakitina, T. V. (2020) Structure-based inhibitors targeting the alpha-helical domain of the *Spiroplasma melliferum* histone-like HU protein, *Sci. Rep.*, **10**, 15128, doi: 10.1038/s41598-020-72113-4.

56. Svergun, D. I., Koch, M. H., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) *Small Angle X-ray and Neutron Scattering from Solutions of Biological Macromolecules*, Oxford University Press, London.
57. Nash, H. A., Robertson, C. A., Flamm, E., Weisberg, R. A., and Miller, H. I. (1987) Overproduction of *Escherichia coli* integration host factor, a protein with nonidentical subunits, *J. Bacteriol.*, **169**, 4124-4127, doi: 10.1128/jb.169.9.4124-4127.1987.
58. Klock, H. E., and Lesley, S. A. (2009) The Polymerase Incomplete Primer Extension (PIPE) method applied to high-throughput cloning and site-directed mutagenesis, *Methods Mol. Biol.*, **498**, 91-103, doi: 10.1007/978-1-59745-196-3_6.
59. Vorgias, C. E., and Wilson, K. S. (1991) A rapid purification procedure of recombinant integration host factor from *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, **2**, 317-320, doi: 10.1016/1046-5928(91)90089-2.
60. Peters, G. S., Zakharchenko, O. A., Konarev, P. V., Karmazikov, Y. V., Smirnov, M. A., Zabelin, A. V., Mukhamedzhanov, E. H., Veligzhanin, A. A., Blagov, A. E., and Kovalchuk, M. V. (2019) The small-angle X-ray scattering beamline BioMUR at the Kurchatov synchrotron radiation source, *Nuclear Instr. Methods Phys. Res. Sec. A Accelerat. Spectrom. Detect. Assoc. Equip.*, **945**, 162616, doi: 10.1016/j.nima.2019.162616.
61. Peters, G. S., Gaponov, Y. A., Konarev, P. V., Marchenkova, M. A., Ilina, K. B., Volkov, V. V., Pisarevskiy, Y. V., and Kovalchuk, M. V. (2022) Upgrade of the BioMUR beamline at the Kurchatov synchrotron radiation source for serial small-angle X-ray scattering experiments in solutions, *Nuclear Instr. Methods Phys. Res. Sec. A Accelerat. Spectrom. Detect. Assoc. Equip.*, **1025**, 166170, doi: 10.1016/j.nima.2021.166170.
62. Hammersley, A. P. (2016) FIT2D: a multi-purpose data reduction, analysis and visualization program, *J. Appl. Cryst.*, **49**, 646-652, doi: 10.1107/S1600576716000455.
63. 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, doi: 10.1107/S0021889803012779.
64. Manalastas-Cantos, K., Konarev, P. V., Hajizadeh, N. R., Kikhney, A. G., Petoukhov, M. V., Molodenskiy, D. S., Panjkovich, A., Mertens, H. D. T., Gruzinov, A., Borges, C., Jeffries, C. M., Svergun, D. I., and Franke, D. (2021) ATSAS 3.0: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Cryst.*, **54**, 343-355, doi: 10.1107/S1600576720013412.
65. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Cryst.*, **25**, 495-503, doi: 10.1107/S0021889892001663.
66. Svergun, D. I., 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, doi: 10.1107/S0021889895007047.
67. Petoukhov, M. V., Billas, I. M., Takacs, M., Graewert, M. A., Moras, D., and Svergun, D. I. (2013) Reconstruction of quaternary structure from X-ray scattering by equilibrium mixtures of biological macromolecules, *Biochemistry*, **52**, 6844-6855, doi: 10.1021/bi400731u.
68. Winardhi, R. S., Yan, J., and Kenney, L. J. (2015) H-NS regulates gene expression and compacts the nucleoid: insights from single-molecule experiments, *Biophys. J.*, **109**, 1321-1329, doi: 10.1016/j.bpj.2015.08.016.
69. Hammel, M., Amlanjyoti, D., Reyes, F. E., Chen, J. H., Parpana, R., Tang, H. Y., Larabell, C. A., Tainer, J. A., and Adhya, S. (2016) HU multimerization shift controls nucleoid compaction, *Sci. Adv.*, **2**, e1600650, doi: 10.1126/sciadv.1600650.
70. Huang, L., Zhang, Z., and McMacken, R. (2021) Interaction of the *Escherichia coli* HU protein with various topological forms of DNA, *Biomolecules*, **11**, 1724, doi: 10.3390/biom11111724.
71. Frenkiel-Krispin, D., Levin-Zaidman, S., Shimoni, E., Wolf, S. G., Wachtel, E. J., Arad, T., Finkel, S. E., Kolter, R., and Minsky, A. (2001) Regulated phase transitions of bacterial chromatin: a non-enzymatic pathway for generic DNA protection, *EMBO J.*, **20**, 1184-1191, doi: 10.1093/emboj/20.5.1184.
72. Petoukhov, M. V., Franke, D., Shkumatov, A. V., Tria, G., Kikhney, A. G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H. D. T., Konarev, P. V., and Svergun, D. I. (2012) New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **45**, 342-350, doi: 10.1107/S0021889812007662.
73. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
74. Guinier, A. (1939) La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques, *Ann. Phys. (Paris)*, **12**, 161-237, doi: 10.1051/anphys/193911120161.
75. Boyko, K. M., Rakitina, T. V., Korzhenevskiy, D. A., Vlaskina, A. V., Agapova, Y. K., Kamashev, D. E., Kleymenov, S. Y., and Popov, V. O. (2016) Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the mollicute *Spiroplasma melliferum* KC3, *Sci. Rep.*, **6**, 36366, doi: 10.1038/srep36366.
76. Jacques, D. A., Guss, J. M., Svergun, D. I., and Trehwella, J. (2012) Publication guidelines for structural modelling of small-angle scattering data from biomolecules in solution, *Acta Crystallogr. Sec. D*, **68**, 620-626, doi: 10.1107/S0907444912012073.

77. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state, *J. Mol. Biol.*, **372**, 774-797, doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.022.
78. 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, doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03644.x.
79. Janissen, R., Arens, M. M. A., Vtyurina, N. N., Rivai, Z., Sunday, N. D., Eslami-Mossallam, B., Gritsenko, A. A., Laan, L., de Ridder, D., Artsimovitch, I., Dekker, N. H., Abbondanzieri, E. A., and Meyer, A. S. (2018) Global DNA compaction in stationary-phase bacteria does not affect transcription, *Cell*, **174**, 1188-1199. e1114, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.049.
80. Ren, B., Tibbelin, G., Kajino, T., Asami, O., and Ladenstein, R. (2003) The multi-layered structure of Dps with a novel di-nuclear ferroxidase center, *J. Mol. Biol.*, **329**, 467-477, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00466-2.
81. Lee, S. Y., Lim, C. J., Droge, P., and Yan, J. (2016) Regulation of bacterial DNA packaging in early stationary phase by competitive DNA binding of Dps and IHF, *Sci. Rep.*, **5**, 18146, doi: 10.1038/srep18146.

NUCLEOID-ASSOCIATED PROTEINS HU AND IHF: OLIGOMERIZATION IN SOLUTION AND HYDRODYNAMIC PROPERTIES

**L. A. Dadinova¹, M. V. Petoukhov¹, A. M. Gordienko¹, V. A. Manuvera^{2,3}, V. N. Lazarev^{2,3},
T. V. Rakitina^{4,5}, A. A. Mozhaev^{1,4}, G. S. Peters⁵, and E. V. Shtykova^{1*}**

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

² *Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

³ *Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

⁴ *Shemyakin—Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia*

⁵ *NRC "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

The structure and function of the bacterial nucleoid is controlled by nucleoid-associated NAP proteins. In any phase of growth, various NAPs, acting sequentially, condense the nucleoid and provide its transcriptionally active structure. However, in the late stationary phase, only one of the NAPs, the Dps protein, is strongly expressed, and DNA–protein crystals are formed that transform the nucleoid into a static, transcriptionally inactive structure, effectively protected from external influences. The discovery of crystal structures in living cells and the association of this phenomenon with bacterial resistance to antibiotics has aroused great interest in studying this phenomenon. The aim of this work is to obtain and compare the structures of two related NAPs (HU and IHF), since they are the ones that accumulate in the cell at the late stationary stage of growth, which precedes the formation of the protective DNA–Dps crystalline complex. For structural studies, two complementary methods were used in the work: small-angle X-ray scattering (SAXS) as the main method for studying the structure of proteins in solution and dynamic light scattering as an additional one. Various approaches and computer programs were used to interpret the SAXS data, which made it possible to determine the macromolecular characteristics and obtain reliable structural 3D models of various oligomeric forms of the HU and IHF proteins. It was shown that these proteins oligomerize in solution to varying degrees, and IHF is characterized by the presence of large oligomers consisting of initial dimers arranged in a chain. It was suggested that just before Dps expression, it is this protein that forms the toroidal structures previously observed *in vivo* and prepares the platform for the formation of DNA–Dps crystals. The results obtained are necessary for further study of the phenomenon of biocrystal formation in bacterial cells and finding ways to overcome the resistance of various pathogens to external conditions.

Keywords: nucleoid-associated proteins, histone-like proteins HU and IHF, oligomerization, small-angle X-ray scattering, dynamic light scattering

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- ИЛИ Y-ХРОМОСОМУ, ДЛЯ ИХ РАЗДЕЛЕНИЯ НА КЛЕТКИ ОДНОГО ТИПА

Обзор

© 2023 Д.В. Поздышев^{1*}, Н.А. Комбарова², В.И. Муронец^{1,3}

¹ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: denispoz@gmail.com

² Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных,
142143 пос. Быково, Московская обл., Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.12.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 20.02.2023

В обзоре собрана информация о биохимических особенностях сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, которые позволяют получить фракцию спермы с определённой половой хромосомой. Практически единственная используемая на сегодняшний день технология такого разделения (сексирования) основана на сортировке сперматозоидов по содержанию ДНК методом проточной цитофлуориметрии. Помимо прикладных аспектов, эта технология дала возможность проводить анализ свойств изолированных популяций сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому. В последние годы появился ряд работ, доказавший существование различий между этими популяциями на уровне транскриптома и протеома. Примечательно, что эти различия связаны главным образом с энергетическим метаболизмом и структурными белками жгутика. На различиях в подвижности между сперматозоидами с разными половыми хромосомами основаны новые методы обогащения спермы клетками с X- или Y-хромосомой. Сегодня сексирование спермы является важной составной частью протокола искусственного осеменения коров с использованием криоконсервированного семени, позволяющего увеличить долю потомства нужного пола. Кроме того, успехи в разделении X- и Y-сперматозоидов могут позволить применять этот подход в медицине в тех случаях, когда необходимо избежать опасных заболеваний, сцепленных с полом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: X/Y-сперматозоиды, подвижность сперматозоидов, сексирование.

DOI: 10.31857/S0320972523050081, **EDN:** AYEUEB

ВВЕДЕНИЕ

Искусственное воспроизведение потомства определённого пола у млекопитающих является интересной задачей, привлекавшей внимание исследователей на протяжении многих веков. Но только в последнее время появилась возможность влиять на этот процесс с помощью разделения сперматозоидов на популяции, несущие X- или Y-хромосому (сексирование). Хотя, в принципе, предопределить пол потомства можно и у человека, протоколов по сек-

сированию спермы человека не существует, во многом потому, что при медицинских показаниях отбор проводят на стадии преимплантационного тестирования эмбриона. При этом, как будет сказано ниже, эксперименты по разделению сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, проводятся достаточно эффективно, и эта процедура весьма востребована в животноводстве. Известно, что разные отрасли животноводства имеют разные предпочтения к полу потомства. Например, при разведении мясных пород крупного рогатого скота

Принятые сокращения: TLR7/8 – Toll-подобные рецепторы 7/8.

* Адресат для корреспонденции.

предпочтительно получать бычков, а молочных пород — тёлочек. Технологии сексирования способны значительно улучшить эффективность производства. На сегодняшний день искусственное осеменение в сочетании с технологией криоконсервации семени — это основной метод в разведении крупного рогатого скота в развитых странах. Для мелких жвачных животных, таких как овцы и козы, искусственное осеменение не так распространено, но протоколы вспомогательных репродуктивных технологий активно внедряются и для этих животных [1]. В таких условиях вопрос предопределения пола во многом сводится к вопросу обогащения инсеминационной дозы сперматозоидами, несущими предпочтительную половую хромосому. Наиболее изученным методом обогащения спермы одним типом гамет является проточная сортировка с флуоресцентным мечением ДНК (FACS) [2]. Указанная технология имеет ряд недостатков и ограничений, таких как высокая стоимость оборудования и обслуживания, относительно низкая скорость сортировки, плохая масштабируемость производства, пониженные показатели фертильности [3]. При этом точность сортировки таким методом достигает 90% [4], что делает его «золотым стандартом» в сексировании семени. Высокая чистота отбора клеток была получена благодаря использованию специальной запатентованной системы позиционирования сперматозоидов в потоке сортера. И хотя эта технология, основанная на разнице в содержании ДНК в X- и Y-сперматозоидах, активно улучшается, наличие патентных ограничений заставляет сосредоточить внимание многих исследовательских групп на других методах сексирования спермы. Кроме того, сортировка с проточной флуориметрией дала возможность проводить анализ транскриптомов и протеомов разделённых популяций спермы, что выявило новые различия между ними. В настоящее время опубликован ряд обзоров, охватывающих все существующие подходы к сексированию, например, работа Vishwanath et al. [5]. В данном обзоре подробно рассмотрены исследования, посвящённые только методам обогащения спермы гаметами с определённой половой хромосомой, основанным на особенностях их подвижности, а также биологические причины таких особенностей. Так как прикладной аспект данного вопроса сегодня актуален главным образом для крупного рогатого скота, экспериментальные данные по методам обогащения собраны главным образом для бычков, в то время как информация о фундаментальных

различиях X- и Y-сперматозоидов часто была получена на млекопитающих, представляющих более распространённые модельные системы.

ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДА

Эволюция сперматозоида была направлена на возможность доставлять генетический материал к ооциту. Зрелый сперматозоид состоит из головки, несущей в себе гаплоидное ядро, и жгутика, предопределяющего его способность к перемещению [6]. Большая часть цитоплазмы элиминируется при его созревании, и сохраняются лишь некоторые из органелл. До слияния с ооцитом сперматозоид претерпевает ряд значительных изменений, при этом тип подвижности постоянно меняется. Мужские гаметы не обладают прогрессивной подвижностью сразу после отделения от клеток Сертоли в просвет семенного канальца и приобретают способность двигаться после прохождения придатка яичка [7]. После эякуляции жгутик становится активным в репродуктивных путях самки, однако на этом этапе механические характеристики биения жгутика непостоянны. В экспериментах *in vivo* при наблюдении активных сперматозоидов выделяют как минимум два типа биения жгутика с разной амплитудой [8]. *In vitro* можно отличить четыре типа биения: симметричное биение жгутика с маленькой амплитудой, асимметричное биение с большой амплитудой, промежуточный тип подвижности, а также биение среднего участка, приводящее к закручиванию жгутика [9]. Каждый тип подвижности жгутика определяет характерную траекторию движения сперматозоида, что связано с его локализацией и степенью капацитации [10]. Известно, что для успешного оплодотворения эта высокоспециализированная клетка быстро реагирует на изменения среды, обладает хемо-, термо- и реотаксисом [11]. На последнем этапе пути химический сигнал вокруг яйцеклетки усиливает движение сперматозоида, приводя его в состояние гиперактивации, что является необходимым условием для проникновения мужской гаметы в ооцит [12].

Достижение ооцита сперматозоидом определяется системой регуляции, обеспечивающей направление и адекватный паттерн подвижности, а также успешным снабжением клетки энергией. Регуляция траектории и подвижности происходит за счёт многокомпонентных

процессов, обзорно рассмотренных, например, в статье Vyklicka et al. [13]. Интересно, что даже внутри класса млекопитающих сигнальные пути, регулирующие подвижность, значительно отличаются [14]. Но среди универсальных регуляторных событий можно отметить Ca^{2+} -сигнал и сигнальные пути, ассоциированные с cAMP-зависимой протеинкиназой A [15]. В общем виде регуляция биения жгутика осуществляется передачей внешнего сигнала через элементы плазматической мембраны, такие, например, как ионные каналы CatSper или TRPV4, к регуляторным белковым комплексам цитоскелета. Как полагают, управление размером и формой изгиба жгутика определяется комплексом центральных пар микротрубочек и радиальных спиц его структурной основы — аксонемы, в то время как колебательное движение осуществляется за счёт периферических дулетов микротрубочек [16].

Что касается энергетического метаболизма сперматозоида, то изгибание жгутика обеспечивается фосфорилированием внешних динеиновых ручек дулетов микротрубочек, что сопровождается гидролизом АТФ. Это приводит к скольжению микротрубочек аксонемы и инициирует биение. Гликолиз, пентозофосфатный путь и окислительное фосфорилирование могут отвечать за накопление АТФ в сперматозоиде на разных этапах [17]. Митохондрии, в которых происходит окислительное фосфорилирование, находятся исключительно в среднем отделе жгутика, и не совсем ясно, как осуществляется доставка АТФ на всём его протяжении. На сегодняшний день полагают, что для млекопитающих АТФ, обеспечивающий биение жгутика, образуется преимущественно в ходе гликолиза [18]. Некоторые белки гликолиза входят в состав фиброзного слоя — особой структуры цитоскелета жгутика, которая позволяет вырабатывать АТФ непосредственно в основном отделе жгутика [19]. Речь идёт о спермоспецифических изоформах гексокиназы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфофруктокиназы и лактатдегидрогеназы [20], некоторые из которых обладают повышенной стабильностью в сравнении с соматическими паралогами [21]. Стоит отметить, что описаны также и факты против определяющей роли гликолиза в подвижности сперматозоидов — так, сперматозоиды многих видов могут оставаться подвижными в течение длительного периода времени в среде без субстратов гликолиза [22]. С учётом того, что на разных этапах источник АТФ может быть разным, вопрос вклада окислительного фосфорилирования и гликолиза в течение

жизненного цикла сперматозоида остаётся открытым.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОТЛИЧИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- ИЛИ Y-ХРОМОСОМУ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ПОДВИЖНОСТЬЮ

При наличии на пути сперматозоидов к ооциту большого количества потенциально селективирующих этапов первичное соотношение полов для быков статистически не отличается от соотношения 1 : 1 [23, 24]. Как показывают полевые исследования, вторичное соотношение полов также даёт близкую к равной вероятность рождения самцов и самок для основных сельскохозяйственных животных [25]. Примечательно, что при этом для сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, показаны биохимические отличия, потенциально ассоциированные с подвижностью. Учитывая схему сперматогенеза, эти отличия могут закладываться, начиная с этапа мейотического деления сперматоцитов, на котором появляются гаплоидные сперматиды [26]. Во время мейоза происходит транскрипционный сайленсинг половых хромосом, но после деления клетки их транскрипционная активность частично восстанавливается [27]. Несмотря на то, что сперматиды вплоть до завершения спермиогенеза созревают в составе синцитиев, где цитоплазма клеток активно обменивается белками и РНК в составе хроматидных тел [28], для большого класса генов млекопитающих их мРНК накапливается преимущественно в клетках, в которых присутствует соответствующий аллель, и это касается в том числе генов половых хромосом [29]. Другими словами, разница в содержании ДНК для X- и Y-популяции сперматозоидов может приводить к фенотипическим отличиям этих групп. Информация об исследованиях таких отличий на уровне транскриптома и протеома для бычьей спермы собрана в табл. 1.

Разница между сперматозоидами, несущими X- или Y-хромосому, подтверждается в ряде исследований, в которых проводили дифференциальный анализ таких клеток, разделённых с помощью проточной цитофлуориметрии или методом секвенирования РНК одиночных клеток. Так, для сперматид было найдено 150 генов, транскрипция которых была ассоциирована с определённой половой хромосомой в клетке [29]. Среди них интересно отметить гены, кодирующие гомолог белка, взаимодействующего с фиброзным слоем (Fsp21),

Таблица 1. Биохимические различия между популяциями бычьих сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосому

Основные методы исследования	Обнаруженные различия	Ссылка
Секвенирование РНК одиночных клеток	повышенное накопление мРНК 104 генов X-хромосомы и 46 генов Y-хромосомы в сперматиде с соответствующей половой хромосомой	[29]
Вычитающая подавляющая гибридизация, кДНК-чип, валидация результатов количественной ПЦР	31 ген с дифференциальной транскрипцией	[30]
Секвенирование РНК, валидация результатов количественной ПЦР с обратной транскрипцией	3 и 9 микроРНК накапливаются в больших количествах в X- и Y-сперматозоидах соответственно	[31]
Двумерный гель-электрофорез, масс-спектрометрия, валидация вестерн-блот анализом	42 белка имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[32]
Сверхэффективная жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	17 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[33]
Масс-спектрометрия	8 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[34]
Иммунологический анализ кроличьей сыворотки против сексированной спермы	получены поликлональные антитела, обладающие специфичностью только к X- или Y-сперматозоидам, проведена иммунопреципитация антигена	[35]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией, валидация вестерн-блот анализом	270 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[36]
Биоинформатический анализ транскрипции половых хромосом, иммуноцитохимия	Toll-подобные рецепторы 7/8 представлены в больших количествах на X-сперматозоидах	[37]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	13 белков имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[38]
Иммунологический анализ мышиной сыворотки против сексированной спермы	получены моноклональные антитела, обладающие специфичностью только к Y-сперматозоидам	[39]
Иммунологический анализ козьей сыворотки против сексированной спермы	получены поликлональные антитела, обладающие специфичностью только к Y-сперматозоидам с белком SRY в качестве антигена	[40]
Жидкостная хроматография, совмещённая с масс-спектрометрией	54 белка имеют разную представленность в X- и Y-сперматозоидах	[41]

одну из изоформ киназы пируватдегидрогеназы (Pdk3) и 6-фосфофрукто-2-киназы (Pfkfb1), транскрипция которых ассоциирована с X-хромосомой и которые потенциально могут быть связаны с подвижностью.

В работе, в которой проводилось сравнение транскрипционных профилей бычьих сперматозоидов, разделённых по полу, методом вычитающей гибридизации были идентифицированы гены с дифференциальной экспрессией в Y- или X-обогащённых популяциях

спермы [30]. В частности, X-сперматозоиды несли больше мРНК, кодирующих митохондриальные белки CYTB и ISCU. CYTB – это субъединица комплекса bc1, а ISCU – белок, взаимодействующий с Fe-S-кластерами, оба играют ключевую роль в окислительном фосфорилировании. Разница в экспрессии митохондриальных генов может быть ассоциирована с изменениями в характере подвижности, как было показано ранее на других экспериментальных моделях. Так, подвижность спер-

матозоида хряка менялась с прогрессивной на непрогрессивную при инкубации с D-хлорамфениколом, который ингибирует трансляцию митохондриальных генов [42]. Интересно, что в упомянутой работе среди РНК, для которых была показана разная представленность в Y- и X-сперматозоидах, найдено значительное число некодирующих РНК [30]. Важность некодирующих РНК в отличиях исследуемых групп клеток была подтверждена и в других исследованиях. Были идентифицированы 3 микроРНК, которые накапливаются преимущественно в мужских гаметах с X-хромосомой, а также 9 микроРНК, специфичных для мужских гамет с Y-хромосомой [31]. Интересно, что некоторые из таких микроРНК были среди наиболее представленных при сравнении некодирующего транскрипта высоко- и малоподвижных популяций бычьей спермы [43]. Приведённые выше факты говорят о потенциальном участии этого типа РНК в регуляции подвижности мужских половых клеток.

С тех пор, как была показана транскрипция генов половых хромосом в сперматиде, долгое время общепринятым считалось, что межклеточные мостики позволяют выравнивать количество синтезируемых белков в гаметах, несущих X- или Y-хромосому [44]. Однако с распространением FACS-технологии разделения спермы были получены доказательства существования белков, накапливаемых только в одном типе сексированных сперматозоидов. Целая группа работ представляет сравнение бычьих сперматозоидов, несущих X- или Y-хромосому, на уровне протеома.

С помощью двумерного гель-электрофореза были найдены 42 белка с дифференциальной экспрессией в рассматриваемых группах сперматозоидов [32]. Среди находок было много белков энергетического метаболизма, таких как субъединица комплекса bc₁, субъединица β АТФ-синтазы, субъединица α изоцитратдегидрогеназы и другие. Также было обнаружено неравное количество белков цитоскелета; так, в сперматозоидах, несущих X-хромосому, было больше α- и β-тубулина. Сравнительный анализ сексированных фракций спермы быка методом сверхэффективной жидкостной хроматографии, совмещённой с масс-спектрометрией, также выявил дифференциальное накопление белков цитоскелета и ферментов гликолиза [33]. В частности, в X-сперматозоидах детектировали больше β-тубулина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, для которой ранее была показана связь с подвижностью [45]. В ещё одном исследовании протеома было найдено 8 белков с не-

равным распределением в X- и Y-обогащённой сперме [34]. Примечательно, что митохондриальные белки, такие как цитохром c-оксидаза и ацетил-СоА-карбоксилаза, также детектируются в большем количестве в мужских гаметах с X-хромосомой.

Сравнение протеомов X- и Y-сперматозоидов быков с помощью жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией показало, что 27 белков накапливались в большем количестве в X-сперме, 3 белка — в Y-сперме, в то время как 24 белка были обнаружены только в одном типе сперматозоидов [41]. Среди потенциально ассоциированных с подвижностью белков можно отметить фосфоглицератмутаза и кальмодулин, которые детектируются только в гаметах с X-хромосомой. Для другого дифференциально-экспрессируемого белка из данного списка — ARMC12 — также была показана связь с активностью биения жгутика [46].

Хотя некоторые из упомянутых омиксных данных требуют верификации, можно отметить значительные различия между X- и Y-сперматозоидами, которые связаны с организацией цитоскелета и энергетическим метаболизмом клеток, что, в свою очередь, может быть связано с особенностями подвижности.

Исторически большие надежды возлагались на иммунологические способы сексирования сперматозоидов. Методы, основанные на свойствах H-Y-антигена, были одними из первых попыток разделить по полу сперму млекопитающих, однако не доказали своей эффективности [47]. Недавно появился ряд работ, продолжающих это направление, которые посвящены поиску отличий в белках плазматической мембраны для X- и Y-сперматозоидов. Так, при сравнении сексированных фракций спермы быков восемь белков были обнаружены в больших количествах в сперматозоидах, несущих X-хромосому, и 23 белка — в клетках, несущих Y-хромосому [36]. Интересно, что среди белков, детектируемых только в одной популяции сперматозоидов, оказалась группа белков, относящихся к регуляции сигнального пути T-клеточных рецепторов. Это соотносится с исследованиями, в которых было показано, что Toll-подобные рецепторы 7/8 (TLR7/8) обнаруживаются преимущественно на X-сперматозоидах [37]. Более того, было показано, что активация этого рецептора приводит к классическому сигнальному каскаду — в клетке растёт число фосфорилированных форм киназы гликогенсинтазы 3 α/β и транскрипционного фактора NF-κB. Это ведёт к снижению митохондриального дыхания, количества АТФ и уменьшению подвижности сперматозоидов [48].

Ещё одно исследование разницы в составе белков плазматической мембраны сперматозоидов с разными половыми хромосомами выявило два белка, менее представленных в Y-сперме, а также 4 и 7 белков, детектируемых в клетках только с X- или только с Y-хромосомой соответственно [38]. Среди белков, специфичных для X-сперматозоидов, можно отметить кератин двух типов: кератин 19 (тип I) и кератин 5 (тип II). Кератины синтезируются в течение сперматогенеза и обнаруживаются в составе фиброзного слоя и наружных плотных фибрилл жгутика сперматозоида. На уровне белка в сперматозоидах быка ранее был обнаружен кератин 19 (тип I) [49], также в бычьих сперматозоидах показано наличие мРНК кератина 8 (тип II) [50]. О функции и регуляции этих белков известно немного. Что касается связи этих белков с подвижностью, то показано, что кератин 1 (тип II) накапливается в больших количествах в жгутиках сперматозоидов мужчин с астенозооспермией [51]. Также известно, что для мышей мутация гена, кодирующего кератин 9 (тип I), приводит к формированию сперматозоидов с дефектными жгутиками [52].

Для поиска отличий в белковом составе сперматозоидов с разными половыми хромосомами применялись также иммунологические подходы. Так, была получена сыворотка кролика с антителами против сексированной бычьей спермы двух типов. Результаты иммунофлуоресцентной окраски сперматозоидов с помощью полученных антител и проточной цитофлуориметрии подтвердили их специфичность по отношению к клеткам с определённым типом половой хромосомы [35]. Похожая стратегия поиска привела к изоляции антитела к Y-сперматозоиду из мышинной сыворотки [39]. Интересно, что полученные антитела удалось использовать для сексирования бычьей спермы с помощью иммуномагнитной сепарации [53]. Также иммунологический подход позволил идентифицировать белок SRV в качестве специфичного маркера Y-несущих сперматозоидов [40].

Упомянутые в данном разделе отличия в протеоме сперматозоидов, несущих Y- или X-хромосому быков, найдены с использованием сортированной спермы. При этом стоит учитывать, что ряд изменений в белковом составе мог произойти вследствие самой проточной цитофлуориметрической сортировки. Эти изменения могут быть результатом необходимых для разделения процедур, таких как окраска ядер интеркалирующим красителем Хёхст 33342, воздействие лазера, смена буфера, или результатом отбора популяции сперматозоидов определённого состояния, например,

определённой стадии капацитации [54]. Показано, что сексированная указанным способом сперма имеет отличный по сравнению с несортированным образцом состав белков энергетического метаболизма, структурных белков жгутика, белков, вовлечённых в капацитацию и акросомную реакцию [55]. То есть некоторые из находок, описанных в таблице 1, могут относиться не к природе X- или Y-сперматозоидов, а, например, к артефактным особенностям сильно или слабо флуоресцирующей при окраске Хёхст 33342 популяции клеток.

РАЗМЕРЫ И КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ СПЕРМАТОЗОИДОВ, НЕСУЩИХ X- И Y-ХРОМОСОМЫ

Цитофлуориметрический метод сортировки спермы основан на том, что X-сперматозоиды быков содержат в среднем на 3,9% больше ДНК, чем клетки, несущие Y-хромосому [56]. При этом информация о разнице в размере головки X- и Y-сперматозоида противоречива. Согласно одним исследованиям, объём головки X-сперматозоида быков также больше на 3,5–4% [57, 58], другие работы такой разницы не подтверждают [59]. Исследование с помощью атомно-силовой микроскопии, позволяющей получить информацию о трёхмерной структуре клеток и их поверхности по 23 параметрам, не выявило значимых отличий в размере сперматозоидов быков [60]. Похожая ситуация с вопросом о сравнении размеров сперматозоидов, несущих разные половые хромосомы, складывалась и для человека — при том, что долгое время считалось, что разница существует [61], последние работы на основе данных фазово-контрастной микроскопии этого не подтверждают [62].

В любом случае доказанная разница в содержании ДНК заставляет исследователей искать и другие особенности этих клеток, в том числе в характеристиках подвижности. Значимые отличия показаны только для их среднего углового перемещения и прямолинейности пути. Так, было показано, что траектория движения X-несущих сперматозоидов более линейная по сравнению с Y-несущими [63]. При исследовании подвижности сортированных сперматозоидов быков в объёме Y-сперматозоиды имели большую склонность к спиральным траекториям [64].

Общее количество прогрессивно-подвижных клеток в замороженной-оттаянной сортированной сперме быков, обогащённой Y- или X-несущими клетками, статистически неот-

лично [65], однако отобранная на сортере популяция Y-сперматозоидов дольше сохраняет подвижность в экспериментах *in vitro* [66], что может быть связано с упомянутыми ранее особенностями энергетического метаболизма. Интересно, что для интактной спермы соотношение сперматозоидов, несущих X- и Y-хромосому, не меняется в течение продолжительной инкубации при физиологических значениях pH, что было показано для хряка и для человека [67]. Это, как было отмечено ранее, говорит о том, что не все свойства отобранных с помощью проточной цитофлуорометрии популяций присущи всем сперматозоидам с X- или Y-хромосомой. Важно отметить, что в тестах на подвижность с хемотаксисом, индуцированным прогестероном, сортированная и несортированная популяция бычьих сперматозоидов ведёт себя одинаково [68].

Методы, основанные на подвижности сперматозоидов, первоначально использовались для очистки и селекции активно-подвижных кле-

ток. После публикации об обогащении человеческой спермы Y-несущими гаметами при центрифугировании в градиенте альбумина [69], результаты которой были оспорены позднее, началась эра исследований, посвящённых разработке протокола, позволяющего отделить X- и Y-сперматозоиды, используя особенности их подвижности. В следующем разделе приведены результаты экспериментов, опубликованные не более чем в последние 20 лет, и касающиеся указанных методов сексирования семени быков.

МЕТОДЫ СЕКСИРОВАНИЯ СПЕРМЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОДВИЖНОСТИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Классические методы, позволяющие разделить клетки с разной подвижностью, сводятся к разделению в градиенте плотности и разделению методом всплытия «swim-up». Существуют и другие методы, основанные на подвижности,

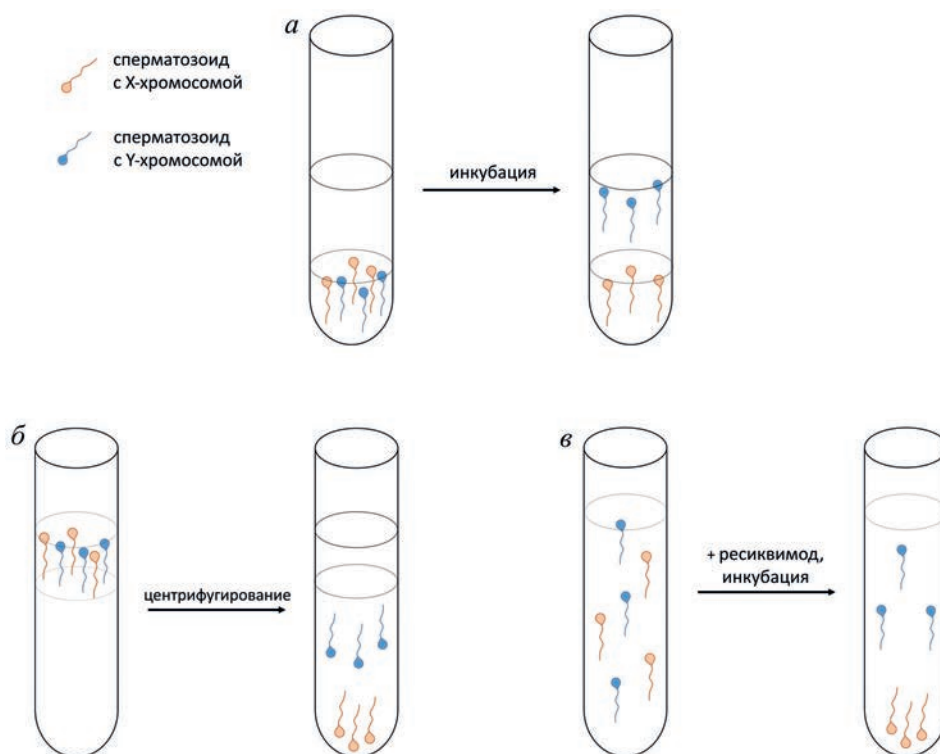


Схема основных методов разделения спермы на фракции, обогащённые сперматозоидами с X- или Y-хромосомой, основанные на особенностях подвижности этих клеток. *а* – Метод всплытия или swim-up метод. На сперму наслаивается специальная среда, в которую в течение инкубации выходят преимущественно Y-сперматозоиды. Большая часть X-сперматозоидов остаётся в нижнем слое. Метод может быть дополнен центрифугированием на начальном этапе для осаждения клеток на дно пробирки. *б* – Метод разделения в градиенте плотности. Сперма наслаивается на буфер с градиентом концентрации коллоидных частиц (например, Percoll) с повышением плотности ко дну пробирки. Центрифугирование приводит к миграции клеток с X-хромосомой в нижние слои, в то время как Y-сперматозоиды концентрируются в средних слоях. Метод может быть модифицирован повторным центрифугированием собранных фракций. *в* – Метод специфического подавления подвижности сперматозоидов с помощью активации рецептора TLR8. В буфер со спермой добавляют ресиквимод, активирующий TLR8 на поверхности X-сперматозоидов, что приводит к их обездвиживанию; после инкубации верхние слои обогащены Y-сперматозоидами. И нижняя, и верхняя фракция после отмывки пригодны к оплодотворению *in vitro*. Метод может быть дополнен swim-up процедурой после добавления ресиквимода

Таблица 2. Исследования, в ходе которых были описаны методы разделения спермы на фракции, обогащённые сперматозоидами с X- или Y-хромосомой, основанные на особенностях подвижности

Метод обогащения спермы сперматозоидами с X- или Y-хромосомой	Метод определения соотношения X : Y после процедуры обогащения	Соотношение X : Y после обогащения (максимальный результат)	Ссылка
Swim-up метод в колонках длиной 30 см	флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH) сперматозоидов и эмбрионов	38 : 62	[74]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	пол потомства после искусственного осеменения и переноса эмбриона	71,4 : 28,6	[75]
Двойное центрифугирование в градиенте плотности Percoll	пол потомства после искусственного осеменения	66,7 : 33,3	[76]
Комбинация swim-up метода и центрифугирования в градиенте плотности Percoll	ПЦР эмбрионов	60,6 : 39,4	[77]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	FISH сперматозоидов	55,7 : 44,3	[78]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	ПЦР эмбрионов	63 : 37	[79]
Swim-up метод	ПЦР эмбрионов	41,6 : 58,4	[80]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll		63,4 : 36,6	
Двойной swim-up метод с добавлением гепарина	ПЦР сперматозоидов	67 : 33	[81]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll	ПЦР сперматозоидов и эмбрионов	62 : 38	[82]
Swim-up метод в колонках длиной 30 см	ПЦР сперматозоидов	Есть смещение в сравнении с контролем	[83]
Swim-up метод	пол потомства после искусственного осеменения	23 из 23 самцы	[84]
Центрифугирование в градиенте плотности Percoll		4 : 96	
Модифицированный swim-up метод (добавление ресиквимода)	ПЦР эмбрионов	7,1 : 92,9	[85]

среди которых можно выделить микрофлюидные технологии [70] и метод селекции на колонках из стекловолокна [71], стеклянных гранул или декстранового геля.

Разделение при центрифугировании в градиенте плотности осуществляется наслаиванием спермы на буфер с градиентом концентрации коллоидных частиц (например, Percoll) или какого-либо инертного растворимого вещества (например, сахарозы) в центрифужной пробирке (рис. 1, б). При центрифугировании лейкоциты, макромолекулы семенной жидко-

сти и нежелательные клеточные включения остаются в верхних слоях, а зрелые сперматозоиды с нормальной морфологией проходят в более плотные слои, причём более подвижные сперматозоиды способны ориентировать головку вдоль действия центрифужной силы и достигать дна пробирки. Существуют модификации метода, позволяющие масштабировать данную процедуру [72].

Метод всплытия или swim-up метод не обязательно включает в себя этап центрифугирования, что, как полагают, позволяет

избежать дополнительного повреждения клеток. Процедура осуществляется наслаиванием на сперму специальной среды, в которую в течение определённого времени (до 60 мин) выходят морфологически нормальные активно-подвижные сперматозоиды (рис. 1, а). Нежелательные клеточные включения в данном случае остаются в нижнем слое пробирки. Оптимизация времени процедуры и масштабирование метода возможно с помощью специальных устройств, например, описанных в работе Meitei et al. [73]. Возможны вариации метода, когда осадок сперматозоидов, полученный после центрифугирования в градиенте плотности, инкубируют в среде для всплытия, что позволяет увеличить чистоту и качество отобранной популяции.

В табл. 2 приведены результаты экспериментов, в которых указанными методами предприняты попытки обогатить сперму быков X- или Y-сперматозоидами. В таблице отдельно отмечены методы оценки результата отбора.

Центрифугирование в градиенте плотности увеличивает процент активно-подвижных сперматозоидов в образце, а также позволяет отобрать морфологически нормальные сперматозоиды, не повреждая геномную ДНК. Swim-up метод даёт более низкий выход, но считается более мягким методом обогащения. Указанные факторы делают эти методы привлекательными для сексирования, однако маленький размер выборки в приведённых в табл. 2 статьях, а также противоречивость некоторых данных в настоящий момент позволяет давать лишь очень осторожный прогноз для применения данных методов. Стоит также обратить внимание, что, помимо невысоких уровней обогащения образцов сперматозоидами, несущими определённую половую хромосому, некоторые авторы отмечают, что результаты обогащения сильно зависят от исходного образца.

Революционной для данной области выглядит технология, использующая разницу в количестве молекул рецептора TLR8 на поверхности X- или Y-сперматозоидов [85]. Было показано, что при добавлении его лиганда ресиквируется клетка, несущие X-хромосому, теряют подвижность, так как имеют значительно больше таких рецепторов на поверхности. Это позволяет отбирать обогащённую Y-сперматозоидами фракцию и после отмывки от лиганда проводить оплодотворение полученным образцом (рис. 1, в). Подвижность оставшейся в пробирке фракции, обогащённой X-сперматозоидами, также позволяет использовать

её для оплодотворения *in vitro*. Помимо мышей и быков, такая процедура описана для спермы козла, что может говорить об универсальном механизме регуляции подвижности через TLR8 [86]. Наличие переключателя, специфически снижающего активность жгутика сперматозоида с определённой половой хромосомой, может подарить второе дыхание классическим методам отбора, основанным на подвижности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За долгую историю разработки методов, основанных на разделении сперматозоидов по подвижности, так и не удалось получить надёжный протокол, дающий значительное обогащение образца клетками с определённой половой хромосомой. Это означает, что использование сексированной спермы в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий человека вряд ли возможно. При этом в животноводстве применение сексированной спермы также оправдано лишь при достижении определённого уровня обогащения.

Новые данные по дифференциальной протеомике X- и Y-сперматозоидов позволяют прогнозировать, что через избирательное влияние на подвижность этих клеток можно добиться значительного изменения соотношения X- и Y-сперматозоидов в процессированном образце, что может внести свой вклад в эффективность животноводства. Нельзя исключать, что успехи в разделении X- и Y-сперматозоидов позволят применять этот подход и в медицине как альтернативу преимплантационному тестированию в тех случаях, когда необходимо избежать генетических заболеваний, сцепленных с полом.

Вклад авторов. Д.В. Поздышев, В.И. Муронец — концепция и руководство работой; Д.В. Поздышев, В.И. Муронец — написание текста; Н.А. Комбарова — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-80009).

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. Morrell, J. M. (2011) *Artificial Insemination: Current and Future Trends* (Manafi, M., ed) InTechOpen, London, doi: 10.5772/17943.
2. Johnson, L. A., Welch, G. R., and Rens, W. (1999) The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI, *J. Anim. Sci.*, **77**, 213-220, doi: 10.2527/1999.77suppl_2213x.
3. Reese, S., Pirez, M. C., Steele, H., and Kölle, S. (2021) The reproductive success of bovine sperm after sex-sorting: a meta-analysis, *Sci. Rep.*, **11**, 17366, doi: 10.1038/s41598-021-96834-2.
4. Seidel, G. E., Schenk, J. L., Herickhoff, L. A., Doyle, S. P., Brink, Z., Green, R. D., and Cran, D. G. (1999) Insemination of heifers with sexed sperm, *Theriogenology*, **52**, 1407-1420, doi: 10.1016/s0093-691x(99)00226-5.
5. Vishwanath, R., and Moreno, J. F. (2018) Review: Semen sexing - current state of the art with emphasis on bovine species, *Animal*, **12**, s85-s96, doi: 10.1017/S1751731118000496.
6. Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., and Sun, F. (2019) Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, **17**, 66, doi: 10.1186/s12958-019-0510-y.
7. Gervasi, M. G., and Visconti, P. E. (2017) Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation, *Andrology*, **5**, 204-218, doi: 10.1111/andr.12320.
8. Katz, D. F., and Vanagimachi, R. (1980) Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct, *Biol. Reprod.*, **22**, 759-764, doi: 10.1095/biolreprod22.4.759.
9. Achikanu, C., Correia, J., Guidobaldi, H. A., Giojalas, L. C., Barratt, C. L. R., Da Silva, S. M., and Publicover, S. (2019) Continuous behavioural "switching" in human spermatozoa and its regulation by Ca^{2+} -mobilising stimuli, *Mol. Hum. Reprod.*, **25**, 423-432, doi: 10.1093/molehr/gaz034.
10. Fraser, L. R. (1977) Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation, *J. Exp. Zool.*, **202**, 439-444, doi: 10.1002/jez.1402020314.
11. Eisenbach, M., and Giojalas, L. C. (2006) Sperm guidance in mammals - an unpaved road to the egg, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 276-285, doi: 10.1038/nrm1893.
12. Morisawa, M., and Yoshida, M. (2005) Activation of motility and chemotaxis in the spermatozoa: from invertebrates to humans, *Reprod. Med. Biol.*, **4**, 101-114, doi: 10.1111/j.1447-0578.2005.00099.x.
13. Vyklicka, L., and Lishko, P. V. (2020) Dissecting the signaling pathways involved in the function of sperm flagellum, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **63**, 154-161, doi: 10.1016/j.ceb.2020.01.015.
14. Kaupp, U. B., and Strünker, T. (2017) Signaling in sperm: more different than similar, *Trends Cell Biol.*, **27**, 101-109, doi: 10.1016/j.tcb.2016.10.002.
15. Marquez, B., and Suarez, S. S. (2004) Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation, *Biol. Reprod.*, **70**, 1626-1633, doi: 10.1095/biolreprod.103.026476.
16. Rudneva, S. A., and Chernykh, V. B. (2018) A mechanism of sperm cilia beating, *Androl. Genital Surg.*, **19**, 15-26, doi: 10.17650/2070-9781-2018-19-3-15-26.
17. Miki, K. (2007) Energy metabolism and sperm function, *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, **65**, 309-325.
18. Mukai, C., and Okuno, M. (2004) Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement, *Biol. Reprod.*, **71**, 540-547, doi: 10.1095/biolreprod.103.026054.
19. Muronetz, V. I., Kuravsky, M. L., Barinova, K. V., and Schmalhausen, E. V. (2015) Sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - an evolutionary acquisition of mammals, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1672-1689, doi: 10.1134/S0006297915130040.
20. Du Plessis, S. S., Agarwal, A., Mohanty, G., and van der Linde, M. (2015) Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian J. Androl.*, **17**, 230-235, doi: 10.4103/1008-682X.135123.
21. Elkina, Y. L., Kuravsky, M. L., El'darov, M. A., Stogov, S. V., Muronetz, V. I., and Schmalhausen, E. V. (2010) Recombinant human sperm-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structural basis for enhanced stability, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 2207-2212, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.09.002.
22. Ford, W. C. (2006) Glycolysis and sperm motility: does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update*, **12**, 269-274, doi: 10.1093/humupd/dmi053.
23. King, W. A., Yadav, B. R., Xu, K. P., Picard, L., Sirard, M. A., Verini Supplizi, A., et al. (1991) The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and in vitro, *Theriogenology*, **36**, 779-788, doi: 10.1016/0093-691x(91)90343-c.
24. Machado, G. M., Ferreira, A. R., Guardieiro, M. M., Bastos, M. R., Carvalho, J. O., Lucci, C. M., et al. (2013) Morphology, sex ratio and gene expression of Day 14 in vivo and in vitro bovine embryos, *Reprod. Fertil. Dev.*, **25**, 600, doi: 10.1071/RD11282.
25. Abecia, J.-A., Arrébola, F., and Palacios, C. (2017) Offspring sex ratio in sheep, cattle, goats and pigs: influence of season and lunar phase at conception, *Biol. Rhythm Res.*, **48**, 417-424, doi: 10.1080/09291016.2016.1268325.
26. Ellis, P. J. I., Yu, Y., and Zhang, S. (2011) Transcriptional dynamics of the sex chromosomes and the search for offspring sex-specific antigens in sperm, *Reproduction*, **142**, 609-619, doi: 10.1530/REP-11-0228.

27. Turner, J. M. A., Mahadevaiah, S. K., Ellis, P. J. I., Mitchell, M. J., and Burgoyne, P. S. (2006) Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids, *Dev. Cell*, **10**, 521-529, doi: 10.1016/j.devcel.2006.02.009.
28. Ventelä, S., Toppari, J., and Parvinen, M. (2003) Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing, *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2768-2780, doi: 10.1091/mbc.e02-10-0647.
29. Bhutani, K., Stansifer, K., Tica, S., Bojic, L., Villani, A.-C., Slisz, J., et al. (2021) Widespread haploid-biased gene expression enables sperm-level natural selection, *Science*, **371**, eabb1723, doi: 10.1126/science.abb1723.
30. Chen, X., Yue, Y., He, Y., Zhu, H., Hao, H., Zhao, X., et al. (2014) Identification and characterization of genes differentially expressed in X and Y sperm using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray, *Mol. Reprod. Dev.*, **81**, 908-917, doi: 10.1002/mrd.22386.
31. Zhou, H., Liu, J., Sun, W., Ding, R., Li, X., Shanguan, A., et al. (2020) Differences in small noncoding RNAs profile between bull X and Y sperm, *PeerJ*, **8**, e9822, doi: 10.7717/peerj.9822.
32. Chen, X., Zhu, H., Wu, C., Han, W., Hao, H., Zhao, X., et al. (2012) Identification of differentially expressed proteins between bull X and Y spermatozoa, *J. Proteomics*, **77**, 59-67, doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.004.
33. De Canio, M., Soggiu, A., Piras, C., Bonizzi, L., Galli, A., Urbani, A., et al. (2014) Differential protein profile in sexed bovine semen: shotgun proteomics investigation, *Mol. Biosyst.*, **10**, 1264-1271, doi: 10.1039/c3mb70306a.
34. Scott, C., de Souza, F. F., Aristizabal, V. H. V., Hethrington, L., Krisp, C., Molloy, M., et al. (2018) Proteomic profile of sex-sorted bull sperm evaluated by SWATH-MS analysis, *Anim. Reprod. Sci.*, **198**, 121-128, doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.09.010.
35. Sang, L., Yang, W. C., Han, L., Liang, A. X., Hua, G. H., Xiong, J. J., et al. (2011) An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm, *J. Dairy Sci.*, **94**, 2060-2070, doi: 10.3168/jds.2010-3350.
36. Shen, D., Zhou, C., Cao, M., Cai, W., Yin, H., Jiang, L., et al. (2021) Differential membrane protein profile in bovine X- and Y-Sperm, *J. Proteome Res.*, **20**, 3031-3042, doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00358.
37. Umehara, T., Tsujita, N., and Shimada, M. (2019) Activation of Toll-like receptor 7/8 encoded by the X chromosome alters sperm motility and provides a novel simple technology for sexing sperm, *PLoS Biol.*, **17**, e3000398, doi: 10.1371/journal.pbio.3000398.
38. Laxmivandana, R., Patole, C., Sharma, T. R., Sharma, K. K., and Naskar, S. (2021) Differential proteins associated with plasma membrane in X- and/or Y-chromosome bearing spermatozoa in indicus cattle, *Reprod. Dom. Anim.*, **56**, 928-935, doi: 10.1111/rda.13936.
39. Thaworn, W., Hongsibsong, S., Thongkham, M., Mekchay, S., Pattanawong, W., and Srirangarm, K. (2022) Production of single-chain fragment variable (scFv) antibodies specific to plasma membrane epitopes on bull Y-bearing sperm, *Anim. Biotechnol.*, **33**, 508-518, doi: 10.1080/10495398.2020.1811294.
40. Soleymani, B., Parvaneh, S., and Mostafaie, A. (2019) Goat polyclonal antibody against the sex determining region Y to separate X- and Y-chromosome bearing spermatozoa, *Rep. Biochem. Mol. Biol.*, **8**, 326-334.
41. Sharma, V., Verma, A. K., Sharma, P., Pandey, D., and Sharma, M. (2022) Differential proteomic profile of X- and Y-sorted Sahiwal bull semen, *Res. Vet. Sci.*, **144**, 181-189, doi: 10.1016/j.rvsc.2021.11.013.
42. Zhu, Z., Umehara, T., Okazaki, T., Goto, M., Fujita, Y., Hoque, S. A. M., et al. (2019) Gene Expression and protein synthesis in mitochondria enhance the duration of high-speed linear motility in boar sperm, *Front. Physiol.*, **10**, 252, doi: 10.3389/fphys.2019.00252.
43. Capra, E., Turri, F., Lazzari, B., Cremonesi, P., Gliozzi, T. M., Fojadelli, I., et al. (2017) Small RNA sequencing of cryopreserved semen from single bull revealed altered miRNAs and piRNAs expression between High- and Low-motile sperm populations, *BMC Genomics*, **18**, 14, doi: 10.1186/s12864-016-3394-7.
44. Hendriksen, P. J. M. (1999) Do X and Y spermatozoa differ in proteins? *Theriogenology*, **52**, 1295-1307, doi: 10.1016/S0093-691X(99)00218-6.
45. Elkina, Y. L., Atroshchenko, M. M., Bragina, E. E., Muronetz, V. I., and Schmalhausen, E. V. (2011) Oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases sperm motility, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 268-272, doi: 10.1134/s0006297911020143.
46. Shimada, K., Park, S., Miyata, H., Yu, Z., Morohoshi, A., Oura, S., et al. (2021) ARMC12 regulates spatiotemporal mitochondrial dynamics during spermiogenesis and is required for male fertility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2018355118, doi: 10.1073/pnas.2018355118.
47. Hoppe, P. C., and Koo, G. C. (1984) Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio of eggs fertilized *in vitro*, *J. Reprod. Immunol.*, **6**, 1-9, doi: 10.1016/0165-0378(84)90036-6.
48. Ren, F., Xi, H., Ren, Y., Li, Y., Wen, F., Xian, M., et al. (2021) TLR7/8 signalling affects X-sperm motility via the GSK3 α/β -hexokinase pathway for the efficient production of sexed dairy goat embryos, *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **12**, 89, doi: 10.1186/s40104-021-00613-y.
49. Hinsch, E., Boehm, J. G., Groeger, S., Mueller-Schloesser, F., and Hinsch, K. D. (2003) Identification

- of cytokeratins in bovine sperm outer dense fibre fractions, *Reprod. Domest. Anim.*, **38**, 155-160, doi: 10.1046/j.1439-0531.2003.00408.x.
50. Feugang, J. M., Rodriguez-Osorio, N., Kaya, A., Wang, H., Page, G., Ostermeier, G. C., et al. (2010) Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility, *Reprod. Biomed. Online*, **21**, 312-324, doi: 10.1016/j.rbmo.2010.06.022.
 51. Hashemitabar, M., Sabbagh, S., Orazizadeh, M., Ghadiri, A., and Bahmanzadeh, M. (2015) A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia, *J. Assist. Reprod. Genet.*, **32**, 853-863, doi: 10.1007/s10815-015-0465-7.
 52. Rivkin, E., Eddy, E. M., Willis, W. D., Goulding, E. H., Suganuma, R., Yanagimachi, R., et al. (2005) Sperm tail abnormalities in mutant mice with neor gene insertion into an intron of the keratin 9 gene, *Mol. Reprod. Dev.*, **72**, 259-271, doi: 10.1002/mrd.20335.
 53. Sringarm, K., Thongkham, M., Mekchay, S., Lumsangkul, C., Thaworn, W., Pattanawong, W., et al. (2022) High-efficiency bovine sperm sexing used magnetic-activated cell sorting by coupling scFv antibodies specific to Y-chromosome-bearing sperm on magnetic microbeads, *Biology (Basel)*, **11**, 715, doi: 10.3390/biology11050715.
 54. Bucci, D., Galeati, G., Tamanini, C., Vallorani, C., Rodriguez-Gil, J. E., and Spinaci, M. (2012) Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa, *Theriogenology*, **77**, 1206-1216, doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.028.
 55. Mostek, A., Janta, A., and Ciereszko, A. (2020) Proteomic comparison of non-sexed and sexed (X-bearing) cryopreserved bull semen, *Anim. Reprod. Sci.*, **221**, 106552, doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106552.
 56. Garner, D. L., and Seidel Jr., G. E. (2003) Past, present and future perspectives on sexing sperm, *Can. J. Anim. Sci.*, **83**, 375-384, doi: 10.4141/A03-022.
 57. Van Munster, E. B., Stap, J., Hoebe, R. A., te Meerman, G. J., and Aten, J. A. (1999) Difference in volume of X- and Y-chromosome-bearing bovine sperm heads matches difference in DNA content, *Cytometry*, **35**, 125-128, doi: 10.1002/(sici)1097-0320(19990201)35:2<125::aid-cyto3>3.0.co;2-h.
 58. Santolaria, P., Paucillo, A., Silvestre, M. A., Vicente-Fiel, S., Villanova, L., Pinton, A., et al. (2016) Computer-assisted sperm morphometry fluorescence-based analysis has potential to determine progeny sex, *Asian J. Androl.*, **18**, 858-862, doi: 10.4103/1008-682X.187578.
 59. Révay, T., Nagy, S., Kovács, A., Edvi, M. E., Hidas, A., Rens, W., et al. (2004) Head area measurements of dead, live, X- and Y-bearing bovine spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.*, **16**, 681-687, doi: 10.1071/rd04013.
 60. Carvalho, J. O., Silva, L. P., Sartori, R., and Dode, M. A. N. (2013) Nanoscale differences in the shape and size of X and Y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy, *PLoS One*, **8**, e59387, doi: 10.1371/journal.pone.0059387.
 61. Cui, K. H., and Matthews, C. D. (1993) X larger than Y, *Nature*, **366**, 117-118, doi: 10.1038/366117b0.
 62. Zavaczki, Z., Celik-Ozenci, C., Ovari, L., Jakab, A., Sati, G. L., Ward, D. C., et al. (2006) Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry, *Fertil. Steril.*, **85**, 121-127, doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.07.1295.
 63. Penfold, L. M., Holt, C., Holt, W. V., Welch, G. R., Cran, D. G., and Johnson, L. A. (1998) Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting, *Mol. Reprod. Dev.*, **50**, 323-327, doi: 10.1002/(SICI)1098-7953(199807)50:3<323::AID-MRD8>3.0.CO;2-L.
 64. Daloglu, M. U., Lin, F., Chong, B., Chien, D., Veli, M., Luo, W., et al. (2018) 3D imaging of sex-sorted bovine spermatozoon locomotion, head spin and flagellum beating, *Sci. Rep.*, **8**, 15650, doi: 10.1038/s41598-018-34040-3.
 65. Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., and Dode, M. (2010) Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production, *Theriogenology*, **74**, 1521-1530, doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.06.030.
 66. Holden, S. A., Murphy, C., Moreno, J. F., Butler, S. T., Cromie, A. R., Lonergan, P., et al. (2017) *In vitro* characterisation of fresh and frozen sex-sorted bull spermatozoa, *Reprod. Fertil. Dev.*, **29**, 1415-1425, doi: 10.1071/RD16086.
 67. Park, Y. J., Kwon, K. J., Song, W. H., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Saidur Rahman, M., and Pang, M. G. (2021) New technique of sex preselection for increasing female ratio in boar sperm model, *Reprod. Domest. Anim.*, **56**, 333-341, doi: 10.1111/rda.13870.
 68. Dominguez, E. M., Moreno-Irusta, A., Guidobaldi, H. A., Tribulo, H., and Giojalas, L. C. (2018) Improved bovine *in vitro* embryo production with sexed and unsexed sperm selected by chemotaxis, *Theriogenology*, **22**, 1-8, doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.08.023.
 69. Ericsson, R. J., Langevin, C. N., and Nishino, M. (1973) Isolation of fractions rich in human Y sperm, *Nature*, **246**, 421-424, doi: 10.1038/246421a0.
 70. Neculai-Valeanu, A.-S., and Ariton, A. M. (2021) Game-changing approaches in sperm sex-sorting: microfluidics and nanotechnology, *Animals*, **11**, 1182, doi: 10.3390/ani11041182.
 71. Arzondo, M. M., Caballero, J. N., Marín-Briggiler, C. I., Dalvit, G., Cetica, P. D., and Vazquez-Levin, M. H. (2012) Glass wool filtration of bull cryopreserved semen: a rapid and effective method to obtain a high

- percentage of functional sperm, *Theriogenology*, **78**, 201-209, doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.001.
72. Thys, M., Vandaele, L., Morrell, J., Mestach, J., Van Soom, A., Hoogewijs, M., et al. (2009) *In vitro* fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by Single-layer (Glycidoxypolytrimethoxysilane) silane-coated silica colloidal centrifugation, *Reprod. Domest. Anim.*, **44**, 390-394, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01081.x.
73. Meitei, H. Y., Uppangala, S., Sharan, K., Chandraguthi, S. G., Radhakrishnan, A., Kalthur, G., et al. (2021) A simple, centrifugation-free, sperm-sorting device eliminates the risks of centrifugation in the swim-up method while maintaining functional competence and DNA integrity of selected spermatozoa, *Reprod. Sci.*, **28**, 134-143, doi: 10.1007/s43032-020-00269-5.
74. Azizeddin, A., Ashkar, F., King, W., and Revay, T. (2014) Enrichment of Y-chromosome-bearing bull spermatozoa by swim-up through a column, *Reprod. Dom. Anim.*, **49**, 1-4, doi: 10.1111/rda.12252.
75. Promthep, K., Satitmanwiwat, S., Kitiyanant, N., Tantiwattanakul, P., Jirajaroenrat, K., Sitthigripong, R., et al. (2016) Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand, *IJAR*, **50**, 310-313, doi: 10.18805/ijar.8427.
76. Bhat, Y., and Sharma, M. (2020) X-sperm enrichment of bovine semen by Percoll density gradient method and its effect on semen quality, sex ratio and conception rate, *IJAR*, **54**, 1181-1187.
77. Lucio, A. C., Resende, M. V., Dernowseck-Meirelles, J. A., Perini, A. P., Oliveira, L. Z., Miguel, M. C. V., et al. (2012) Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **64**, 525-532, doi: 10.1590/S0102-09352012000300001.
78. Kobayashi, J., Oguro, H., Uchida, H., Kohsaka, T., Sasada, H., and Sato, E. (2004) Assessment of bovine X- and Y-bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence *in situ* hybridization, *J. Reprod. Dev.*, **50**, 463-469, doi: 10.1262/jrd.50.463.
79. Machado, G. M., Carvalho, J. O., Filho, E. S., Caixeta, E. S., Franco, M. M., Rumpf, R., et al. (2009) Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos, *Theriogenology*, **71**, 1289-1297, doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.01.002.
80. Wolf, C. A., Brass, K., Rubin, M. I. B., Pozzobon, S. E., Mozzaquatro, F., and De la Côte, F. D. (2008) The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of *in vitro* produced bovine embryos, *Anim. Reprod.*, **5**, 110-115.
81. Madrid-Bury, N., Fernández, R., Jiménez, A., Pérez-Garnelo, S., Nuno Moreira, P., Pintado, B., et al. (2003) Effect of ejaculate, bull, and a double swim-up sperm processing method on sperm sex ratio, *Zygote*, **11**, 229-235, doi: 10.1017/S0967199403002272.
82. Resende, M. V., Lucio, A. C., Perini, A. P., Oliveira, L. Z., Almeida, A. O., Alves, B. C. A., et al. (2011) Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, **63**, 544-551, doi: 10.1590/S0102-09352011000300002.
83. Asma-ul-Husna, Awan, M. A., Mehmood, A., Sultana, T., Shahzad, Q., Ansari, M. S., et al. (2017) Sperm sexing in Nili-Ravi buffalo through modified swim up: Validation using SYBR green real-time PCR, *Anim. Reprod. Sci.*, **182**, 69-76, doi: 10.1016/j.anireprosci.2017.04.011.
84. Meles, D. K., Mustofa, I., Hariadi, M., Wurlina, W., Susilowati, S., Amaliya, A., et al. (2022) The enriched Y-bearing sperm combined with delayed fixed-time artificial insemination for obtaining male Simmental crossbred offspring, *Vet. World*, **15**, 102-109, doi: 10.14202/vetworld.2022.102-109.
85. Umehara, T., Tsujita, N., Zhu, Z., Ikedo, M., and Shimada, M. (2020) A simple sperm-sexing method that activates TLR7/8 on X sperm for the efficient production of sexed mouse or cattle embryos, *Nat. Protoc.*, **15**, 2645-2667, doi: 10.1038/s41596-020-0348-y.
86. Huang, M., Cao, X. Y., He, Q. F., Yang, H. W., Chen, Y. Z., Zhao, J. L., et al. (2022) Alkaline semen diluent combined with R848 for separation and enrichment of dairy goat X-sperm, *J. Dairy Sci.*, **105**, 10020-10032, doi: 10.3168/jds.2022-22115.

BIOCHEMICAL FEATURES OF X OR Y CHROMOSOME BEARING SPERMATOZOA FOR SPERM SEXING

Review

D. V. Pozdyshev^{1*}, N. A. Kombarova², and V. I. Muronetz^{1,3}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: denispoz@gmail.com

² *Head Center for Reproduction of Agricultural Animals,
142143 Bykovo, Moscow Region, Russia*

³ *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia*

This review presents information on the biochemical features of spermatozoa bearing an X or Y chromosome, enabling to obtain a sperm fraction with a pre-defined sex chromosome. Almost the only technology currently used for such separation (called sexing) is based on sperm fluorescence-activated cell sorting in regard to DNA content. Besides its applications, this technology made it possible to analyze the properties of isolated populations of spermatozoa bearing an X or Y chromosome. In recent years, a number of works have appeared proving the existence of differences between these populations at the transcriptome and proteome level. It is noteworthy that these differences are primarily related to energy metabolism and structural proteins of the flagellum. New methods of sperm enrichment with X or Y chromosome cells are based on the differences in motility between spermatozoa with different sex chromosomes. Sperm sexing is a widespread part of the protocol of artificial insemination of cows with cryopreserved semen, it allows to increase the proportion of offspring of the required sex. In addition, advances in the separation of X and Y spermatozoa may allow this approach to be applied in clinical practice to avoid sex-linked diseases.

Keywords: X/Y spermatozoa, sperm motility, sexing

ГЛУТАРЕДОКСИН 1 ЭВОЛЮЦИОННО ДРЕВНЕЙ ГИДРЫ: СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА И ЕГО ВОЗМОЖНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ ФУНКЦИИ

© 2023 N. Perween^{1,2}, K. Pekhale¹, G. Haval^{1,3}, G.S. Bose⁴,
S.P.K. Mittal⁴, S. Ghaskadbi⁵, S.S. Ghaskadbi^{1*}

¹ Savitribai Phule Pune University, Department of Zoology,
Pune 411007, India; e-mail: ssg@unipune.ac.in; sghaskadbi@gmail.com

² M. C. E. Society's Abeda Inamdar Senior College, Department of Zoology, Pune 411001, India

³ Abasaheb Garware College, Department of Zoology, Pune 411004, India

⁴ Savitribai Phule Pune University, Department of Biotechnology, Pune 411007, India

⁵ Agharkar Research Institute, Developmental Biology Group, Pune 411004, India

Поступила в редакцию 23.10.2022

После доработки 20.02.2023

Принята к публикации 20.02.2023

Глутаредоксин (Grx) является антиоксидантным редокс-белком, который использует глутатион в качестве донора электронов. Grx играет важную роль в различных внутриклеточных процессах, включая антиоксидантную защиту, клеточный редокс-статус, редокс-контроль процесса транскрипции, обратимое S-глутатионилирование специфических белков, апоптоз, дифференцировка клеток и др. В настоящем исследовании нами был выделен и охарактеризован дитиольный глутаредоксин из *Hydra vulgaris* Ind-Pune (HvGrx1). Анализ аминокислотной последовательности показал, что HvGrx1 принадлежит к семейству Grx с классическим мотивом Grx (CРУС). Филогенетический анализ и моделирование гомологии свидетельствуют о близком родстве HvGrx1 с белком Grx2 *Danio rerio*. Ген, кодирующий HvGrx1, был клонирован и экспрессирован в клетках *Escherichia coli*; очищенный белок имел молекулярную массу 11,82 кДа. HvGrx1 эффективно восстанавливал β-гидроксиэтилдисульфид (HED) с температурным оптимум 25 °С и рН-оптимум – 8,0. Экспрессия HvGrx1 наблюдалась во всех частях тела *Hydra*. Экспрессия мРНК HvGrx1 и ферментативная активность HvGrx1 значительно повышались после воздействия H₂O₂. При экспрессии в культуре клеток человека HvGrx1 защищал клетки от окислительного стресса и усиливал пролиферацию и миграцию клеток. Несмотря на то что *Hydra* является простым беспозвоночным, HvGrx1 эволюционно ближе к своим гомологам из высших позвоночных (как и многие другие белки *Hydra*).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глутаредоксин, *Hydra*, гидра, редокс.

DOI: 10.31857/S0320972523050093, **EDN:** AYQWOQ

ВВЕДЕНИЕ

Hydra (Cnidaria) является эволюционно древним многоклеточным животным, которое предположительно эволюционировало примерно 60 млн лет назад [1]. Несмотря на простое диплобластическое строение тела, *Hydra* обладает сформировавшейся нервной системой и тремя различными линиями стволовых клеток: эктодермальные и энтодермальные эпителиальные стволовые клетки, которые дают начало

эктодермальным и энтодермальным эпителиальным клеткам соответственно, и интерстициальные клетки, которые являются мультипотентными клетками и дают начало нейронам, нематоцитам, железистым клеткам и клеткам слизистой оболочки, а также сперматозоидам и яйцеклеткам [2]. Эктодермальные и энтодермальные стволовые клетки самообновляются примерно через 3–4 дня, тогда как интерстициальные клетки – примерно через 1,5 дня. Стволовые клетки *Hydra* непрерывно дифферен-

Принятые сокращения: DIG – диоксигенин; GR – глутатионредуктаза; Grx – глутаредоксин; HvGrx1 – глутаредоксин 1 из *Hydra vulgaris*; GSH – глутатион; HED – β-гидроксиэтилдисульфид; ISH – гибридизация *in situ*; Trx – тиоредоксин; HvTrx1 – тиоредоксин из *H. vulgaris*.

* Адресат для корреспонденции.

цируются и замещают клетки организма. Для *Hydra* характерны постоянно активные клеточные процессы, такие как деление, адгезия, миграция, дифференцировка и апоптоз [3]. Кроме того, *Hydra* обладает впечатляющей регенеративной способностью. Она не проявляет организменного старения, и поэтому считается потенциально бессмертным животным [4, 5]. Эти замечательные способности *Hydra* обеспечиваются непрерывным самообновлением и дифференцировкой трех линий стволовых клеток [6]. Белком, ответственным за поддержание стволовых клеток и отсутствие старения у *Hydra*, является фактор транскрипции FOXO1 (forkhead box protein O1) [7]. Он участвует в регуляции антиоксидантных генов и, таким образом, способствует поддержанию окислительно-восстановительного (редокс) гомеостаза и восстановлению биомолекул, поврежденных активными формами кислорода (АФК) [8]. Экспрессия и посттранскрипционная регуляция FOXO1 контролируется редокс-статусом клетки [8]. Поэтому для поддержания линий стволовых клеток у *Hydra* были выработаны сложные и точно регулируемые антиоксидантные системы. К настоящему времени у *Hydra* охарактеризованы гены некоторых антиоксидантных ферментов, например фосфолипидгидропероксидглутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы и тиоредоксина (Trx) [9–12].

Глутаредоксины (Grx) — повсеместно распространенные антиоксидантные белки, содержащие в активном центре мотив CXXC/S и участвующие в окислительно-восстановительном гомеостазе клетки [13]. Они входят в состав антиоксидантной системы глутатиона (GSH) и катализируют восстановление дисульфидов с использованием GSH в качестве косубстрата [14]. Grx можно разделить на два класса на основе их структуры, мотива активного центра и консервативных доменов [15]. Дитиольные Grx, образующие класс I, содержат два остатка цистеина в консенсусной последовательности CXXC, расположенной в активном центре фермента, в то время как ферменты, входящие в класс II, представляют собой монотиольные Grx с единственным остатком цистеина в консенсусной последовательности CXXS активного центра [16, 17]. Дитиольным Grx необходимы два остатка цистеина для восстановления глутатионилированных белков с образованием глутатионилированных Grx, которые регенерируются за счет рециркуляции цистеинов в активном центре. Восстановление образовавшейся дисульфидной связи происходит с участием двух молекул GSH или Trx-редуктазы. Напротив, монотиольным Grx требуется только

N-концевой цистеин и одна молекула GSH для восстановления дисульфида, а образовавшийся глутатионилированный Grx регенерируется непосредственно GSH. Большинство монотиольных Grx лишены классической ферментативной активности *in vitro* [18]. Монотиольные Grx могут быть однодоменными белками или состоять из нескольких доменов с N-концевым Trx-подобным доменом. Дитиольные Grx принимают участие в различных внутриклеточных процессах, таких как синтез дезоксирибонуклеотидов, антиоксидантная защита, клеточный редокс-статус, редокс-контроль процесса транскрипции, внутриклеточная передача сигнала, полимеризация актина, обратимое S-глутатионилирование специфических белков, апоптоз и дифференцировка клеток [18–23]. Показано, что монотиольные Grx участвуют в регуляции сборки железосерных кластеров, биосинтезе гема, эмбриональном развитии, иммунном ответе и физиологии сердца. Моно- и дитиольные Grx разных видов различаются по своим структурным, каталитическим и функциональным свойствам [18]. Были охарактеризованы Grx различных организмов, таких как бактерии, дрожжи, млекопитающие и растения. В настоящей работе сообщается о молекулярном клонировании, экспрессии, анализе и характеристике дитиольной изоформы Grx1 из *Hydra* (HvGrx1).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура *Hydra*. В экспериментах использовали *Hydra vulgaris* Ind-Pune [24]. *Hydra* обычно содержали в среде для гидры (1 mM CaCl₂; 0,1 mM KCl; 1 mM NaCl; 0,1 mM MgSO₄ и 1 mM Tris-HCl) при 12-часовом цикле свет/темнота при температуре 18 °C, кормили 3–4 раза в неделю только что вылупившимися рачками *Artemia nauplii* и оставляли голодать на 48 ч перед проведением эксперимента.

Выделение РНК и синтез кДНК. От 40 до 50 не отпочковавшихся особей гидры гомогенизировали в 50 мкл реагента TRIzol® («TaKaRa», Япония) и экстрагировали общую РНК в соответствии с протоколом производителя. Количество РНК определяли на спектрометре Biospectrometer («Eppendorf», Германия), а целостность РНК подтверждали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Синтез кДНК проводили с помощью набора Verso cDNA synthesis kit («Thermo Scientific», США) в соответствии с протоколом производителя.

Идентификация последовательности гена, кодирующего белок HvGrx1, и её клонирование. Предсказанная последовательность гена HvGrx1

была извлечена из базы данных GenBank с помощью программы tBLASTn [25] с использованием последовательности *Grx1 Homo sapiens* (UniProtKB, id: P35754) как запроса к базе данных Hydra EST. Полученный EST (GenBank: CV182757.1) был использован для конструирования праймеров (прямой: 5'-TGTAATAATAAAAAATGGGA-3'; обратный: 5'-AGATAAGTATTTGTTCTCAT-3'), чтобы амплифицировать ген *HvGrx1* из кДНК гидры. Полную последовательность, кодирующую ген *HvGrx1*, с 5' и 3' UTRs (untranslated regions) амплифицировали с использованием ДНК-полимеразы высокой точности Phusion® («New England Biolabs», США) в следующих условиях: исходная денатурация при 95 °C – 5 мин; денатурация при 95 °C – 30 с, отжиг при 43,2 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 30 с, 35 циклов; достройка цепи при 72 °C – 5 мин. Для визуализации продукт ПЦР наносили на 1%-ный агарозный гель. Искомый фрагмент элюировали из геля, очищали с помощью набора QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit («QIAGEN», США), прикрепляли А-хвост с помощью ДНК-полимеразы *Taq* («New England Biolabs») и лигировали в вектор pGEM-T («Promega», США). Полученную плазмиду использовали для трансформации клеток DH5α *Escherichia coli*. Трансформанты отбирали синеватым скринингом. Плазмиды экстрагировали из трансформированных клеток и подвергали перевариванию с помощью *NotI* для подтверждения получения положительных клонов. Кроме того, нуклеотидные последовательности вставок в этих плаزمиды были подтверждены секвенированием по Сэнгеру. Нуклеотидная последовательность гена, кодирующего *HvGrx1*, была получена с помощью программы ChromasPro («Technelysium Pty Ltd», Австралия).

Анализ последовательности. Открытую рамку считывания (ORF) гена *HvGrx1* идентифицировали с помощью программы поиска ORF NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder>) и транслировали в соответствующую аминокислотную последовательность. Идентичность последовательности *HvGrx1* определяли с помощью программы BLAST, а консервативные аминокислотные остатки определяли с помощью программы MEGA-X [26]. Функционально важные участки и консервативные аминокислотные остатки в белке *HvGrx1* были предсказаны с помощью компьютерных подходов с использованием сервера Consurf (<https://consurf.tau.ac.il>). Семейство белков идентифицировали с помощью программы InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>), а консервативные домены идентифицировали с помощью поиска NCBI CD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Молекулярную массу белка *HvGrx1* и теоретическое значение pI рассчитывали с помощью инструмента ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam>). Последовательность *HvGrx1* была проанализирована на присутствие сигнального пептида и митохондриальной таргетной последовательности с использованием инструментов SignalP 3.0 [27] и TargetP-2.0 [28] соответственно.

Анализ *in silico* последовательности *HvGrx1*.

Для поиска последовательностей гомологичных белков в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot использовали программу BLASTP с последовательностью белка *HvGrx1* в качестве последовательности запроса. Множественные выравнивания были созданы с помощью MEGA-X с использованием последовательностей гомологичных белков из репрезентативных типов, и было создано филогенетическое древо с использованием метода минимальной эволюции (ME) [29]. Для проверки относительной поддержки ветвей, полученных с помощью ME-анализа, использовался метод бутстрэп-анализа. Вторичная структура *HvGrx1* была предсказана с помощью сервера SOPMA. Трехмерная структура белка была предсказана с помощью программы SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>), основываясь на кристаллической структуре белка Grx2 *H. sapiens* (PDB: 2ht9). Качество сгенерированной модели проверяли с помощью программы SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

3D-Структуры гомологичных Grx были получены с помощью расширенного инструмента поиска последовательностей PDB, и модель *HvGrx1* была наложена на структуры белков Grx2 (3UIW) *Danio rerio*, Grx2 (2HT9) и Grx1 (4RQR) *H. sapiens*, Grx2 (3CTF) и Grx1 (3C1R) *Saccharomyces cerevisiae*, Grx1 (4MZB) *Plasmodium falciparum*, Grx (1GRX) *E. coli* и Grx1 (2MXN) *Trypanosoma brucei*. Предсказание связывания лигандов осуществлялось с использованием программы I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER>).

Субклонирование гена *HvGrx1* в экспрессирующий вектор pET-28b. Кодирующий участок кДНК *HvGrx1* амплифицировали из вектора pGEM-T с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion® и специфических праймеров (прямой: 5'-CATGCCATGGGACGAGCTGAAGCTGAA-3' и обратный: 5'-CCGCTCGAGAGATTTTCAACAAGTTCTTTCAATTCC-3'), которые были созданы для включения сайтов распознавания ферментами рестрикции *NcoI* и *XhoI*. Реакцию ПЦР проводили в следующем режиме: исходная денатурация при 98 °C – 30 с;

денатурация при 98 °C – 10 с, отжиг при 55,6 °C – 30 с, элонгация при 72 °C – 30 с, 35 циклов; достройка цепи при 72 °C – 5 мин. Продукт ПЦР и вектор pET-28b («Novagen», США) расщепляли эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI*, очищали с помощью набора QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit и лигировали при 4 °C в течение 18 ч с использованием ДНК-лигазы T4 («New England Biolabs»). Смесью лигирования трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21 C43 (DE3), которые были нанесены на агар, содержащий 50 мкг/мл канамицина. Для подтверждения вставок в рамку плазмидную ДНК из трансформированных клеток подвергали секвенированию по обоим цепям ДНК с использованием метода Сэнгера.

Экспрессия и очистка белка *HvGrx1*. Ночную культуру клеток *E. coli* BL21 C43 (DE3) с рекомбинантной плазмидой, содержащей последовательность, кодирующую белок *HvGrx1*, вводили (в соотношении 1 : 100) в 200 мл среды LB, дополненной 50 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37 °C на шейкере при 200 об./мин до достижения оптической плотности при 600 нм (OD_{600}), равной 0,4–0,5. Для индукции экспрессии белка добавляли 0,25 мМ IPTG (изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид) с последующей инкубацией клеток при 4 °C при 200 об./мин в течение 18 ч. Далее клетки собирали путем центрифугирования при 6000 об./мин в течение 10 мин, ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Tris-Cl (pH 8,0); 100 мМ NaCl; 0,1 мМ ЭДТА; 0,02% азид натрия; 0,05% (v/v) Triton X-100; 0,1 мМ PMSF; 0,1 мМ DTT; 0,02 мг/мл лизоцим) и лизировали ультразвуком, используя Sonics vibra cell VCX130 («Sonics & Materials, Inc.», США) при амплитуде 35% в течение 10 мин при 15-секундном импульсе включения/15-секундного выключения. Лизат центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 10 мин при 4 °C, и супернатант наносили на колонку Ni-NTA Superflow, предварительно уравновешенную буфером, содержащим 0,01 М Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением 0,2 М NaH_2PO_4 . Несвязавшиеся белки удаляли промывочным буфером (0,01 М Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 М NaH_2PO_4 ; 50 мМ имидазол). Связанные His6-меченные белки элюировали буфером для элюции (0,01 М Tris-HCl (pH 8,0); 0,2 М NaH_2PO_4 ; 250 мМ имидазол). Элюированные белки подвергали диализу против фосфатно-солевого буфера (PBS (pH 7,4): 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl; 8 мМ Na_2HPO_4 ; 2 мМ KH_2PO_4) в течение 24 ч при 4 °C с 3-кратной сменой буфера. Дальнейшую очистку белка проводили с помощью

гель-фильтрации на колонке Superdex 75 FPLC («GE Healthcare», Великобритания), предварительно уравновешенной 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) с добавлением 50 мМ NaCl. Чистоту препарата белка *HvGrx1* оценивали с помощью электрофореза в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE с последующим окрашиванием белковых полос красителем Кумасси бриллиантовый голубой R250. Концентрацию белка в образцах определяли с использованием стандартного метода Бредфорда [30].

Анализ ферментативной активности *HvGrx1*. Активность *HvGrx1* определяли при помощи HED (β -гидроксиэтилдисульфид) [31]. Специфичность действия *HvGrx1* была подтверждена с помощью специфического ингибитора 2-AAPA (R,R'-2-acetylamino-3-[4-(2-acetyl-amino-2-carboxyethylsulfanyltiocarbonylamino)phenylthiocarbamoylsulfanyl] propionic acid hydrate) [32]. *HvGrx1* (10 мкМ) инкубировали с 10, 25, 50, 100 или 200 мкМ 2-AAPA при 25 °C в течение 15 мин и измеряли остаточную активность с использованием HED-анализа.

Сообщается, что некоторые Grx снижают уровень инсулина, подобно Trx [33]. В реакционную смесь, содержащую 20 мкМ инсулина в 63 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,0), 5 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и 2 мМ EDTA (pH 8,0), добавляли 50 мкМ очищенного белка. Конечное значение pH реакционной смеси было равным 7,0. Реакцию запускали добавлением 1 мМ GSH и инкубировали при 25 °C в течение 20 мин. Увеличение поглощения при 650 нм (A_{650}) контролировали каждую минуту в течение 10 мин. Очищенный тиоредоксин из *H. vulgaris* (*HvTrx1*) использовали в качестве положительного контроля, а 1 мМ DTT использовали в качестве восстанавливающего агента. Отрицательный контроль не содержал белка и учитывал прямое снижение уровня инсулина с помощью DTT.

Сообщалось, что Grx проявляет активность глутатионредуктазы (GR), т.е. восстанавливает GSSG до GSH [34]; поэтому мы проанализировали *HvGrx1* на активность GR. Реакционная смесь содержала 100 мМ фосфата калия (pH 8,0); 0,2 мМ NADPH и 5 мМ GSSG в общем объеме реакционной смеси, равном 100 мкл. Реакцию запускали добавлением 10 мкМ *HvGrx1*; и в течение 10 мин регистрировали уменьшение поглощения при 340 нм (A_{340}) вследствие окисления NADPH. В качестве положительного контроля использовали очищенную GR *S. cerevisiae* («Sigma-Aldrich», США); в качестве отрицательного контроля использовали отсутствие фермента в реакционной смеси.

Определения оптимума pH и температуры.

Для определения pH-оптимума HvGrx1 определяли активность очищенного фермента (10 мкМ) с использованием HED в буферных растворах с различными значениями pH: Glycine-HCl (pH 4,0 и 5,0), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (pH 6,0 и 7,0), Tris-HCl (pH 8,0) и Glycine-NaOH (pH 9,0 и 10,0). Для определения температурного оптимума активности HvGrx1 очищенный фермент (10 мкМ) анализировали при различных значениях температуры (18, 25, 37, 45 и 55 °C) при pH 8,0.

Для определения pH-стабильности HvGrx1 очищенный фермент (10 мкМ) предварительно инкубировали в течение 30 мин при разных значениях pH (4–10), а затем определяли остаточную активность фермента с помощью HED-анализа. Термостабильность фермента исследовали путем инкубации 10 мкМ HvGrx1 при различных значениях температуры (25, 45 или 55 °C) в течение 40 мин. Каждые 10 мин отбирали аликвоту и анализировали при оптимальных условиях, как описано выше. Наивысшее значение активности было принято за 100% остаточной активности.

Оценка кинетических параметров HvGrx1.

Очищенный HvGrx1 (10 мкМ) инкубировали с различными концентрациями HED (1–16 мкМ) или GSH (0,2–1,2 мМ), и активность фермента определяли при pH 8,0 и температуре 25 °C с использованием HED-анализа. Для определения констант GSH мы использовали 0,7 мМ HED и варьировали концентрацию GSH. Для определения констант HED использовали 1 мМ GSH и варьировали концентрацию HED. Кинетические параметры K_m , $k_{\text{кат}}$ и $k_{\text{кат}}/K_m$ рассчитывали с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен на графике Лайнуивера–Берка. Общую каталитическую скорость HvGrx1 ($k_{\text{кат}}$) определяли с помощью уравнения $k_{\text{кат}} = V_{\text{макс}} [E]_t$, где $[E]_t$ – концентрация фермента, используемого в реакции.

Локализация транскриптов гена HvGrx1 в теле Hydra, определенная методом гибридизации *in situ*. Транскрипты гена HvGrx1 локализовали с помощью гибридизации *in situ* (ISH), проводимой по стандартным протоколам [35] с использованием меченных дигоксигенином (DIG) смысловых и антисмысловых рибозондов, приготовленных с помощью набора DIG RNA labelling kit («Roche», Германия).

Экспрессия мРНК HvGrx1 после воздействия на клетки H_2O_2 . Суммарно 240 особей Hydra после 48-часового голодания подвергали воздействию 1 мМ H_2O_2 , добавленной в среду для гидр на 30 мин, после чего животных тщательно промывали и переносили в свежую среду для гидры (не содержащую H_2O_2).

Через 0, 0,5, 2, 4, 8 или 24 ч каждый раз отбирали по 40 особей. Гидры, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 , были использованы в качестве контроля. Экстракцию РНК из подвергавшихся и не подвергавшихся воздействию H_2O_2 (контрольных) гидр проводили с использованием реагента TRIzol®, и синтез кДНК осуществляли с помощью набора Verso cDNA synthesis kit. Количественную ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) проводили на приборе StepOnePlus real-time PCR system («Applied Biosystems», США) с использованием сконструированных праймеров (прямой: 5'-GCTACTTACACTGTTTTGGAG-3'; обратный: 5'-AGTACGAGCACCAGTCATAT-3') при следующих условиях: исходная денатурация при 95 °C – 10 мин; денатурации при 95 °C – 30 с, отжиг при 56,7 °C – 15 с, элонгация при 60 °C – 15 с, 40 циклов. В качестве внутреннего контроля был использован ген β -актина из *H. vulgaris* (прямой праймер: 5'-CAATTGAACACGGAATTGTA-3'; обратный праймер: 5'-AGTAAGAAGGACAGGGTGTTC-3'), чтобы нормировать уровень экспрессии мРНК HvGrx1. Эксперименты проводили в трех независимых повторах. Для оценки количества транскриптов использовали метод $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Ферментативная активность HvGrx1 после воздействия H_2O_2 на клетки. Суммарно 240 особей Hydra после 48-часового голодания подвергали воздействию 1 мМ H_2O_2 , добавленной в среду для гидр на 30 мин, после чего животных тщательно промывали и переносили в свежую среду для гидры. Через 0, 0,5, 2, 4, 8 или 24 ч каждый раз отбирали по 40 особей и разрушали их тела импульсным ультразвуком в буфере для лизиса (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 1 мМ ЭДТА; 0,7% (v/v) Triton X-100; 0,1 мМ PMSF и коктейль ингибиторов 1X Protease). Лизат клеток центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 30 мин при 4 °C. Концентрацию белка в супернатанте оценивали с помощью метода Бредфорда, а активность белка HvGrx1 определяли при помощи HED-анализа. Эксперименты проводили в трех независимых повторах. В качестве контроля использовали Hydra, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 .

Влияние 2-ААРА, ингибитора Grx1, на регенерацию Hydra. Гидры, которые голодали в течение 48 ч, были разделены на три части, и образцы, содержащие 12–13 средних частей, инкубировали в среде гидры, содержащей 0, 100, 200 или 1000 мкМ 2-ААРА (ингибитор Grx1). Оценивали степень регенерации и записывали живые изображения через 24, 48 и 72 ч под стереомикроскопом Zeiss Stemi 302 («Zeiss», Германия). В качестве контроля ис-

пользовали средние части *Hydra*, не подвергавшиеся воздействию H_2O_2 . Эксперимент выполняли в трех независимых повторях.

Культура клеток и плазмидная трансфекция. Клетки HCT116 (линия опухолевых клеток рака толстой кишки) были получены из Национального центра клеточных исследований, Пуна, Индия. Клетки культивировали в среде DMEM, дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (FBS) и раствором, содержащим антибиотики и противогрибковые средства ($1\times$) при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . Для проведения трансфицирования 2×10^5 клеток рассевали на 30-мм чашки с полной средой DMEM. Кодирующую последовательность гена *HvGrx1* амплифицировали из вектора pGEM-T с использованием ДНК-полимеразы высокой точности Phusion® и специфических праймеров (прямой: 5'-CGCGGA TCCACCATGGGACGAGCTGAAGCTGA-3', обратный: 5'-TGCTCTAGATTAGATTTTCAAA GTTCTTTCAATTCCC-3'), которые включали сайты ферментов рестрикции *Bam*HI и *Xba*I, и затем клонировали в вектор экспрессии pCS + GFP, содержащий на C-конце метку – белок GFP (зеленый флуоресцирующий белок). Клетки были трансфицированы плазмидами pCS + GFP или pCS + GFP + *HvGrx1* с использованием полиэтиленимина (PEI) в среде DMEM. После инкубации в течение ночи производили замену неполной культуральной среды на полную среду. Через 48 ч клетки оценивали на жизнеспособность, пригодность к образованию колоний и миграции.

Анализ жизнеспособности клеток. Чтобы выявить роль *HvGrx1* в процессе восстановления клеток после воздействия H_2O , трансфицированные клетки HCT116 рассевали в 96-луночные планшеты (10 000 клеток/луночка). После инкубации в течение ночи клетки подвергали воздействию 0,8 мМ H_2O_2 в течение 24 ч, после чего в каждую лунку добавляли реагент МТТ (5 мг/мл). После 4 ч инкубации в каждую лунку добавляли по 100 мкл солюбилизирующего раствора, и инкубировали клетки в течение ночи. Поглощение регистрировали при 570 нм с помощью планшетного ридера ELISA («Hidex», Финляндия), и рассчитывали процент жизнеспособных клеток, принимая за 100% жизнеспособность контрольных клеток, не подвергавшихся трансфекции.

Определение колониеобразующей способности клеток. Трансфицированные клетки HCT116 рассевали в колбы Т-25 со средой, содержащей сыворотку. Образование колоний в колбах наблюдали в течение 4 дней; изображения были получены с помощью инвертированного мик-

роскопа со встроенной камерой DP70 CCD («Zeiss»). Количественную оценку флуоресценции проводили с помощью программного обеспечения ZEN 2.3 и Image J.

Определение способности клеток к миграции. Трансфицированные клетки HCT116 культивировали в среде, содержащей сыворотку. После достижения конfluence создавали в монослое клеток «рану» с помощью наконечника для микропипеток на 10 мкл. Наблюдали за миграцией клеток с помощью инвертированного микроскопа со встроенной камерой DP70 CCD. Расстояние, пройденное клетками к ране, определяли через 24 ч.

Статистическая обработка данных. Каждый эксперимент проводили как минимум в трех независимых повторях; данные представлены как среднее $\pm$ SE. Для проведения сравнения между группами использовали *t*-критерий Стьюдента. Различия считались статистически достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клонирование и анализ последовательности гена, кодирующего *HvGrx1*. Продукт ПЦР размером 379 п.н. был получен в результате амплификации гена *HvGrx1* (рис. S1 в Приложении). Нуклеотидная последовательность гена *HvGrx1* (рис. S2 в Приложении) была размещена в базе данных NCBI GenBank (код доступа KX760114). Секвенирование клонированного в плазмиде pGEM-T гена (pGEM-T + *HvGrx1*) выявило открытую рамку считывания для 105 а.о. С помощью программы BLAST была выявлена гомология аминокислотной последовательности *HvGrx1* с последовательностями других белков Grx, размещенных в базе данных NCBI. С помощью базы данных InterProScan было обнаружено, что *HvGrx1* принадлежит к группе дитиольных белков Grx, которые проявляют активность глутатионоксиоредуктазы и глутатиондисульфидредуктазы (NADPH) и имеют один домен Grx (рис. S3, А в Приложении).

Поиск консервативных доменов показал, что *HvGrx1* имеет домен Grx и принадлежит к Grx-подобному суперсемейству (рис. S3, В в Приложении). В результате проведения множественного выравнивания последовательностей с помощью программы Clustal omega, в последовательности *HvGrx1*, а именно в его активном центре, был выявлен мотив СРУС. С помощью программы ScanProsite было предсказано, что Grx-домен содержит два остатка цистеина, которые могут образовывать дисульфидные связи. С использованием сервера

Consurf были выявлены экспонированные на поверхности белка высококонсервативные и функционально важные остатки лизина (L24 и L34), глутаминовой кислоты (E48 и E50), глутамин (Q59), треонина (T66 и T70), пролина (P72), аргинина (R73), изолейцина (I81) и глицина (G94). Кроме того, были выявлены структурно значимые высококонсервативные остатки фенилаланина (F22), серина (S23), цистеина (C27), валина (V71), глицина (G83) и лейцина (L96), которые были скрыты внутри молекулы белка (рис. S3, С в Приложении).

Физико-химические свойства HvGrx1 рассчитывали с помощью программы Protparam (инструмент ExPasy). Предсказанная молекулярная масса HvGrx1 составила 11,87 кДа, а предсказанное значение pI – 4,94. Анализ последовательности белка с помощью программ SignalP и TargetP 2.0 позволил предположить, что HvGrx1 является внутриклеточным белком, расположенным в цитоплазме.

Анализ *in silico* HvGrx1 и других Grx. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности подтвердило наличие Grx-домена, а также локализацию консервативных остатков цистеина (C27 и C30), необходимых для каталитической активности, в активном центре HvGrx1. Было показано, что Grx-домен и остатки цистеина из активного центра фермента консервативны во всех белках Grx1 и Grx2, за исключением Arthropoda, у которых второй остаток цистеина заменен на остаток аланина (рис. S4 в Приложении). Кроме каталитически важных остатков, в большинстве типов также присутствуют другие консервативные аминокислотные остатки, такие как G67, G82, G83, T70, V71 и P72.

Чтобы определить эволюционное положение белка HvGrx1, мы провели филогенетический анализ с использованием метода ME на основе выведенной аминокислотной последовательности и последовательностей дитиольных Grx некоторых репрезентативных организмов, полученных из базы данных SwissProt/UniProt-KB database (рис. S5 в Приложении). Полученное филогенетическое древо дало представление о разнообразии белков Grx и эволюционных отношениях между разными видами. Дитиольные белки Grx в основном группировались в две ветви (Grx1 и Grx2). Интересно, что HvGrx1 группировался с ферментами высших позвоночных и был наиболее близок к белку Grx2 *D. rerio*. Взаимосвязи, показанные на филогенетическом древе, хорошо согласовывались с традиционной таксономией, так как вирусы, бактерии, дрожжи, беспозвоночные и позвоночные образовывали отдельные клады.

SOPMA-анализ HvGrx1 показал, что белок состоит из 47,62% α -спиралей, 30,48% приходится на структуры типа случайный клубок, 15,24% составляют удлиненные цепи и 6,67% – β -повороты (рис. S6, А в Приложении).

3D-Модель структуры HvGrx1 с типичным для Grx способом сворачивания белка была создана с использованием SWISS-MODEL (рис. S6, В в Приложении). Согласно серверу SAVES v6.0, предсказанная модель HvGrx1 имеет общий коэффициент качества, равный 97,87, и для 99,02% аминокислотных остатков средняя оценка 3D-1D $\geq 0.2 \cdot 3D$. Структура HvGrx1 включает ядро, состоящее из четырех β -листов, окруженных пятью α -спиральями (рис. S6, В в Приложении) с мотивом активного центра CXXC, расположенным в петле, соединяющей β -лист 1 и α -спираль 1. Предсказанная структура белка HvGrx1 была наложена на доступные структуры белков Grx1 или Grx2 (рис. S6, С в Приложении) с рассчитанными значениями RMSD, равными

0,073 (Grx2 *D. rerio*; 3UIW),
0,677 (Grx2 *H. sapiens*; 2HT9),
0,759 (Grx2 *S. cerevisiae*; 3CTF),
0,773 (Grx1 *H. sapiens*; 4RQR),
0,927 (Grx1 *S. cerevisiae*; 3C1R),
0,988 (Grx1 *P. falciparum*; 4MZB),
1,578 (Grx *E. coli*; 1GRX),
2,074 (Grx1 *T. brucei*; 2MXN).

Было определено наибольшее структурное сходство HvGrx1 с Grx2 *D. rerio*. Прогнозирование сайтов связывания лиганда с помощью сервера I-TASSER выявило сайты связывания для трех субстратов: GSH, цисплатина и β -меркаптоэтанола (рис. S6, D в Приложении).

Экспрессия и очистка белков. Экспрессированный в клетках *E. coli* и очищенный белок давал единственную полосу с молекулярной массой 12 кДа в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE (рис. 1, а). Наблюдаемая молекулярная масса HvGrx1 соответствовала расчетной.

Биохимические анализы. Как показано на рис. 1, б, HvGrx1 проявляет активность Grx (восстановление дисульфидной связи в HED) в зависимости от концентрации. Специфичность реакции подтверждали с помощью 2-ААРА, специфического ингибитора Grx1. Чтобы определить концентрацию 2-ААРА, которая полностью ингибирует активность HvGrx1, мы обрабатывали одни и те же количества HvGrx1 разными концентрациями ингибитора. По мере увеличения концентрации 2-ААРА активность HvGrx1 снижалась, а при концентрации 200 мкМ 2-ААРА полностью ингибировал восстановление HED (рис. 1, с).

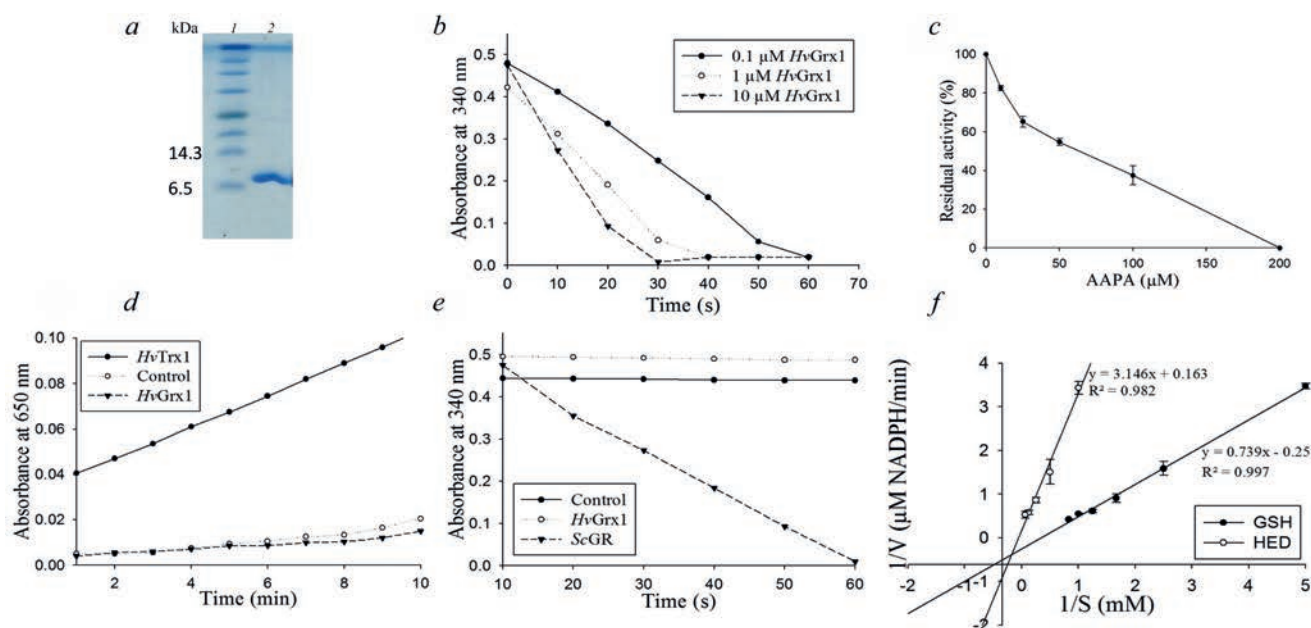


Рис. 1. *a* – Очищенный рекомбинатный белок *HvGrx1*, проанализированный с помощью 10%-ного Tris-Tricine SDS-PAGE: дорожка 1 – маркеры молекулярной массы; дорожка 2 – очищенный белок. *b* – Ферментативная активность очищенного *HvGrx1*, проанализированная при использовании HED в качестве субстрата. *c* – Влияние ингибитора (2-AAPA) на ферментативную активность *HvGrx1*. *d* – Снижение уровня инсулина с помощью *HvGrx1* (в качестве положительного контроля был взят тиоредоксин из *H. vulgaris* (*HvTrx1*)). *e* – Глутатионредуктазная (GR-активность) *HvGrx1* (в качестве положительного контроля была взята GR из *S. cerevisiae*). *f* – График Лайнуивера–Берка каталитической активности *HvGrx1*. Все определения проводились как минимум в трех независимых повторах. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ SD

Сообщалось, что Grx восстанавливает два межцепочечных дисульфидных мостика в молекуле инсулина, подобно Trx [33, 36]. Однако даже при концентрации, равной 50 мкМ, *HvGrx1* не смог катализировать восстановление инсулина по сравнению с 10 мкМ *HvTrx1*, который восстанавливал инсулин, что указывает на отсутствие активности Trx у *HvGrx1* (рис. 1, *d*). *HvGrx1* также не смог восстановить GSSG до GSH, что указывает на отсутствие активности GR (рис. 1, *e*).

Кинетические параметры. Кинетические параметры *HvGrx1* при использовании HED в качестве субстрата определяли по графику Лайнуивера–Берка: $K_m = 0,57 \pm 0,05$ мМ; $V_{\text{макс}} = 3,63 \pm 0,15$ мкМ NADPH/мин; $k_{\text{кат}} = 21,80 \pm 0,24$ с⁻¹ и $k_{\text{кат}}/K_m = 38,24 \pm 1,1$. Значения, полученные при использовании GSH в качестве субстрата, были равны: $K_m = 0,003$ мМ; $V_{\text{макс}} = 4,12 \pm 0,1$ мкМ NADPH/мин; $k_{\text{кат}} = 24,71 \pm 0,4$ с⁻¹ и $k_{\text{кат}}/K_m = 8236,66 \pm 11,3$ (рис. 1, *f*).

Влияние pH и температуры на активность *HvGrx1*. Как показано на рис. 2, *a*, *HvGrx1* проявляет активность в широком диапазоне pH (4,0–10,0), и максимальная активность наблюдается при pH 8,0.

Активность *HvGrx1* измеряли в диапазоне температур 18–55 °С. Как показано на рис. 2, *b*, инкубация белка при 18, 25 или 37 °С не влияла на его ферментативную активность.

В то же время инкубация белка при 45 и 55 °С приводила к падению активности *HvGrx1* на 30 и 50% соответственно. Температурный оптимум *HvGrx1* оказался равным 25 °С. Фермент сохранял более 60% активности после инкубации при различных значениях pH (4–10), и максимальная стабильность фермента наблюдалась при pH 8,0 (рис. 2, *c*). Анализ термостабильности *HvGrx1* также показал, что *HvGrx1* сохранял 64,0% своей активности после инкубации в течение 40 мин при 25 °С, но инактивировался на 50% после инкубации при 45 или 55 °С (рис. 2, *d*).

Локализация транскриптов гена *Grx1* в теле *Hydra*. Расположение транскриптов мРНК *HvGrx1* в теле гидры изучали с помощью метода ISH с использованием меченных DIG рибозондов. Выявлено, что мРНК *HvGrx1* экспрессировалась как в эктодерме, так и энтодерме, что указывает на то, что мРНК *HvGrx1* экспрессируется в *Hydra* повсеместно (рис. 3, *a*).

Влияние H₂O₂ на уровень экспрессии *HvGrx1* и его ферментативную активность. Максимальная экспрессия транскриптов гена *HvGrx1* наблюдалась сразу после воздействия H₂O₂, а затем снижалась в течение 0,5 ч после переноса животных в свежую среду. Активность *HvGrx1* в лизате клеток была аналогичной, при этом наибольшая активность наблюдалась сразу после воздействия H₂O₂ (рис. 3, *b* и *c*).

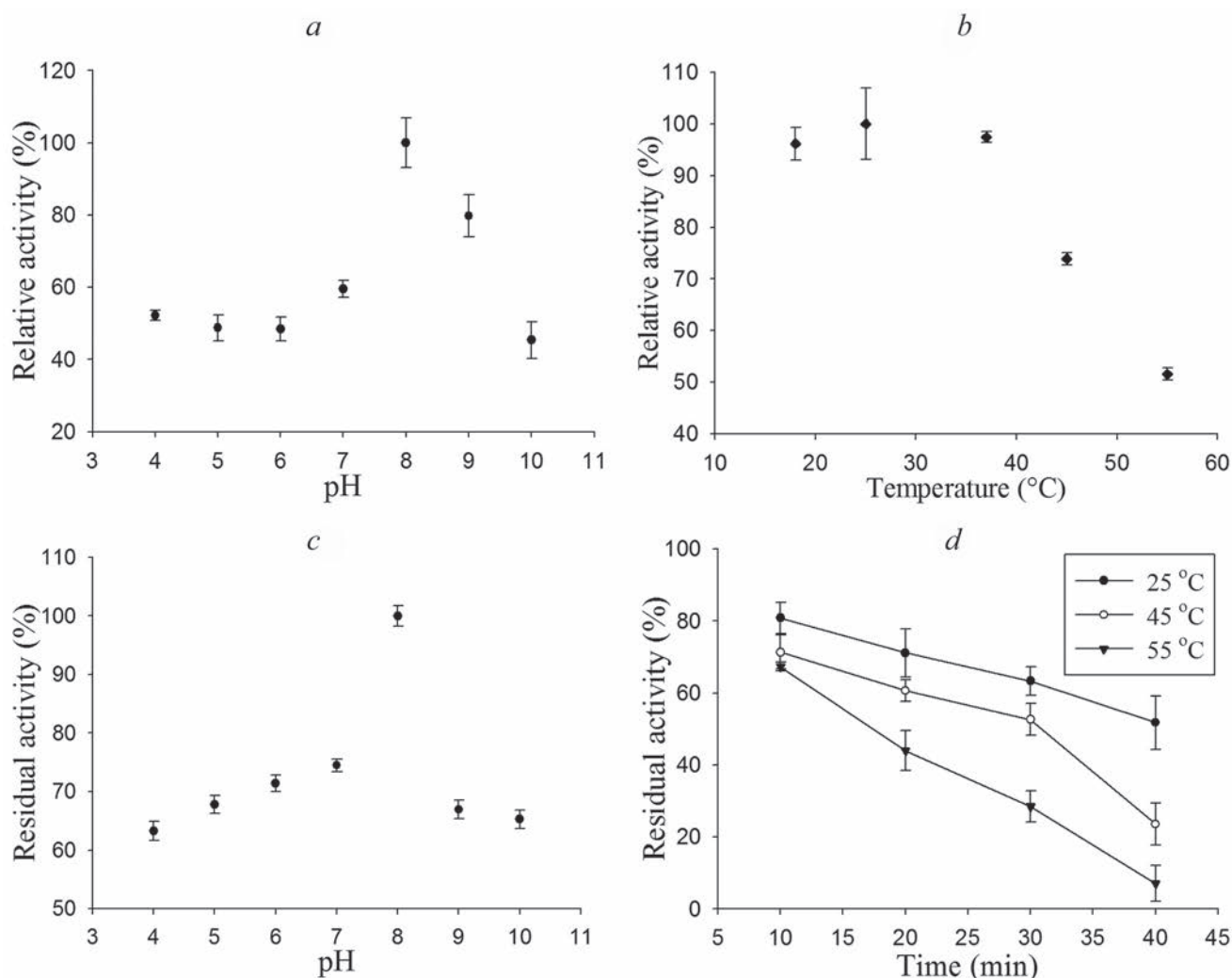


Рис. 2. *a* – pH-Оптимум каталитической активности HvGrx1, определенный в ходе проведения реакции при различных значениях pH (4,0–10,0) при 25 °С. *b* – Температурный оптимум ферментативной активности HvGrx1, определенный по параметрам реакции восстановления НЕД при различных температурах (18, 25, 37, 45 и 55 °С). *c* – pH-Стабильность HvGrx1 при различных значениях pH, определяемая в ходе инкубации белка в буферах с различными значениями pH (pH 4, 5, 6, 7, 8, 9, и 10) в течение 30 мин с последующей оценкой остаточной активности в отношении НЕД. *d* – Устойчивость HvGrx1 к температурам. Белок инкубировали при 25, 45 или 55 °С в течение 10, 20, 30 или 40 мин, а затем измеряли его остаточную активность

Влияние ингибирования активности Grx1 на процесс регенерации Hydra. 2-ААРА даже в максимальной концентрации, равной 1 мМ, не ингибировал регенерацию средних участков разделенного на три части тела гидры. Все обработанные H_2O_2 и необработанные средние части тела гидры в течение 3 дней успешно регенерировали как голову, так и подошву (рис. S7 в Приложении).

HvGrx1 защищал клетки человека от окислительного стресса и способствовал пролиферации и миграции клеток. Поскольку HvGrx1 демонстрирует высокое сходство с Grx позвоночных, было изучено влияние HvGrx1 на пролиферацию клеток, их способность к образованию колоний и к миграции в клетках НСТ116 человека. Мы индуцировали сверх-

экспрессию HvGrx1 в клетках НСТ116 и исследовали жизнеспособность клеток после обработки H_2O_2 с помощью МТТ-анализа, а пролиферацию клеток – с помощью анализа образования колоний. HvGrx1 защищал клетки от окислительного стресса, вызванного H_2O_2 . Клетки со сверхэкспрессией HvGrx1 были на 25% более жизнеспособными по сравнению с контрольными клетками после обработки H_2O_2 (рис. 4, *a*).

HvGrx1 способствовал пролиферации клеток, о чем свидетельствовал больший размер колоний, формируемых клетками, трансфицированными геном HvGrx1 (рис. 4, *b* и *c*). HvGrx1 также усиливал миграцию клеток НСТ116. Как показано на рис. 4, *d*, площадь заживления в монослое клеток была значительно уменьшена в

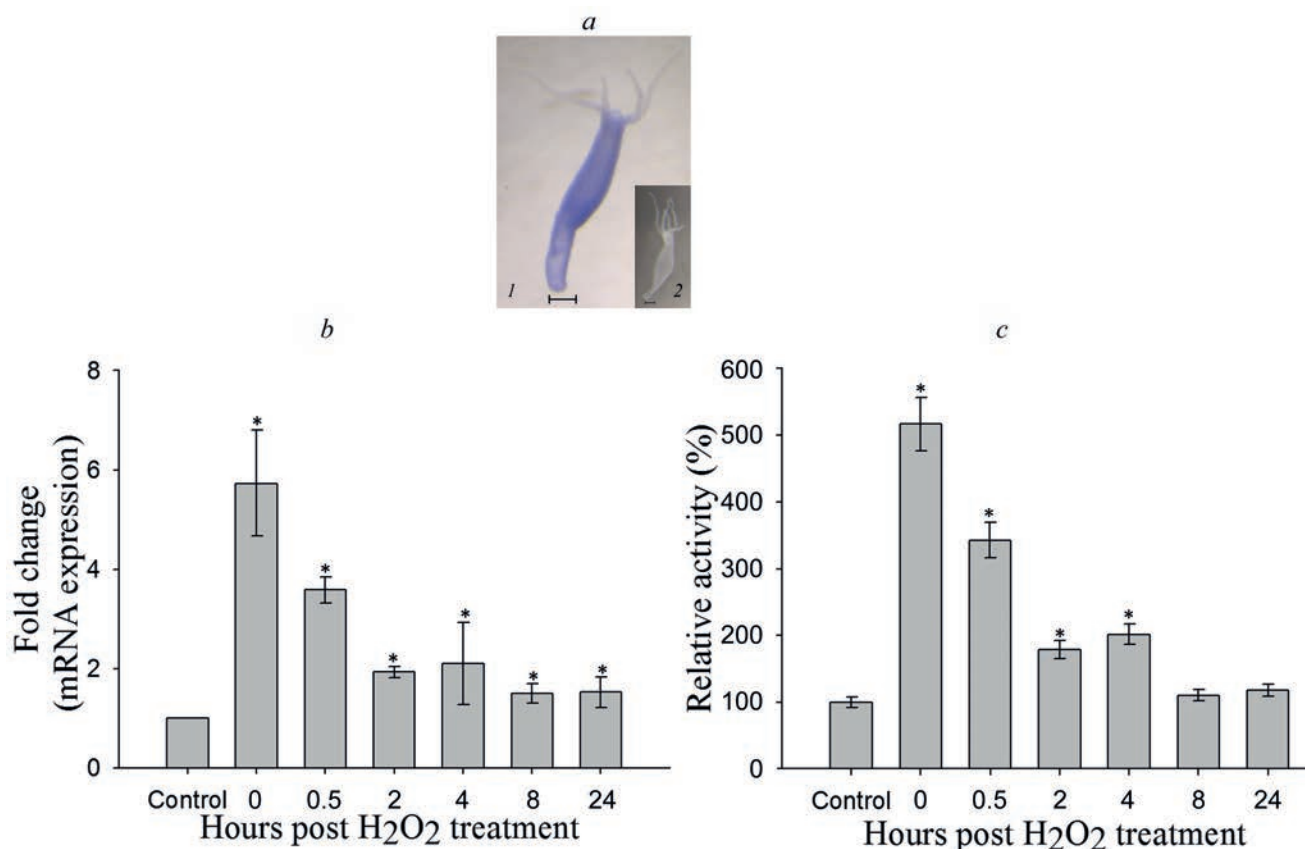


Рис. 3. *a* – Локализация транскриптов гена *HvGrx1* в гидре методом ISH с использованием меченных DIG рибозондов: смысловой зонд (1) и антисмысловой зонд (2). Изображения были получены на стереомикроскопе Zeiss; масштабная линейка – 200 мкм. Экспрессия *HvGrx1* (*b*) и его активность (*c*) в целой гидре после воздействия H₂O₂. Каждый эксперимент был проведен как минимум в трех независимых повторях. Полученные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SE (* $p < 0,05$ в сравнении с контролем)

клетках, повышенно экспрессирующих *HvGrx1*, и эти клетки мигрировали в 4 раза быстрее по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, *e*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Во всех организмах окислительно-восстановительный (редокс) гомеостаз поддерживается ферментативными и неферментативными системами антиоксидантной защиты, которые противодействуют возникновению избыточных количеств АФК [15]. В число этих защитных систем входят глутаредоксины (Grx) – небольшие, содержащие дисульфидные связи, редокс-белки, участвующие в многочисленных жизненно важных процессах, происходящих в клетках. Были идентифицированы две изоформы Grx, дитиольная и монотиольная, которые содержат каталитический мотив CXXC или CXXS соответственно в высококонсервативном участке [37]. Grx используют GSH в качестве восстанавливающего агента и играют важную роль в защите клеток от окислительных повреждений. Помимо окислительно-вос-

становительного гомеостаза, Grx контролируют многие физиологические процессы, такие как иммунный ответ, процесс формирования нейронов, развитие сердца, апоптоз и т.д. [20, 38].

Мы впервые идентифицировали, клонировали и охарактеризовали дитиольный Grx1 из *H. vulgaris* Ind-Pune. Клонированная последовательность содержала ORF размером 379 п.н., что соответствует 105 а.о. (предсказанная молекулярная масса *HvGrx1* составляет 11,87 кДа). Множественное выравнивание последовательности *HvGrx1* и дитиольных Grx других видов, а также анализ вторичной структуры, выполненный на сервере Consurf, выявили наличие характерного для белков Grx консервативного каталитического мотива CXXC с двумя остатками цистеина, ответственными за редокс-активность фермента. С помощью инструментов SignalP и TargetP-2.0 было предположено, что *HvGrx1* является цитоплазматическим белком, у которого отсутствует ассоциированная с митохондриями сигнальная последовательность. Grx2 *D. rerio*, имеющий наибольшее структурное сходство с *HvGrx1*, также является цитоплазматическим белком [39].

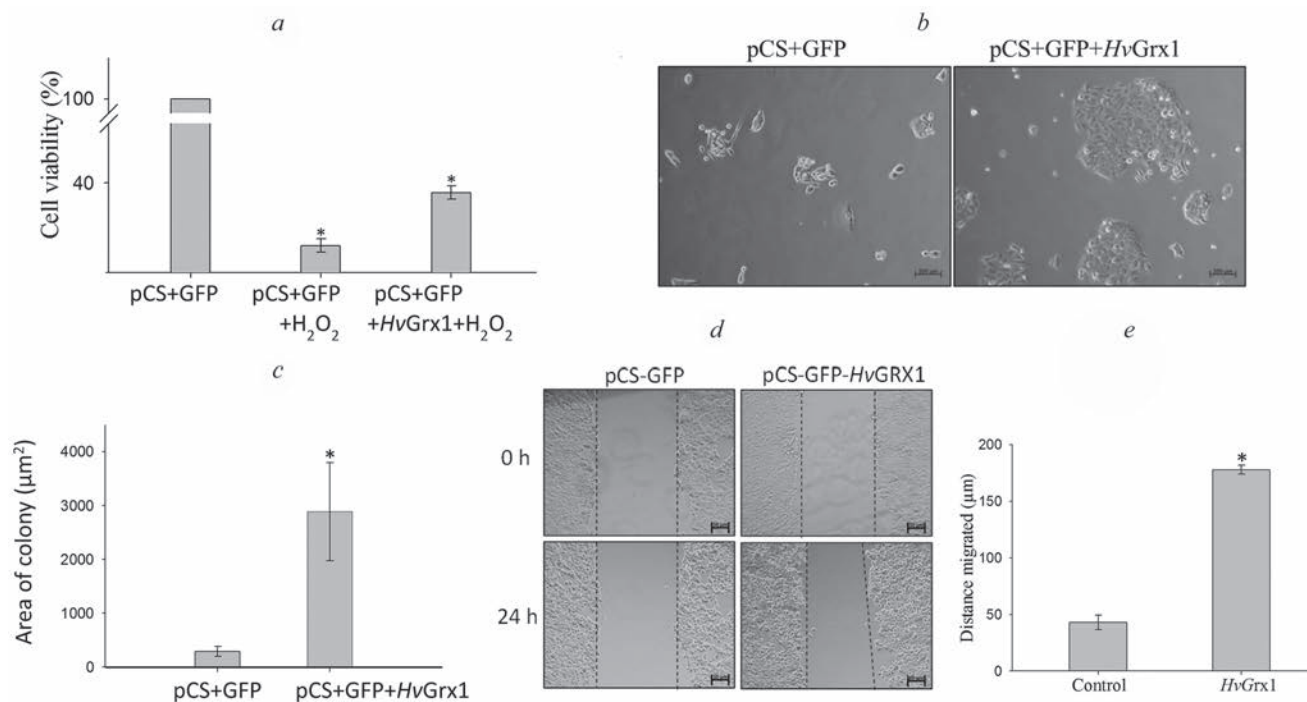


Рис. 4. *a* – Жизнеспособность контрольных клеток и клеток со сверхэкспрессией *HvGrx1* после обработки H₂O₂. *b* – Определение способности к формированию колоний. *c* – Площадь, занятая GFP-положительными колониями. *d* – Репрезентативные изображения клеток HCT116, трансфицированных геном *HvGrx1*, полученные при изучении миграции клеток. *e* – Расстояние, пройденное контрольными клетками и клетками со сверхэкспрессией *HvGrx1* через 12 ч. Каждый эксперимент был выполнен в трех независимых повторах. Результаты представлены в виде среднего значения ± SE (* $p < 0,05$ в сравнении с контролем)

Выравнивание последовательностей показало, что *HvGrx1* является дитиольным Grx с мотивом CPYC, расположенным в активном центре фермента. Аминокислотные остатки, расположенные между остатками цистеина дитиольного мотива (C27PYC30), высококонсервативны как у прокариот, так и у эукариот. Остатки цистеина Grx2 человека (C68 и C153) и Grx2 *D. rerio* (C64 и C149) участвуют через железосерный (2Fe-2S) кластер в образовании ферментативно неактивного димера Grx2 [40]. Отсутствие этих дополнительных остатков цистеина в *HvGrx1* позволяет предположить, что этот фермент не образует димеров. *HvGrx1* также содержит консервативную C-концевую последовательность, участвующую в связывании GSH, которая проявляет наибольшую гомологию с другими Grx. С помощью программы I-TASSER были предсказаны три GSH-связывающих сайта, которые содержат консервативные аминокислотные остатки F18, V20, K24, C27, Y29, Q59, T70, V71, P72, F75, I76, N77, R78, G83, G84, T85 и D86, предположительно участвующие во взаимодействии с GSH [41]. Мотив G-G, который был определен как характерный для Grx мотив [42], также был обнаружен в *HvGrx1* (G83-G84). Взаимодействуя с остатком треонина (T70)

в мотиве TVF и остатком тирозина (Y29) активного центра фермента, мотив G-G образует на поверхности белка бороздку для связывания GSH [42]. Анализ результатов множественного выравнивания аминокислотных последовательностей показал, что консервативный остаток валина (V19) в *HvGrx1* заменен на остаток изолейцина. Однако это не влияет на структуру белка из-за схожего строения и наличия гидрофобных боковых цепей у обеих аминокислот. Анализ филогенетического дерева и моделирование гомологии показали, что *HvGrx1* имеет наибольшую идентичность с Grx2 *D. rerio*, указывая на то, что *HvGrx1* эволюционно ближе к Grx высших позвоночных, а не к ферментам беспозвоночных или прокариот.

Очищенный *HvGrx1* имел кажущуюся молекулярную массу 12 кДа при электрофорезе в 10%-ном Tris-Tricine SDS-PAGE (как и предполагалось). Подобно Grxs, он эффективно восстанавливал HED. Было показано, что *HvGrx1* обладает высокой стабильностью в широком диапазоне pH и сохраняет 50% активности при 55 °C. Анализ кинетических параметров *HvGrx1* выявил высокое сродство этого белка к HED с $K_m = 0,57$ mM и $k_{кат} = 21,80$ с⁻¹. Значение K_m для *HvGrx1* оказалось ниже, чем у Grx из *Chlorella virus* (1,4–2,1 mM) [43],

Grx2 из *H. sapiens* (1,68 мМ) [44] и Grx из *Cryptococcus neoformans* (1,03 мМ) [45]. Это указывает на то, что HvGrx1 имеет более высокое сродство к HED. Некоторые Grx также могут снижать уровень инсулина и GSSG; однако нам не удалось обнаружить такую активность у HvGrx1.

Было обнаружено, что HvGrx1 из *Hydra* экспрессируется по всему телу, подобно Grx2 человека [44], Grx2 из *Hippocampus abdominalis* [33] и Grx1 из *Sebastes schlegelii* [22]. Известно, что многие гены антиоксидантов, в том числе ген, кодирующий Grx1, активируются транскрипционным фактором OxyR в ответ на действие H₂O₂ [46]. Действительно, мы обнаружили, что у *Hydra* сразу после воздействия H₂O₂ повышались экспрессия и активность HvGrx1. Мы также проверили влияние ингибирования активности Grx1 специфическим ингибитором, 2-ААРА, на процессы регенерации *Hydra*. Однако даже при самых высоких используемых концентрациях ингибитор не блокировал регенерацию. Возможно, *Hydra* содержит изоформы Grx, компенсирующие ингибирование активности Grx1.

Поскольку HvGrx1 показал структурное сходство с ферментами высших позвоночных, нам было любопытно выяснить, может ли HvGrx1 функционировать в клетках человека. Известно, что Grx усиливают пролиферацию клеток [47, 48]. Мы обнаружили, что гиперэкспрессия HvGrx1 действительно способствовала росту клеток НСТ116, о чем свидетельствуют более крупные колонии клеток. Это указывает на то, что HvGrx1 поддерживал пролиферацию клеток человека. Grx также защищают клетки от окислительных повреждений [49, 50]. HvGrx1 защищал клетки НСТ116 от действия перекисью водорода, обеспечивая лучшее, по сравнению с контрольными клетками, выживание после воздействия H₂O₂. Кроме того, известно, что Grx участвуют в миграции клеток. Так, нокдаун гена, кодирующего Grx3 в клетках OSCC человека, приводил к ингибированию миграции и инвазии клеток *in vitro*, тогда как сверхэкспрессия Grx2с в клетках HeLa значительно индуцировала клеточную подвижность и позволяла клеткам внедряться в модельный матрикс [51, 52]. В нашем исследовании HvGrx1 способствовал миграции клеток, что оценивалось в тесте на заживление ран. Все вышеприведенные данные ясно указывают на то, что HvGrx1 сохраняет свои функции в клетках человека, и это говорит о высокой эволюционной консервативности данного белка и на функциональном уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы клонировали, экспрессировали и охарактеризовали Grx1 *Hydra* (Cnidaria). Было показано, что HvGrx1 представляет собой однодоменный дитиольный Grx. Анализ белка *in silico* показал, что он эволюционно близок к глутаредоксинам высших позвоночных. HvGrx1 проявлял максимальную ферментативную активность при pH 8,0 и 25 °C и обладал очень высоким сродством к HED как к субстрату. Мы показали, что HvGrx1 повсеместно присутствует в теле *Hydra*; как его транскрипция, так и трансляция усиливались в ответ на обработку H₂O₂. Интересно, что HvGrx1 оказался функционален в клетках человека, и он поддерживал пролиферацию клеток и их миграцию, а также защищал клетки от окислительных повреждений. Полученные результаты показывают, что хотя *Hydra* является эволюционно древним простым беспозвоночным, HvGrx1 является высококонсервативным белком и близок к своим гомологам из высших позвоночных.

Вклад авторов. NP, SG и SSG являются авторами идеи исследования; NP, KP, GH, GB и SPM выполнили эксперименты и проанализировали результаты; NP и SSG написали манускрипт; NP, KP, GH, SPM, SG и SSG рассмотрели окончательный вариант статьи; SSG руководил исследованием.

Финансирование. SSG выражает искреннюю признательность Департаменту науки и технологий по содействию университетским исследованиям и научному совершенству (DST-PURSE), правительству Индии [F-5-2/2005(SAP-II)], Комиссии по университетским грантам и Центру перспективных исследований (UGC-CAS) (грант № GOI-A-670 предоставлен Департаменту зоологии), Университету Савитрибай Фуле Пуна (SPPU) за финансовую поддержку. NP и SPM выражают признательность Программе наставничества по инновационным исследованиям (ASPIRE) SPPU.

Благодарности. Авторы благодарят д-ра Шекхара Манде (Национальный центр клеточных наук, Пуна) и г-жу Сапну Суганди за их помощь и советы по очистке белков. NP, KP и GB признают финансовую поддержку в виде стипендий от Совета по научным и промышленным исследованиям (CSIR), Нью-Дели. SG является почетным ученым Совета по научным и промышленным исследованиям (CSIR), Нью-Дели.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 88, вып. 5, 2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Martínez, D. E., Iñiguez, A. R., Percell, K. M., Willner, J. B., Signorovitch, J., and Campbell, R. D. (2010) Phylogeny and biogeography of *Hydra* (Cnidaria: Hydridae) using mitochondrial and nuclear DNA sequences, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **57**, 403-410, doi: 10.1016/j.ympev.2010.06.016.
- Bosch, T. C., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., and Khalturin, K. (2010) The *Hydra* polyp: nothing but an active stem cell community, *Dev. Growth Differ.*, **52**, 15-25, doi: 10.1111/j.1440-169X.2009.01143.x.
- Schaible, R., Sussman, M., and Kramer, B. H. (2014) Aging and potential for self-renewal: hydra living in the age of aging – a mini-review, *Gerontology*, **60**, w548-556, doi: 10.1159/000360397.
- Martínez, D. E. (1998) Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra, *Exp. Gerontol.*, **33**, 217-225, doi: 10.1016/s0531-5565(97)00113-7.
- Martínez, D. E., and Bridge, D. (2012) *Hydra*, the everlasting embryo, confronts aging, *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, 479-487, doi: 10.1387/ijdb.113461dm.
- Hemmrich, G., Khalturin, K., Boehm, A.-M., Puchert, M., Anton-Erxleben, F., Wittlieb, J., Klostermeier, U. C., Rosenstiel, P., Oberg, H.-H., Domazet-Lošo, T., Sugimoto, T., Niwa, H., and Bosch, T. C. G. (2012) Molecular signatures of the three stem cell lineages in hydra and the emergence of stem cell function at the base of multicellularity, *Mol. Biol. Evol.*, **29**, 3267-3280, doi: 10.1093/molbev/mss134.
- Boehm, A. M., Khalturin, K., Anton-Erxleben, F., Hemmrich, G., Klostermeier, U. C., Lopez-Quintero, J. A., Oberg, H. H., Puchert, M., Rosenstiel, P., Wittlieb, J., and Bosch, T. C. (2012) FoxO is a critical regulator of stem cell maintenance in immortal *Hydra*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19697-19702, doi: 10.1073/pnas.1209714109.
- Klotz, L. O., Sánchez-Ramos, C., Prieto-Arroyo, I., Urbánek, P., Steinbrenner, H., and Monsalve, M. (2015) Redox regulation of FoxO transcription factors, *Redox Biol.*, **6**, 51-72, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.019.
- Dash, B., Metz, R., Huebner, H. J., Porter, W., and Phillips, T. D. (2006) Molecular characterization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **381**, 1-12, doi: 10.1016/j.gene.2006.04.026.
- Dash, B., Metz, R., Huebner, H. J., Porter, W., and Phillips, T. D. (2007) Molecular characterization of two superoxide dismutases from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **387**, 93-108, doi: 10.1016/j.gene.2006.08.020.
- Dash, B., and Phillips, T. D. (2012) Molecular characterization of a catalase from *Hydra vulgaris*, *Gene*, **501**, 144-152, doi: 10.1016/j.gene.2012.04.015.
- Perween, N., Pekhale, K., Haval, G., Mittal, S., Ghaskadbi, S., and Ghaskadbi, S. S. (2022) Cloning and characterization of Thioredoxin 1 from the Cnidarian *Hydra*, *J. Biochem.*, **171**, 41-51, doi: 10.1093/jb/mvab092.
- Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2005) Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1375-1377, doi: 10.1042/bst20051375.
- Wells, W. W., Xu, D. P., Yang, Y. F., and Rocque, P. A. (1990) Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15361-15364, doi: 10.1016/S0021-9258(18)55401-6.
- Lillig, C. H., Berndt, C., and Holmgren, A. (2008) Glutaredoxin systems, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1304-1317, doi: 10.1016/j.bbagen.2008.06.003.
- Couturier, J., Jacquot, J. P., and Rouhier, N. (2013) Toward a refined classification of class I dithiol glutaredoxins from poplar: biochemical basis for the definition of two subclasses, *Front. Plant Sci.*, **4**, 518, doi: 10.3389/fpls.2013.00518.
- Keselman, A., Pulak, R. N., Moyal, K., and Isakov, N. (2011) PICOT: A multidomain protein with multiple functions, *ISRN Immunol.*, **2011**, 426095, doi: 10.5402/2011/426095.
- Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M. A. (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions, *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1518-1530, doi: 10.1007/s00018-007-6554-8.
- Bräutigam, L., Jensen, L. D., Poschmann, G., Nyström, S., Bannenberg, S., Dreij, K., Lepka, K., Prozorovski, T., Montano, S. J., Aktas, O., Uhlén, P., Stühler, K., Cao, Y., Holmgren, A., and Berndt, C. (2013) Glutaredoxin regulates vascular development by reversible glutathionylation of sirtuin 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 20057-20062, doi: 10.1073/pnas.1313753110.
- Fernandes, A. P., and Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup sys-

- tem, *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 63-74, doi: 10.1089/152308604771978354.
21. Jeong, D., Kim, J. M., Cha, H., Oh, J. G., Park, J., Yun, S. H., Ju, E. S., Jeon, E. S., Hajjar, R. J., and Park, W. J. (2008) PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling, *Circ. Res.*, **102**, 711-719, doi: 10.1161/circresaha.107.165985.
 22. Madusanka, R. K., Tharuka, M. D. N., Liyanage, D. S., Sirisena, D., and Lee, J. (2020) Role of rockfish (*Sebastes schlegelii*) glutaredoxin 1 in innate immunity, and alleviation of cellular oxidative stress: Insights into localization, molecular characteristics, transcription, and function, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **243-244**, 110432, doi: 10.1016/j.cbpb.2020.110432.
 23. Wang, J., Boja, E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieyal, J. J., and Chock, P. B. (2001) Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells, *J. Biol. Chem.*, **276**, 47763-47766, doi: 10.1074/jbc.C100415200.
 24. Reddy, P. C., Barve, A., and Ghaskadbi, S. (2011) Description and phylogenetic characterization of common hydra from India, *Curr. Sci.*, **101**, 736-738.
 25. Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S., and Madden, T. L. (2008) NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Res.*, **36**, W5-W9, doi: 10.1093/nar/gkn201.
 26. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**, 1547-1549, doi: 10.1093/molbev/msy096.
 27. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0, *J. Mol. Biol.*, **340**, 783-795, doi: 10.1016/j.jmb.2004.05.028.
 28. Almagro Armenteros, J. J., Salvatore, M., Emanuelsson, O., Winther, O., von Heijne, G., Eloffsson, A., and Nielsen, H. (2019) Detecting sequence signals in targeting peptides using deep learning, *Life Sci. Alliance*, **2**, e201900429, doi: 10.26508/lsa.201900429.
 29. Rzhetsky, A., and Nei, M. (1993) Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference, *Mol. Biol. Evol.*, **10**, 1073-1095, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040056.
 30. Kruger, N. J. (2009) The Bradford method for protein quantitation, in *The Protein Protocols Handbook*, pp. 17-24.
 31. Holmgren, A., and Aslund, F. (1995) Glutaredoxin, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, pp. 283-292.
 32. Sadhu, S. S., Callegari, E., Zhao, Y., Guan, X., and Seefeldt, T. (2013) Evaluation of a dithiocarbamate derivative as an inhibitor of human glutaredoxin-1, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **28**, 456-462, doi: 10.3109/14756366.2011.649267.
 33. Omeka, W. K. M., Liyanage, D. S., Yang, H., and Lee, J. (2019) Glutaredoxin 2 from big belly seahorse (*Hippocampus abdominalis*) and its potential involvement in cellular redox homeostasis and host immune responses, *Fish Shellfish Immunol.*, **95**, 411-421, doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.071.
 34. Ken, C. F., Chen, I. J., Lin, C. T., Liu, S. M., Wen, L., and Lin, C. T. (2011) Monothiol glutaredoxin cDNA from *Taiwanofungus camphorata*: a novel CGFS-type glutaredoxin possessing glutathione reductase activity, *J. Agric. Food Chem.*, **59**, 3828-3835, doi: 10.1021/jf1048113.
 35. Martinez, D. E., Dirksen, M. L., Bode, P. M., Jamrich, M., Steele, R. E., and Bode, H. R. (1997) Budhead, a fork head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in hydra, *Dev. Biol.*, **192**, 523-536, doi: 10.1006/dbio.1997.8715.
 36. Gupta, A., Sripa, B., and Tripathi, T. (2017) Purification and characterization of two-domain glutaredoxin in the parasitic helminth *Fasciola gigantica*, *Parasitol. Int.*, **66**, 432-435, doi: 10.1016/j.parint.2016.05.005.
 37. Ströher, E., and Millar, A. H. (2012) The biological roles of glutaredoxins, *Biochem. J.*, **446**, 333-348, doi: 10.1042/bj20112131.
 38. Arnér, E. S., and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6102-6109, doi: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.
 39. Berndt, C., Poschmann, G., Stühler, K., Holmgren, A., and Bräutigam, L. (2014) Zebrafish heart development is regulated via glutaredoxin 2 dependent migration and survival of neural crest cells, *Redox Biol.*, **2**, 673-678, doi: 10.1016/j.redox.2014.04.012.
 40. Hashemy, S. I., Johansson, C., Berndt, C., Lillig, C. H., and Holmgren, A. (2007) Oxidation and S-nitrosylation of cysteines in human cytosolic and mitochondrial glutaredoxins: effects on structure and activity, *J. Biol. Chem.*, **282**, 14428-14436, doi: 10.1074/jbc.M700927200.
 41. Lundberg, M., Johansson, C., Chandra, J., Enoksson, M., Jacobsson, G., Ljung, J., Johansson, M., and Holmgren, A. (2001) Cloning and expression of a novel human glutaredoxin (Grx2) with mitochondrial and nuclear isoforms, *J. Biol. Chem.*, **276**, 26269-26275, doi: 10.1074/jbc.M011605200.
 42. Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., and Krauth-Siegel, R. L. (2010) The dithiol glutaredoxins of african trypanosomes have distinct roles and are closely linked to the unique trypanothione metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 35224-35237, doi: 10.1074/jbc.M110.165860.
 43. Fitzgerald, L. A., Zhang, Y., Lewis, G., and Van Etten, J. L. (2009) Characterization of a monothiol glutaredoxin encoded by *Chlorella virus* PBCV-1, *Virus Genes*, **39**, 418-426, doi: 10.1007/s11262-009-0392-8.
 44. Gallogly, M. M., Starke, D. W., Leonberg, A. K., Ospina, S. M., and Mieyal, J. J. (2008) Kinetic and mechanistic characterization and versatile catalytic properties of mammalian glutaredoxin 2: implications for intracellular roles, *Biochemistry*, **47**, 11144-11157, doi: 10.1021/bi800966v.

45. Sa, J. H., Kim, K., and Lim, C. J. (1997) Purification and characterization of glutaredoxin from *Cryptococcus neoformans*, *Mol. Cells*, **7**, 655-660.
46. Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., and Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6161-6165, doi: 10.1073/pnas.96.11.6161.
47. Löfgren, S., Fernando, M. R., Xing, K. Y., Wang, Y., Kuszynski, C. A., Ho, Y. S., and Lou, M. F. (2008) Effect of thioltransferase (glutaredoxin) deletion on cellular sensitivity to oxidative stress and cell proliferation in lens epithelial cells of thioltransferase knockout mouse, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 4497-4505, doi: 10.1167/iovs.07-1404.
48. Mollbrink, A., Jawad, R., Vlamis-Gardikas, A., Edenvik, P., Isaksson, B., Danielsson, O., Stål, P., and Fernandes, A. P. (2014) Expression of thioredoxins and glutaredoxins in human hepatocellular carcinoma: correlation to cell proliferation, tumor size and metabolic syndrome, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **27**, 169-183, doi: 10.1177/039463201402700204.
49. Liu, X., Jann, J., Xavier, C., and Wu, H. (2015) Glutaredoxin 1 (Grx1) protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative damage by preventing AKT glutathionylation, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **56**, 2821-2832, doi: 10.1167/iovs.14-15876.
50. Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I. W., and Grant, C. M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species, *Mol. Biol. Cell*, **9**, 1081-1091, doi: 10.1091/mbc.9.5.1081.
51. Gellert, M., Richter, E., Mostertz, J., Kantz, L., Masur, K., Hanschmann, E. M., Ribback, S., Kroeger, N., Schaeffeler, E., Winter, S., Hochgräfe, F., Schwab, M., and Lillig, C. H. (2020) The cytosolic isoform of glutaredoxin 2 promotes cell migration and invasion, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1864**, 129599, doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129599.
52. Li, B., Chen, M., Lu, M., Xin-Xiang, J., Meng-Xiong, P., and Jun-Wu, M. (2018) Glutaredoxin 3 promotes migration and invasion via the Notch signalling pathway in oral squamous cell carcinoma, *Free Radic. Res.*, **52**, 390-401, doi: 10.1080/10715762.2018.1435871.

GLUTAREDOXIN 1 FROM EVOLUTIONARY ANCIENT *Hydra*: CHARACTERISTICS OF THE ENZYME AND ITS POSSIBLE FUNCTIONS IN CELL

N. Perween^{1,2}, K. Pekhale¹, G. Haval^{1,3}, G. S. Bose⁴,
S. P. K. Mittal⁴, S. Ghaskadbi⁵, and S. S. Ghaskadbi^{1*}

¹ Department of Zoology, Savitribai Phule Pune University,
Pune 411007, India; e-mail: ssg@unipune.ac.in; sghaskadbi@gmail.com

² Department of Zoology, M. C. E. Society's Abeda Inamdar Senior College, Pune 411001, India

³ Department of Zoology, Abasaheb Garware College, Pune 411004, India

⁴ Department of Biotechnology, Savitribai Phule Pune University, Pune 411007, India

⁵ Developmental Biology Group, Agharkar Research Institute, Pune 411004, India

Glutaredoxin (Grx) is an antioxidant redox protein that uses glutathione (GSH) as an electron donor. Grx plays a crucial role in various cellular processes, such as antioxidant defense, control of cellular redox state, redox control of transcription, reversible S-glutathionylation of specific proteins, apoptosis, cell differentiation, etc. In the current study, we have isolated and characterized dithiol glutaredoxin from *Hydra vulgaris* Ind-Pune (HvGrx1). Sequence analysis showed that HvGrx1 belongs to the Grx family with the classical Grx motif (CPYC). Phylogenetic analysis and homology modeling revealed that HvGrx1 is closely related to Grx2 from zebrafish. HvGrx1 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* cells; the purified protein had a molecular weight of 11.82 kDa. HvGrx1 efficiently reduced β -hydroxyethyl disulfide (HED) with the temperature optimum of 25°C and pH optimum 8.0. HvGrx1 was ubiquitously expressed in all body parts of *Hydra*. Expression of HvGrx1 mRNA and enzymatic activity of HvGrx1 were significantly upregulated post H₂O₂ treatment. When expressed in human cells, HvGrx1 protected the cells from oxidative stress and enhanced cell proliferation and migration. Although *Hydra* is a simple invertebrate, HvGrx1 is evolutionary closer to its homologs from higher vertebrates (similar to many other *Hydra* proteins).

Keywords: glutaredoxin, *Hydra*, redox

ОБНАРУЖЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ РНК-МИШЕНЕЙ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИМЕРИЗАЦИИ

© 2023 А.Р. Сахабутдинова, А.В. Чемерис, Р.Р. Гарафутдинов*

Институт биохимии и генетики

*Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук,
450054 Уфа, Башкортостан, Россия; электронная почта: garafutdinovr@gmail.com*

Поступила в редакцию 22.11.2022

После доработки 26.02.2023

Принята к публикации 09.03.2023

Обнаружение специфических РНК-мишеней с помощью методов, основанных на амплификации, широко используется в фундаментальных исследованиях и медицине ввиду высокой значимости роли, которую молекулы РНК играют при реализации генетической информации и развитии заболеваний. В данной работе описан подход к обнаружению РНК-мишеней, в основе которого лежит особый вид изотермической амплификации – реакция мультимеризации нуклеиновых кислот. Предлагаемый метод требует использования только одного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей активностями обратной транскриптазы и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы, а также цепь-вытесняющей активностью. Определены условия реакции, обеспечивающие эффективную детекцию целевых РНК. Подход был апробирован на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2, взятом в качестве модельной мишени. Реакция мультимеризации позволила с высокой достоверностью дифференцировать SARS-CoV-2-положительные и SARS-CoV-2-отрицательные образцы. Предлагаемый способ позволяет обнаруживать РНК даже в образцах, подвергшихся многократному замораживанию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибонуклеиновые кислоты (РНК), коронавирус SARS-CoV-2, молекулярная диагностика, изотермическая амплификация, мультимеризация, сближенные праймеры.

DOI: 10.31857/S032097252305010X, **EDN:** AYYVQY

ВВЕДЕНИЕ

Амплификационно-опосредованный анализ РНК проводится при изучении экспрессии генов и некодирующих РНК [1], а также при обнаружении вирусных патогенов [2]. В 2020 г. РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 вызвал пандемию COVID-19, что актуализировало необходимость постоянного мониторинга эпидемиологической ситуации по особо опасным возбудителям [3]. В начале пандемии COVID-19 проблема «пропущенных» и бессимптомных пациентов высветила недостатки широко используемых методов амплификации и выявила потребность в разработке новых, более быстрых, чувствительных и недорогих способов обнаружения патогенов [3, 4]. Хотя ПЦР остаётся «золотым стандартом» и наиболее популярным методом молекулярной диа-

гностики инфекционных заболеваний, необходимость надёжного обнаружения SARS-CoV-2 привела к разработке подходов, основанных на микрофлюидных и биосенсорных технологиях, инструментах геномного редактирования (CRISPR/Cas) и др. [5–7].

Значительный прогресс был достигнут в развитии изотермических методов детекции специфических РНК [8–10], включая подходы, не требующие стадии обратной транскрипции (например, гибридационная цепная реакция, дезоксирибозимное расщепление, лигирование на РНК-мишени с последующей амплификацией «катящимся кольцом» и др.) [11–13]. В целом, изотермические методы являются отличной альтернативой ПЦР, не требуют дорогостоящего оборудования для термоциклирования и применимы для анализа различных биомолекул [13, 14]. Одним из перспективных видов изотермической амплификации является реакция мультимеризации (ММ) [15]. Было показано, что ММ может использоваться для определения РНК-мишеней [16]. Механизм [17, 18] и факторы, влияющие на ход

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреит; ММ – мультимеризация; НК – нуклеиновые кислоты; Tt – пороговое время.

* Адресат для корреспонденции.

этой реакции [19–22], были подробно изучены. Так, согласно работе Wang et al. [17], ММ начинается после образования псевдоциклических ДНК-структур за счёт частичной денатурации ампликонов («дыхания ДНК») с последующим загибанием свободных 3'-концевых участков цепей и их отжигом на противоположных частях ДНК-дуплекса. Было показано, что стабилизация псевдоциклических ДНК-структур происходит благодаря ионному взаимодействию фосфатных групп синтезируемых цепей ДНК с поверхностными аминогруппами (лизина и аргинина) полимеразы [18]. ММ эффективно протекает только при определённых условиях [19] и приводит к продуктам, представляющим собой тандемные нуклеотидные повторы, проявляющиеся в виде лестницы на электрофоретических гелях.

Как и в случае ПЦР, обнаружение специфической РНК с помощью изотермических методов требует использования РНК-зависимых ДНК-полимераз (обратных транскриптаз) для синтеза комплементарной ДНК (кДНК). Кроме того, из-за низкой стабильности молекул РНК работа с РНК-содержащими образцами требует соблюдения строгих правил. В случае с SARS-CoV-2 эти проблемы часто приводили к получению недостоверных результатов [23–25]. Обнаружение РНК с помощью изотермической амплификации с использованием ДНК-полимеразы Bst может упростить анализ и повысить его надёжность; обратнотранскриптазная активность ДНК-полимеразы Bst [26] делает её пригодной для прямого обнаружения РНК.

Целью данной работы стала демонстрация применимости мультимеризации, представляющей собой новый тип изотермической амплификации, для прямого обнаружения специфической РНК на примере РНК коронавируса SARS-CoV-2 как модельной мишени.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные реагенты. ДНК-полимераза Bst 2.0 и изотермический буфер («New England Biolabs», США), дезоксинуклеотиды (дНТФ) («Биолабмикс», Россия), интеркалирующий краситель dsGreen («Lumiprobe», Россия), дитиотреит (ДТТ), персульфат аммония, акриламид, Tris, N,N'-метиленбисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, натриевая соль N,N,N',N'-этилендиаминтетрауксусной кислоты («Sigma», США). Все растворы готовили с использованием воды высшей категории качества (> 18 МОм, «Millipore», США).

Нуклеиновые кислоты (НК). Генетический материал коронавируса SARS-CoV-2 был получен из носоглоточных мазков больных COVID-19 (N = 60) с использованием набора М-Сорб-ООМ-96 («Синтол», Россия). Диагноз COVID-19 был подтверждён методом ОТ-ПЦР с использованием набора ОТ-ПЦР-SARS-CoV-2 («Синтол»). В качестве контроля использовались лизаты носоглоточных мазков, для которых были получены сомнительные (N = 50) или отрицательные (N = 50) результаты ПЦР-тестирования на SARS-CoV-2, а также мазков от здоровых индивидов (N = 25).

Олигонуклеотиды, использованные в работе

Ген	Название	Последовательность, 5'→3'	Длина, нт
S	F-S1	GTTATCAGACTCAGACTAATTCTCCTC	27
	R-S1	TTGACTAGCTACACTACGTGCCC	23
	F-S2	G TCACAGACTCAGACTAATTCTCCTC*	26
	R-S2	T GACTGACTAGCTACACTACGTGCCC	26
	Qt	GTTaucagacucagacuaauucuccucggcgccgacguaguguagcuaguCAA**	53
N	F-N	T GACGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTC*	27
	R-N	G TCAAGGTGTGACTTCCATGCCAATG	23
ORF1a	F-O	T GACAAAAGTATTCTACACTCCAGGGAC	28
	R-O	G TCAAAATGACTCTTACCAGTACCAGGTG	27

* Жирным шрифтом выделены 5'-концевые нуклеотиды, не имеющие гомологии с нуклеотидной последовательностью SARS-CoV-2.

** Прописные буквы — дезоксирибонуклеотиды, строчные — рибонуклеотиды.

Путём смешивания по 20 соответствующих лизатов объёмом 30 мкл каждый из указанных групп были получены четыре типа образцов Rmix: Rmix(+) (SARS-CoV-2-положительные), Rmix(?) (SARS-CoV-2-сомнительные), Rmix(–) (SARS-CoV-2-отрицательные) и Rmix(H) (от здоровых индивидов). Rmix(+) был дополнительно разделён на 5 алиquot, которые подвергались 2-, 5-, 10- или 20-кратному замораживанию при -20°C и последующему оттаиванию. В результате были получены образцы Rmix0 (без замораживания), Rmix2, Rmix5, Rmix10 и Rmix20 соответственно.

Олигонуклеотиды. Олигонуклеотидные праймеры и искусственная РНК-мишень Qt (таблица) были сконструированы с помощью онлайн-утилиты OligoAnalyzer («Integrated DNA Technologies», США) и приобретены в компании «Синтол». В качестве мишеней для амплификации были выбраны нуклеотидные последовательности генов *S*, *N* и *ORF1a* коронавируса SARS-CoV-2.

Реакция ММ. Все образцы для амплификации готовили в ПЦР-боксе UVC/T-M-AR («Biosan», Латвия). Рабочее пространство, дозаторы и пластиковую посуду предварительно облучали ультрафиолетом в течение 20 мин. Амплификацию проводили в ДНК-амплификаторе iQ5 («Bio-Rad Laboratories», США).

Реакционные смеси объёмом 20 мкл содержали по 5 пмоль каждого праймера, 0,25 мМ дНТФ, 1× изотермический буфер, 0,2× интеркалирующий краситель dsGreen, 10 мМ ДТТ, 3 ед. акт. ДНК-полимеразы Bst 2.0 и 1 мкл лизата носоглоточных мазков (или образца Rmix, или воды). Программа амплификации состояла из следующих этапов: 1) 70°C , 30 с; 2) 65°C , 60 с; 3) 60°C , 3 ч. В ряде случаев результаты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в приборе GelDoc XR («Bio-Rad Laboratories»).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Амплификация любой РНК начинается с синтеза её ДНК-копии (кДНК) в ходе реакции обратной транскрипции, которую обычно проводят до амплификации с помощью специального фермента (обратной транскриптазы) при относительно низкой температуре. Однако представляется удобным амплифицировать РНК без проведения отдельного этапа обратной транскрипции, т. е. с использованием одного фермента, обладающего как обратной транскриптазной, так и ДНК-полимеразной

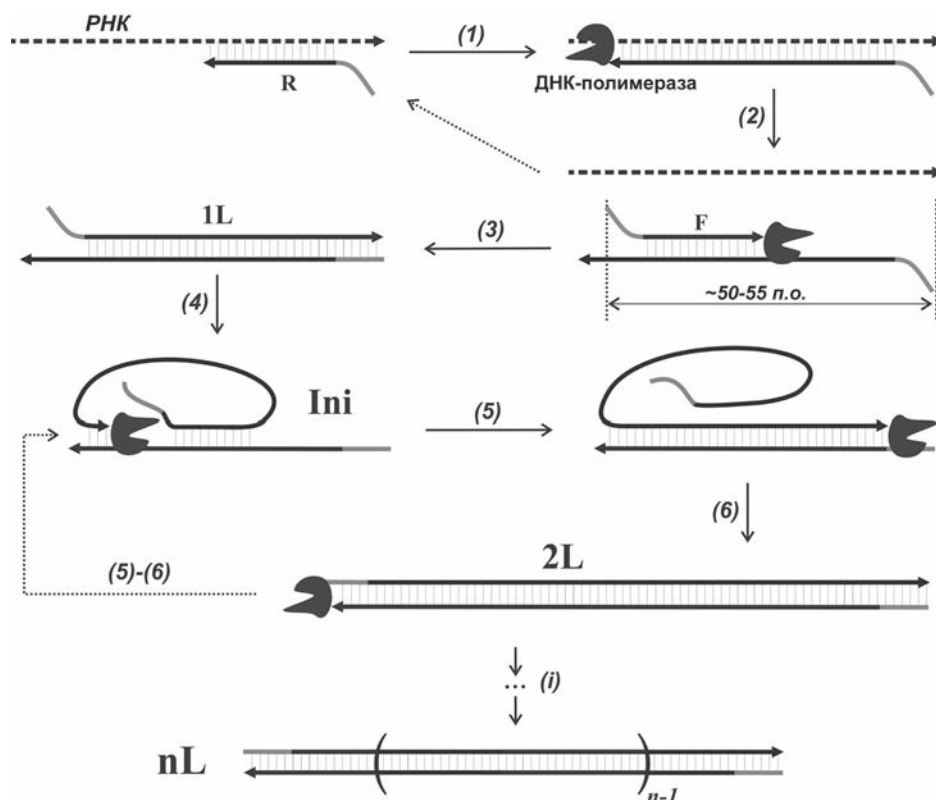


Рис. 1. Схема детекции РНК с помощью реакции мультимеризации. F и R – праймеры; Ini – инициаторный комплекс; L – длина мономерного участка (повтора) двуцепочечной ДНК; (1)–(i) – этапы реакции

активностью. Недавно было показано, что фермент Немо KlenTaq, который позиционируется как ДНК-зависимая ДНК-полимераза, обладает обратнo-транскриптазной активностью и обеспечивает успешную амплификацию РНК-мишеней [27]. Для проведения изотермической амплификации интерес может представлять большой фрагмент ДНК-полимеразы Bst (Bst exo-) из-за сильной цепь-вытесняющей активности, умеренной термостабильности и высокой процессивности. Обратнo-транскриптазная активность (проявляется вплоть до 72 °C) заявляется производителем только для ДНК-полимеразы Bst 3.0 (<https://neb.com/products/>), но, вероятно, такой активностью могут обладать все коммерчески доступные формы Bst exo- [26].

Однозначное протекание реакции мультимеризации при определённых условиях позволяет использовать её для обнаружения НК-мишеней [16]. Так, если сконструировать пару специфичных сближенных праймеров, предназначенных для обнаружения какой-либо одноцепочечной НК (например, РНК), можно ожидать успешного протекания амплификации посредством мультимеризации, как показано на рис. 1.

На первой стадии реакции один из праймеров (обозначен как R на рис. 1) отжигается на цепи РНК и удлиняется ДНК-полимеразой, обладающей обратнo-транскриптазной активностью, в результате чего образуется двуцепочечный ДНК/РНК-гетеродуплекс. Затем за счёт «дыхания» цепей появляется возможность отжига второго праймера (обозначенного как F) на синтезированной цепи кДНК, что приводит к ампликону размером 1L (этапы 2 и 3). Праймеры F и R имеют 5'-концевые последовательности, не гомологичные РНК-мишени, но комплементарные друг другу. Они способствуют повышению эффективности «дыхания» ДНК, облегчают образование инициаторного комплекса (Ini, шаг 4) и обеспечивают дальнейшее накопление мультимерных продуктов (шаги 5–i). Образование дуплексов длиной > 2L переводит реакцию в экспоненциальный режим за счёт увеличения числа мест отжига для обоих праймеров. Следует отметить, что молекулы РНК хорошо подходят для запуска ММ, поскольку являются одноцепочечными и обеспечивают лёгкий отжиг первого (R) праймера.

ММ начинается с образования Ini, однако вероятность данного события крайне мала. Представляется, что для начала ММ достаточно наличия любой двуцепочечной НК и праймеров для её амплификации. Ранее нами было показано, что накопление детектируемого количества продуктов ММ начинается

через 25–70 мин после начала реакции в зависимости от концентрации матрицы и условий реакции (в данном случае протекает «специфическая» ММ) [19]. В отсутствие матрицы и димеров праймеров (т.е. для качественных праймеров) продолжительность периода накопления таких продуктов составляет более 100 мин; в данном случае можно говорить о протекании «неспецифической» ММ. Также было показано, что наибольшая эффективность ММ наблюдается для ДНК-полимеразы Bst 2.0, ДНК-матриц длиной около 50 нт, при пониженной концентрации интеркалирующего красителя SYBR Green [19]. Стоит отметить, что 10 mM ДТТ заметно увеличивает эффективность ММ (собственные данные, не приведены).

Принимая во внимание механизм протекания ММ [17, 18], повышения эффективности данной реакции можно добиться с помощью праймеров с определённой структурой. Так, было показано, что праймеры с комплементарными 5'-концевыми мотивами ускоряют ММ [16]. В данной работе были сконструированы две модельные пары праймеров: обычная пара F-S1/R-S1 и праймеры с комплементарными четырехнуклеотидными 5'-концевыми участками (F-S2/R-S2). Влияние структуры праймеров на ММ оценивали с помощью искусственной РНК-матрицы Qt, содержащей по три дезоксирибонуклеотида на 5'- и 3'-концах соответственно, что обеспечивает более высокую устойчивость этой РНК к расщеплению рибонуклеазами. Праймеры F-S1/R-S1 обеспечивали более низкую эффективность ММ (пороговое время, Tt, составило около 70 мин) по сравнению с F-S2/R-S2 (Tt ~50 мин) (рис. 2, а, кривые 1 и 3 соответственно).

Оказалось, что ММ протекает быстрее с искусственной РНК (рис. 2, а, кривые 1 и 2, или 3 и 4). Вероятно, это связано с тем, что олигорибонуклеотид Qt имеет конечную длину, которая обеспечивает быстрое образование Ini и способствует более раннему началу ММ. Следует отметить, что по сравнению с ПЦР кривые мультимеризации демонстрируют меньшую сходимость в повторях (рис. 2, а, кривые 1, 2 и 4). Для ММ расхождение значений Tt несколько увеличивается с уменьшением числа копий мишени [16]. Это относительное отклонение от нелинейности объясняется особенностью реакции ММ. Как было сказано выше, начало ММ является случайным событием, и по мере уменьшения количества копий мишени требуется больше времени для запуска реакции, в результате чего возникает большая разница между повторами в скорости начала экспоненциальной стадии реакции.

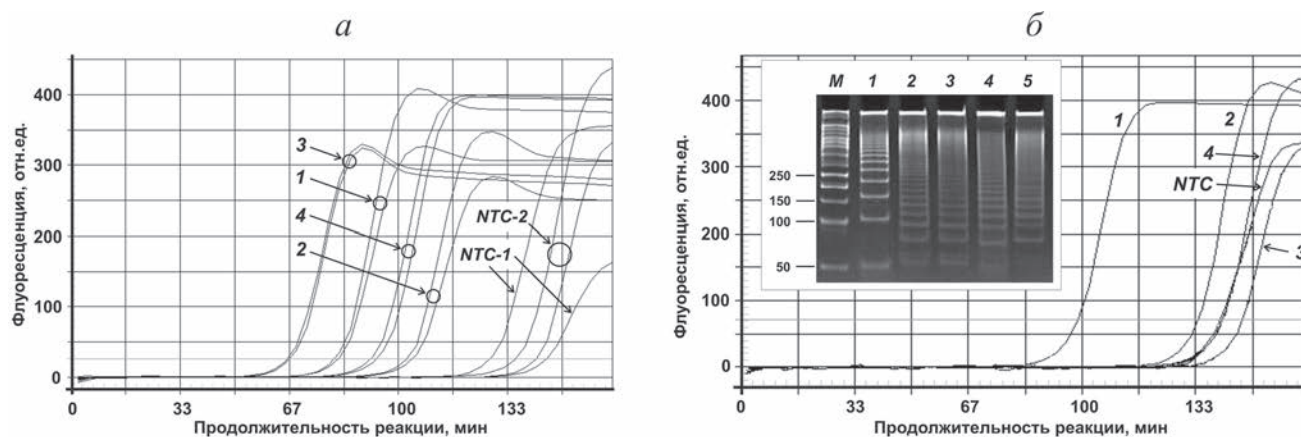


Рис. 2. Протекание реакции мультимеризации при использовании разных типов праймеров и РНК. *а* – Влияние структуры праймеров и типа РНК-мишени на скорость мультимеризации: 1 – пара праймеров F-S1/R-S1 и искусственная (Qt) РНК; 2 – F-S1/R-S1 и Rmix(+); 3 – пара праймеров F-S2/R-S2 и Qt; 4 – F-S2/R-S2 и Rmix(+); NTC-1 – отрицательный контроль для F-S1/R-S1; NTC-2 – отрицательный контроль для F-S2/R-S2. *б* – Кривые амплификации (данные для праймеров F-S2/R-S2; приведены только по одному из двух повторов): 1 – образец Rmix(+); 2 – Rmix(?); 3 – Rmix(-); 4 – Rmix(H); NTC – отрицательный контроль. Вставка – электрофоретический анализ образцов 1–4 (M – маркер длин фрагментов ДНК, дорожка 5 – образец NTC)

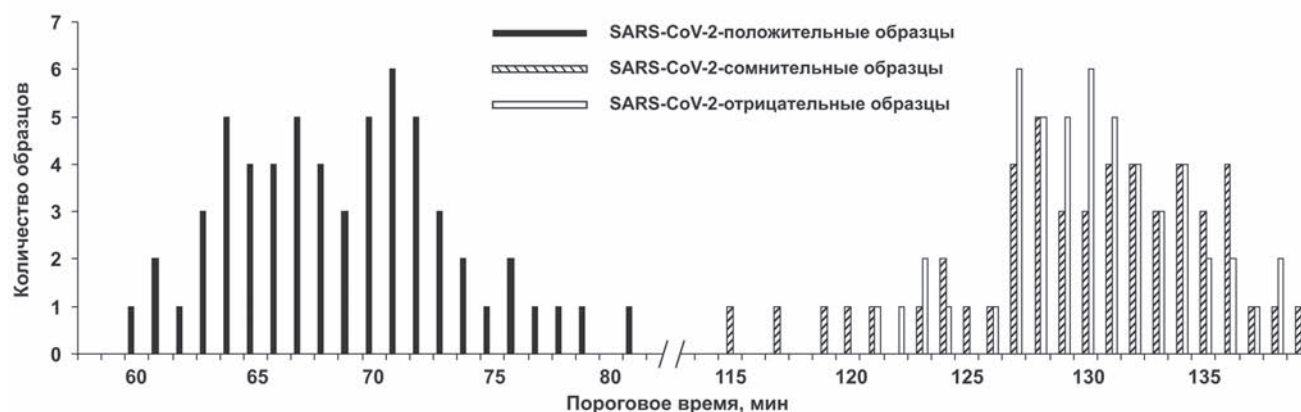


Рис. 3. Распределение значений Tt для SARS-CoV-2-положительных (N = 60), SARS-CoV-2-сомнительных (N = 50) и SARS-CoV-2-отрицательных образцов (N = 50) (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2)

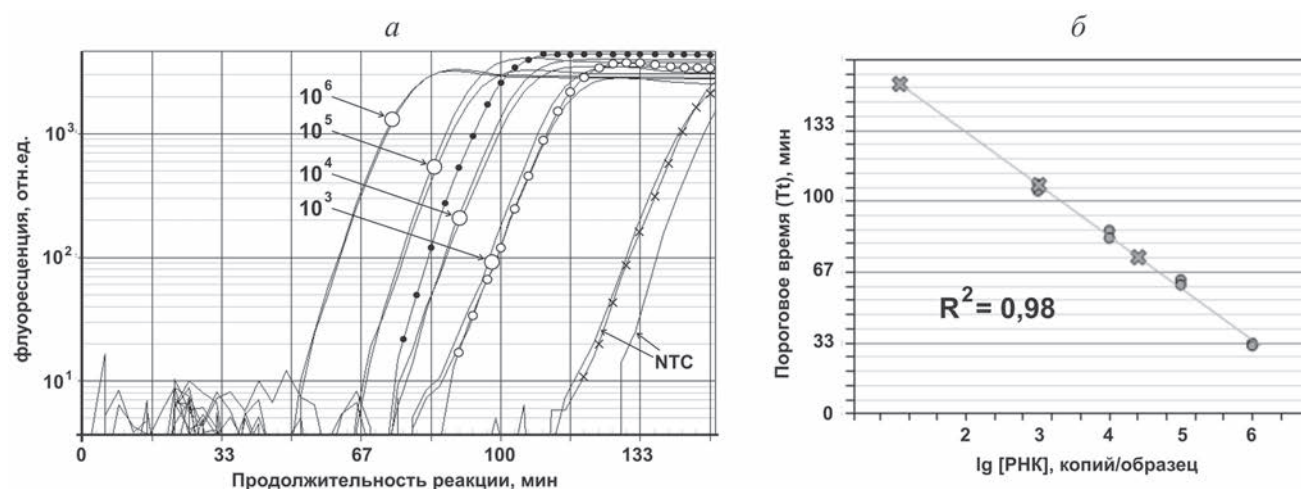


Рис. 4. Чувствительность обнаружения вирусной РНК с помощью ММ (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2). *а* – Пример количественного анализа РНК коронавируса SARS-CoV-2 (пара праймеров F1/R1, логарифмическая шкала): кривые амплификации для Rmix(+), Rmix(?) и Rmix(-) образцов и калибровочные образцы (сплошные линии), содержащие 10³–10⁶ копий мишени Qt. *б* – Калибровочный график (калибровочные образцы содержали 10³, 10⁴, 10⁵ и 10⁶ копий/мкл)

Таким образом, на основании ранее опубликованных и полученных в этой работе данных можно рекомендовать следующие способы повышения эффективности «специфической» ММ: 1) использование двух праймеров с комплементарными друг другу 5'-концами, 2) обеспечение образования праймерами первичного ампликона размером ~50–55 п.о., 3) использование ДНК-полимеразы Bst 2.0 и её буфера, добавление в реакционную смесь ДТТ (до 10 мМ) и уменьшенного количества интеркалирующего красителя, проведение реакции при ~60 °С.

Применимость ММ для обнаружения специфических РНК изучали на генетическом материале коронавируса SARS-CoV-2. Использовались установленные по результатам ПЦР-тестирования SARS-CoV-2-положительные, SARS-CoV-2-сомнительные, SARS-CoV-2-отрицательные образцы и образцы, полученные от здоровых индивидов. Для исключения влияния первичной структуры мишеней на эффективность ММ были сконструированы три пары праймеров для амплификации трёх разных генов коронавируса SARS-CoV-2. Все специфические пары праймеров содержали комплементарные 5'-мотивы. Эксперименты не показали влияния мишени на протекание ММ, поэтому далее приводятся результаты только для пары праймеров F-S2/R-S2.

При использовании препаратов группы Rmix было обнаружено, что амплификация происходит для всех образцов, как для SARS-CoV-2-положительных (Rmix(+)), так и для контролей (Rmix(?), Rmix(–) и Rmix(H)). Однако для Rmix(+) значения Tt находились в пределах 60–90 мин от начала реакции, в то время как для остальных превышали 110–120 мин (рис. 2, б). Для Rmix(+) электрофоретический анализ показал образование характерных мультимерных продуктов – ДНК с размерами, кратными ожидаемому (~55 п.н.). В остальных образцах также образовались мультимерные продукты, но их размер не соответствовал размеру первичного ампликона, что указывает на протекание неспецифической ММ (рис. 2, б).

Анализ данных, полученных при амплификации индивидуальных образцов (всего N = 160), показывает возможность дифференциации специфической и неспецифической ММ. Значения Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов находились в пределах 60–80 мин; в то же время для образцов из остальных групп значения Tt превышали 115 мин, что свидетельствует об отсутствии в них мишени (рис. 3).

Полученные значения Tt хорошо коррелируют со значениями порогового цикла Ct, найденными для этих же образцов после ПЦР-

тестирования (данные не представлены). Диапазоны значений Tt для SARS-CoV-2-положительных образцов и образцов, не содержащих РНК-мишень, не перекрывались, что позволяет различать эти типы образцов и с высокой достоверностью выявлять патогенную РНК. Таким образом, значение Tt ~110 мин можно считать порогом аналитической значимости (для использованных условий реакции).

Для оценки возможности количественного определения РНК коронавируса с помощью мультимеризации использовали Qt. Калибровочные образцы, содержавшие 10³–10⁶ копий Qt, получали последовательными 10-кратными разведениями стокового раствора. Следует отметить, что количество копий РНК-мишени в клинических образцах было неизвестно. Однако ранее сообщалось, что экстракты носоглоточных мазков COVID-19-положительных пациентов содержат в среднем около 10⁴–10⁵ копий мишени на 1 мкл раствора в зависимости от типа биоматериала, вирусной нагрузки, способа выделения РНК и метода её обнаружения [28–31]. Эксперименты позволили количественно определить содержание РНК коронавируса в образцах от SARS-CoV-2-положительных пациентов. Для большинства образцов число копий мишени находилось в диапазоне 10⁴–10⁵ (рис. 4, а).

В целом, полученные результаты хорошо коррелируют с данными ОТ-ПЦР, проводимой без специфических флуорогенных зондов [3, 4, 32–34], и обеспечивают чувствительность определения на уровне пикомолярных концентраций. Однако для образцов с очень низкой вирусной нагрузкой обнаружение мишени с помощью ММ можно считать полуколичественным из-за недостаточно высокой сходимости значений Tt в повторях (рис. 4, б).

Предлагаемый подход обладает рядом преимуществ благодаря использованию сближенных праймеров, позволяющих амплифицировать короткие НК, такие как разрушенная ДНК [35] или микроРНК [16], и обеспечивающих высокие уровни специфичности, чувствительности анализа и достоверности результата. Для молекул РНК деградация является более актуальной проблемой по сравнению с ДНК из-за их меньшей стабильности. В этом случае использование сближенных праймеров позволяет анализировать сохранившиеся относительно короткие фрагменты РНК, пригодные для амплификации. Кроме того, если ДНК-полимераза обладает слабой обратно-транскриптазной активностью, предпочтительна амплификация более коротких РНК-последовательностей. Для оценки применимости ММ для анализа разрушенной РНК были приготовлены

препараты РНК коронавируса путём многократного замораживания-оттаивания образца Rmix(+). Эксперименты в целом показали небольшое увеличение значений Tt с ростом количества циклов замораживания-оттаивания, что свидетельствует о снижении количества амплифицируемых РНК-мишеней (рис. 5).

Неожиданным оказалось то, что для образца Rmix2, подвергнутого двухкратному замораживанию, наблюдалось незначительное снижение значения Tt, что, вероятно, связано с увеличением эффективности ММ за счёт образования более коротких РНК-молекул. Увеличение количества циклов замораживания-оттаивания приводило к постепенному увеличению Tt, но даже для образца Rmix20 Tt не превысило 110 мин, что позволило с высокой достоверностью выявить целевую РНК. Таким образом, сближенное расположение праймеров позволяет обнаруживать разрушенную РНК и, соответственно, предъявлять более щадящие требования к транспортировке и хранению РНК-содержащих материалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что реакция мультимеризации может быть использована для обнаружения вирусной РНК. Эффективность и специфичность ММ может быть повышена за счёт специальной конструкции праймеров, содержащих комплементарные 5'-концевые мотивы, и использования определённых реакционных компонентов, а именно ДНК-полимеразы Bst 2.0, ДТТ и уменьшенного количества интеркалирующего красителя. Амплификация посредством ММ протекает в изотермических условиях и исключает добавление в реакционную смесь обычной обратной транскриптазы; необходим только один фермент с обратнотранскриптазной, ДНК-полимеразной и цепь-вытесняющей активностями. ММ позволяет с высокой достоверностью отличить РНК-положительные образцы от РНК-отрица-

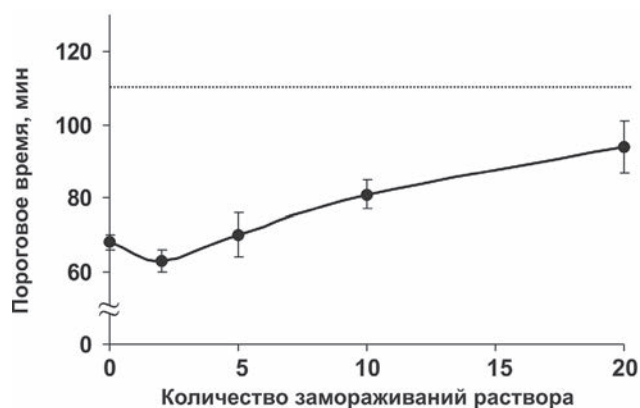


Рис. 5. Влияние многократного замораживания раствора Rmix(+) на скорость мультимеризации. Пунктирная линия при Tt = 110 мин соответствует порогу аналитической значимости (приведены данные для пары праймеров F-S2/R-S2)

тельных. Предлагаемый подход основан на использовании сближенных праймеров, которые обеспечивают эффективную амплификацию и выявление РНК-мишени даже в образцах, подвергшихся многократному замораживанию. Для образцов, содержащих низкое число копий мишени, анализ с помощью мультимеризации можно считать полуколичественным из-за меньшей сходимости значений Tt в повторях.

Вклад авторов. Сахабутдинова А.Р. — проведение экспериментов, написание статьи; Чемерис А.В. — обсуждение результатов, редактирование рукописи; Гарафутдинов Р.Р. — разработка концепции исследования, проведение экспериментов, редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00235).

Благодарности. Авторы выражают благодарность проф. Мавзютову А.Р. за любезно предоставленные образцы РНК коронавируса SARS-CoV-2.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Palazzo, A. F., and Lee, E. S. (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front. Genet.*, **6**, 2, doi: 10.3389/fgene.2015.00002.
- Bukarov, R., Dossym, D., and Filchakova, O. (2021) Detection of RNA viruses from influenza and HIV to Ebola and SARS-CoV-2: a review, *Anal. Methods*, **13**, 34–55, doi: 10.1039/d0ay01886d.
- Vindeirinho, J. M., Pinho, E., Azevedo, N. F., and Almeida, C. (2022) SARS-CoV-2 diagnostics based on nucleic acids amplification: from fundamental concepts to applications and beyond, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **12**, 799678, doi: 10.3389/fcimb.2022.799678.
- Verna, R., Alallon, W., Murakami, M., Hayward, C. P. M., Harrath, A. H., Alwasel, S. H., Sumita,

- N. M., Alatas, O., Fedeli, V., Sharma, P., Fuso, A., Capuano, D. M., Capalbo, M., Angeloni, A., and Bizzarri, M. (2021) Analytical performance of COVID-19 detection methods (RT-PCR): scientific and societal concerns, *Life (Basel)*, **11**, 660, doi: 10.3390/life11070660.
5. Thapa, S., Singh, K. R., Verma, R., Singh, J., and Singh, R. P. (2022) State-of-the-art smart and intelligent nanobiosensors for SARS-CoV-2 diagnosis, *Biosensors (Basel)*, **12**, 637, doi: 10.3390/bios12080637.
6. Yin, B., Wan, X., Sohan, A. S. M. M. F., and Lin, X. (2022) Microfluidics-based POCT for SARS-CoV-2 diagnostics, *Micromachines (Basel)*, **13**, 1238, doi: 10.3390/mi13081238.
7. Zhang, L., Jiang, H., Zhu, Z., Liu, J., and Li, B. (2022) Integrating CRISPR/Cas within isothermal amplification for point-of-care assay of nucleic acid, *Talanta*, **243**, 123388, doi: 10.1016/j.talanta.2022.123388.
8. Islam, M. M., and Koirala, D. (2022) Toward a next-generation diagnostic tool: a review on emerging isothermal nucleic acid amplification techniques for the detection of SARS-CoV-2 and other infectious viruses, *Anal. Chim. Acta*, **1209**, 339338, doi: 10.1016/j.aca.2021.339338.
9. Maiti, B., Anupama, K. P., Rai, P., Karunasagar, I., and Karunasagar, I. (2022) Isothermal amplification-based assays for rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: opportunities and recent developments, *Rev. Med. Virol.*, **32**, e2274, doi: 10.1002/rmv.2274.
10. Chaouch, M. (2021) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): an effective molecular point-of-care technique for the rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2, *Rev. Med. Virol.*, **31**, e2215, doi: 10.1002/rmv.2215.
11. Bi, S., Yue, S., and Zhang, S. (2017) Hybridization chain reaction: a versatile molecular tool for biosensing, bioimaging, and biomedicine, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, 4281-4298, doi: 10.1039/c7cs00055c.
12. Yue, S., Li, Y., Qiao, Z., Song, W., and Bi, S. (2021) Rolling circle replication for biosensing, bioimaging, and biomedicine, *Trends Biotechnol.*, **39**, 1160-1172, doi: 10.1016/j.tibtech.2021.02.007.
13. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Gilvanov, A. R., and Chemeris, A. V. (2021) Rolling circle amplification as a universal method for the analysis of a wide range of biological targets, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **47**, 1172-1189, doi: 10.1134/S1068162021060078.
14. Bodulev, O. L., and Sakharov, I. Y. (2020) Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 147-166, doi: 10.1134/S0006297920020030.
15. Hafner, G. J., Yang, I. C., Wolter, L. C., Stafford, M. R., and Giffard, P. M. (2001) Isothermal amplification and multimerization of DNA by Bst DNA polymerase, *BioTechniques*, **30**, 852-856, doi: 10.2144/01304rr03.
16. Garafutdinov, R. R., Burkhanova, G. F., Maksimov, I. V., and Sakhabutdinova, A. R. (2023) New method for microRNA detection based on multimerization, *Anal. Biochem.*, **664**, 115049, doi: 10.1016/j.ab.2023.115049.
17. Wang, G., Ding, X., Hu, J., Wu, W., Sun, J., and Mu, Y. (2017) Unusual isothermal multimerization and amplification by the strand-displacing DNA polymerases with reverse transcription activities, *Sci. Rep.*, **7**, 13928, doi: 10.1038/s41598-017-13324-0.
18. Sakhabutdinova, A. R., Kamalov, M. I., Salakhieva, D. V., Mavzyutov, A. R., and Garafutdinov, R. R. (2021) Inhibition of nonspecific polymerase activity using poly(aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte, *Anal. Biochem.*, **628**, 114267, doi: 10.1016/j.ab.2021.114267.
19. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) The influence of reaction conditions on DNA multimerization during isothermal amplification with Bst DNA polymerase, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 758-771, doi: 10.1007/s12010-019-03127-6.
20. Garafutdinov, R. R., Gilvanov, A. R., Kupova, O. Y., and Sakhabutdinova, A. R. (2020) Effect of metal ions on isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **161**, 1447-1455, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.028.
21. Garafutdinov, R. R., Sakhabutdinova, A. R., Kupryushkin, M. S., and Pyshnyi, D. V. (2020) Prevention of DNA multimerization during isothermal amplification with Bst exo⁻ DNA polymerase, *Biochimie*, **168**, 259-267, doi: 10.1016/j.biochi.2019.11.013.
22. Sakhabutdinova, A. R., Mirsaeva, L. R., Garafutdinov, R. R., Oskorbin, I. P., and Filipenko, M. L. (2020) Elimination of DNA multimerization arising from isothermal amplification in the presence of Bst exo⁻ DNA polymerase, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **46**, 52-59, doi: 10.1134/s1068162020010082.
23. Qasem, A., Shaw, A. M., Elkamel, E., and Naser, S. A. (2021) Coronavirus disease 2019 (COVID-19) diagnostic tools: a focus on detection technologies and limitations, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **43**, 728-748, doi: 10.3390/cimb43020053.
24. Panchali, M. J. L., Oh, H. J., Lee, Y. M., Kim, C. M., Tariq, M., Seo, J. W., Kim, D. Y., Yun, N. R., and Kim, D. M. (2022) Accuracy of real-time polymerase chain reaction in COVID-19 patients, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0059121, doi: 10.1128/spectrum.00591-21.
25. Meena, D. S., Kumar, B., Kachhwaha, A., Kumar, D., Khichar, S., Bohra, G. K., Sharma, A., Kothari, N., Garg, P., Sureka, B., Banerjee, M., Garg, M. K., and Misra, S. (2022) Comparison of clinical characteristics and outcome in RT-PCR positive and false-negative RT-PCR for COVID-19: a retrospective analysis, *Infez. Med.*, **30**, 403-411, doi: 10.53854/liim-3003-8.
26. Jackson, L. N., Chim, N., Shi, C., and Chaput, J. C. (2019) Crystal structures of a natural DNA polymerase

- that functions as an XNA reverse transcriptase, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 6973-6983, doi: 10.1093/nar/gkz513.
27. Sakhabutdinova, A. R., Gazizov, R. R., Chemeris, A. V., and Garafutdinov, R. R. (2022) Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo KlenTaq DNA polymerase, *Anal. Biochem.*, **659**, 114960, doi: 10.1016/j.ab.2022.114960.
 28. Silva, A., Azevedo, M., Sampaio-Maia, B., and Sousa-Pinto, B. (2022) The effect of mouthrinses on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 viral load: A systematic review, *J. Am. Dent. Assoc.*, **153**, 635-648, doi: 10.1016/j.adaj.2021.12.007.
 29. Hernández-Vásquez, A., Barrenechea-Pulache, A., Comandé, D., and Azañedo, D. (2022) Mouthrinses and SARS-CoV-2 viral load in saliva: a living systematic review, *Evid. Based Dent.*, doi: 10.1038/s41432-022-0253-z.
 30. Tallmadge, R. L., Laverack, M., Cronk, B., Venugopalan, R., Martins, M., Zhang, X., Elvinger, F., Plocharczyk, E., and Diel, D. G. (2022) Viral RNA load and infectivity of SARS-CoV-2 in paired respiratory and oral specimens from symptomatic, asymptomatic, or postsymptomatic individuals, *Microbiol. Spectr.*, **10**, e0226421, doi: 10.1128/spectrum.02264-21.
 31. Fujiya, Y., Sato, Y., Katayama, Y., Nirasawa, S., Moriai, M., Saeki, M., Yakuwa, Y., Kitayama, I., Asanuma, K., Kuronuma, K., and Takahashi, S. (2022) Viral load may impact the diagnostic performance of nasal swabs in nucleic acid amplification test and quantitative antigen test for SARS-CoV-2 detection, *J. Infect. Chemother.*, **28**, 1590-1593, doi: 10.1016/j.jiac.2022.07.023.
 32. Dutta, D., Naiyer, S., Mansuri, S., Soni, N., Singh, V., Bhat, K. H., Singh, N., Arora, G., and Mansuri, M. S. (2022) COVID-19 diagnosis: a comprehensive review of the RT-qPCR method for detection of SARS-CoV-2, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 1503, doi: 10.3390/diagnostics12061503.
 33. Ravina, Kumar, A., Manjeet, Twinkle, Subodh, Narang, J., and Mohan, H. (2022) Analytical performances of different diagnostic methods for SARS-CoV-2 virus – a review, *Sens. Int.*, **3**, 100197, doi: 10.1016/j.sintl.2022.100197.
 34. Marando, M., Tamburello, A., Gianella, P., Taylor, R., Bernasconi, E., Fusi-Schmidhauser, T. (2022) Diagnostic sensitivity of RT-PCR assays on nasopharyngeal specimens for detection of SARS-CoV-2 infection: a systematic review and meta-analysis, *Caspian J. Intern. Med.*, **13**, 139-147, doi: 10.22088/cjim.13.0.139.
 35. Garafutdinov, R. R., Galimova, A. A., and Sakhabutdinova, A. R. (2017) Polymerase chain reaction with nearby primers, *Anal. Biochem.*, **518**, 126-133, doi: 10.1016/j.ab.2016.11.017.

DETECTION OF SPECIFIC RNA TARGETS BY MULTIMERIZATION

A. R. Sakhabutdinova, A. V. Chemeris, and R. R. Garafutdinov*

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 450054 Ufa, Bashkortostan, Russia; e-mail: garafutdinovr@gmail.com

Detection of specific RNA targets via amplification-mediated techniques is widely used in fundamental studies and medicine due to an essential role of RNA in realization of genetic information and diseases development. Here, we report on an approach for detection of RNA targets based on a particular type of isothermal amplification, namely, reaction of nucleic acid multimerization. The proposed technique requires only a single DNA polymerase possessing reverse transcriptase, DNA-dependent DNA polymerase and strand-displacement activities. Reaction conditions that lead to efficient detection of the target RNAs through multimerization mechanism were determined. The approach was approved using genetic material of SARS-CoV-2 coronavirus as a model viral RNA. Reaction of multimerization allowed to differentiate SARS-CoV-2 RNA-positive samples from SARS-CoV-2 negative samples with high reliability. The proposed technique determines detection of RNA even in samples, which undergone multiple freezing.

Keywords: ribonucleic acids (RNA), coronavirus SARS-CoV-2, molecular diagnostics, isothermal amplification, multimerization, nearby primers

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ D-ЦИКЛОСЕРИНОМ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ *Haliscomenobacter hydrossis*

© 2023 А.К. Бакунова^{1*}, И.О. Матюта¹, А.Ю. Николаева^{1,2},
К.М. Бойко¹, В.О. Попов^{1,3}, Е.Ю. Безсуднова^{1*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
Институт биохимии имени А.Н. Баха, 119071 Москва, Россия;
электронная почта: a.bakunova@fbras.ru, eubez@inbi.ras.ru

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.08.2022

После доработки 10.02.2023

Принята к публикации 11.02.2023

D-Циклосерин ингибирует пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты с различной эффективностью в зависимости от организации активного центра фермента и механизма катализируемого превращения. D-Циклосерин взаимодействует с PLP-формой фермента подобно субстратам (аминокислотам) и преимущественно обратимо. Известно несколько продуктов взаимодействия PLP с D-циклосерином, при этом для некоторых ферментов образование стабильного ароматического гидроксизоксазол-пиридоксамин-5'-фосфата при определённых значениях pH приводит к необратимому ингибированию. Цель данной работы состояла в определении механизма ингибирования D-циклосерином PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*, которая характеризуется иной, чем у канонических трансаминаз D-аминокислот, организацией активного центра. Спектральными методами обнаружено несколько продуктов взаимодействия D-циклосерина и PLP в активном центре трансаминазы: оксим, образованный PLP и β-аминоокси-D-аланином; кетимин, образованный пиридоксамин-5'-фосфатом и D-циклосерином в циклической форме; и пиридоксамин-5'-фосфат. Образование гидроксизоксазол-пиридоксамин-5'-фосфата не установлено. Методом рентгеноструктурного анализа получена пространственная структура комплекса трансаминазы с D-циклосерином. В активном центре трансаминазы обнаружен кетимин, образованный пиридоксамин-5'-фосфатом и циклической формой D-циклосерина. Кетимин находится в двух положениях, в которых он образует водородные связи с разными остатками активного центра. Кинетическими и спектральными методами показаны обратимость ингибирования D-циклосерином трансаминазы из *H. hydrossis* и восстановление активности фермента как избытком кетосубстрата, так и избытком кофактора. Полученные результаты подтверждают взаимопревращение аддуктов D-циклосерина и PLP, а также обратимость ингибирования D-циклосерином PLP-зависимых трансаминаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: трансаминаза D-аминокислот, D-циклосерин, обратимое ингибирование, флуоресценция, рентгеноструктурный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523050111, EDN: AYYWBP

ВВЕДЕНИЕ

D-Циклосерин, циклический аналог D-серина, известен как ингибитор пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимых ферментов, включая трансаминазы, декарбоксилазы и рацемазы [1–5]. D-Циклосерин относится к антибиотикам широкого спектра действия, например, D-цикло-

серин применяется в терапии туберкулёза, как ингибитор PLP-зависимой аланинрацемазы у бактерии *Mycobacterium tuberculosis* (UniProt код: P9WQA9) [6]. Подобно субстратам (аминокислотам), D-циклосерин вступает в реакцию с кофактором PLP в активном центре фермента и образует внешний альдимин по механизму нуклеофильного замещения у C4'-атома PLP,

Принятые сокращения: PLP – пиридоксаль-5'-фосфат; PMP – пиридоксамин-5'-фосфат; TA_Halhy – трансаминаза D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*.

* Адресат для корреспонденции.

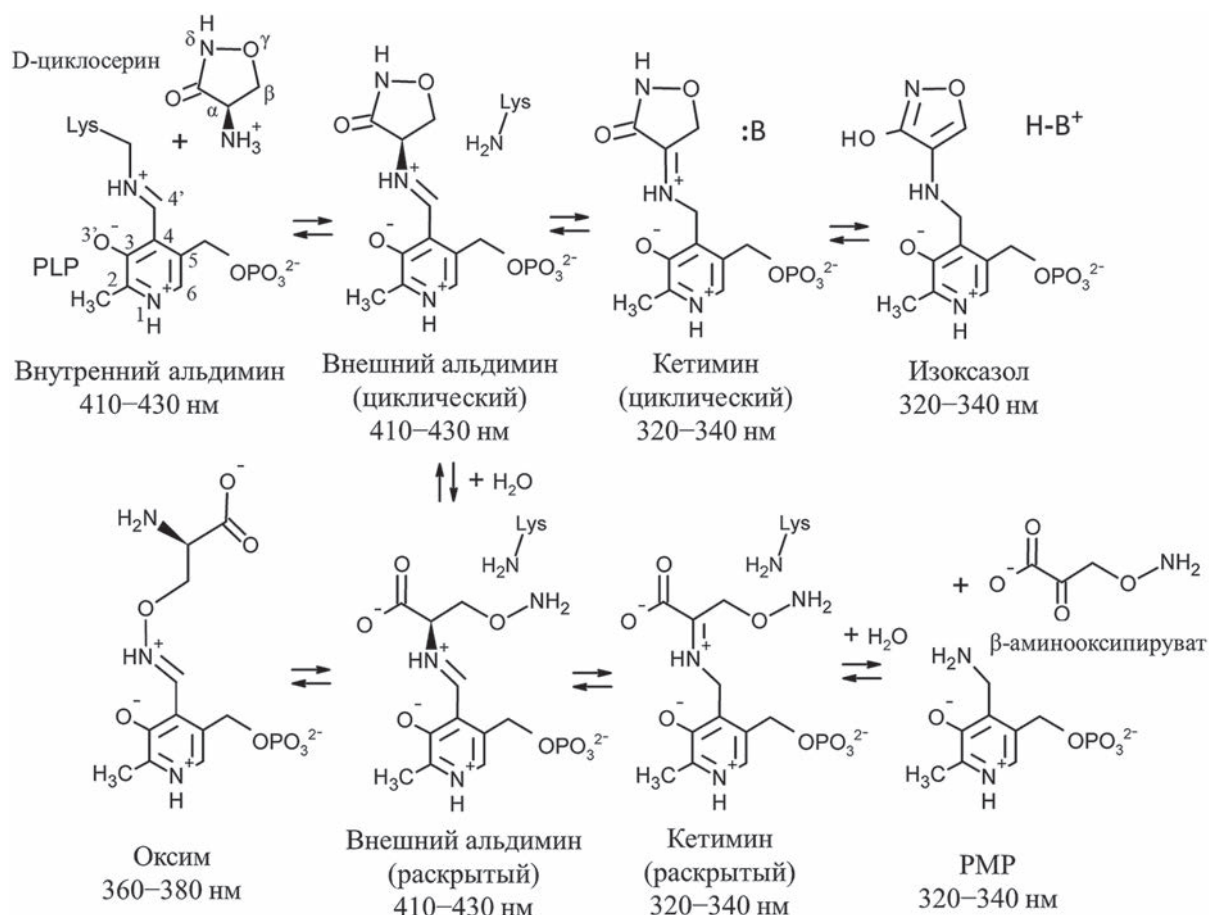


Схема превращения D-циклосерина в активном центре PLP-зависимых ферментов с указанием максимумов поглощения образующихся соединений

далее протекает стереоселективный 1,3-перенос протона при содействии аминогруппы каталитического остатка лизина с образованием кетимина — аддукта пиридоксамин-5'-фосфата (PMP) и кетопроизводного D-циклосерина (схема). Кетимин далее превращается в стабильное ароматическое соединение — аддукт гидроксиизоксазола и PMP (изоксазол) — путём отщепления протона от Cβ-атома [1–3]. Ранее этот путь превращения считался необратимым [1–3], однако недавно методами ЯМР и флуоресцентной спектроскопии установлено, что и в растворе, и в активном центре аланин-рацемаз изоксазол со временем превращается в оксим, образованный PLP-формой кофактора и β-аминоокси-D-аланином [7]. Образование оксима происходит в результате внутримолекулярной перегруппировки, которой предшествует гидролиз D-циклосерина до β-аминоокси-D-аланина (раскрытая форма D-циклосерина). Кроме того, при изучении ингибирования аланин-глиоксала-трансаминазы человека (UniProt код: P21549) D-циклосерином обнаружен третий путь превращения D-циклосерина в активном центре фермента через образование раскрытого кетимина, аддукта PMP-формы ко-

фактора и β-аминооксипирувата, с последующим его разложением и накоплением PMP в активном центре трансаминазы [4]. На сегодня проведённые исследования позволяют представить взаимодействие D-циклосерина и PLP в активном центре фермента в виде схемы, где все стадии обратимы и образующиеся соединения переходят друг в друга.

В кристаллографических исследованиях комплексов PLP-зависимых ферментов с D-циклосерином описаны разнообразные продукты ингибирования: изоксазол; внешний альдимин, образованный PLP-формой кофактора и циклической формой D-циклосерина (циклический альдимин); кетимин, образованный PMP-формой кофактора и циклической формой кетопроизводного D-циклосерина (циклический кетимин) и PMP. В большинстве депонированных структур встречается изоксазол (PDB коды: 5U3F, 3E6E, 1VFS, 1EPV, 2DAA) [1–3, 8, 9] или циклический альдимин (PDB коды: 2RJH, 1I2L, 1D7S, 5FAJ, 3TCM, 4D9F) [5, 10–13].

Среди PLP-зависимых трансаминаз ингибирование D-циклосерином детально изучено для трансаминазы разветвлённых L-аминокис-

лот из *M. tuberculosis* (UniProt код: P9WQ75) [3], для трансаминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp. (UniProt код: P19938) [1] и для аланин-глиоксилат-трансаминазы человека [4]. Ферментативное трансаминирование протекает по механизму последовательного двойного замещения, в реакции участвуют два субстрата (аминокислота/амин и кетокислота/кетон), полная реакция трансаминирования является суммой двух полуреакций. В первой полуреакции аминокислота/амин (субстрат аминодонор) реагирует с PLP в активном центре фермента, превращаясь в кетокислоту/кетон, при этом кофактор переходит в РМР-форму. Во второй полуреакции другая кетокислота/кетон (субстрат аминоакцептор) превращается в новую аминокислоту/амин, исходная PLP-форма кофактора регенерируется [14–16]. С трансаминазами D-цикloserин вступает в первую полуреакцию (схема), продуктами которой могут быть изоксазол и циклический кетимин, а в результате гидролиза D-цикloserина накапливаются оксим, раскрытый кетимин и РМР [1, 3, 4]. Для ряда ферментов эффективность ингибирования D-цикloserином растёт во времени, что объясняется сходством механизмов взаимодействия ингибитора и субстрата аминокислоты с ферментом (первая полуреакция). Если наблюдаемая константа скорости полуреакции между ферментом и D-цикloserином значительно меньше наблюдаемой константы скорости полуреакции фермента со специфическим субстратом, то наибольшая степень ингибирования достигается через некоторое время [2–4].

Для трансаминаз описаны как обратимое, так и необратимое ингибирование D-цикloserином. Например, активность трансаминаз из *M. tuberculosis* и *Bacillus* sp. необратимо ингибируется D-цикloserином при pH 8,0–8,5 [3, 17]. Однако активность трансаминазы из *Bacillus* sp. восстанавливается при pH 6,5–7,5 в результате добавления PLP к ферменту [17]. О восстановлении активности трансаминазы из *M. tuberculosis* сведений нет. Основным продуктом взаимодействия этих трансаминаз с D-цикloserином является изоксазол, образование которого подтверждено рентгеноструктурным анализом комплексов ферментов с ингибитором [1, 3]. Для аланин-глиоксилат-трансаминазы человека ингибирование D-цикloserином является обратимым, образование изоксазола не зафиксировано [4]. Спектральными методами показано образование оксима; рентгеноструктурным анализом в активном центре комплекса фермента с D-цикloserином обнаружена РМР-форма кофактора. Кро-

ме того, для аланинглиоксилаттрансаминазы человека наблюдается восстановление активности избытком субстрата [4]. Перечисленные трансаминазы различаются укладкой PLP-связывающего домена и составом функциональных групп в активном центре.

Настоящая работа является продолжением исследований взаимодействия D-цикloserина с PLP-зависимыми трансаминазами. Объектом исследования является трансаминаза D-аминокислот (EC 2.6.1.21) из бактерии *Halicomonobacter hydrossis* (TA_Halhy; UniProt код: F4KWH0) [18]. TA_Halhy активна в реакции трансаминирования с разнообразными кетокислотами, наилучшим субстратом среди аминокислот (субстратом аминодонором) является D-глутаминовая кислота. Функциональной единицей TA_Halhy является гомодимер, содержащий два симметричных активных центра. Как и во всех трансаминазах, активный центр TA_Halhy формируется остатками обеих субъединиц и молекулой PLP, ковалентно связанной с боковой группой остатка лизина (внутренний альдимин). От известных канонических трансаминаз D-аминокислот, включая трансаминазу D-аминокислот из *Bacillus* sp., TA_Halhy отличается составом функциональных групп в активном центре. Так, в активном центре канонических трансаминаз D-аминокислот присутствует триада остатков аргинина, тирозина и гистидина, боковые группы которых сближены в пространстве и образуют сайт связывания α -карбоксильной группы субстрата. В активном центре TA_Halhy нет канонической триады, но имеются четыре положительно заряженных остатка – три остатка аргинина и один остаток лизина, которые, по-видимому, взаимодействуют с α -карбоксильной группой субстрата [18].

Цель данной работы состояла в определении механизма ингибирования TA_Halhy D-цикloserином. Детальное исследование взаимодействия D-цикloserина с TA_Halhy проводили спектральными и кинетическими методами. Методом рентгеноструктурного анализа установлена пространственная структура комплекса TA_Halhy с D-цикloserином с разрешением 1,4 Å и определены остатки, координирующие молекулу ингибитора в активном центре фермента. Проведённые исследования позволили изучить механизм ингибирования TA_Halhy D-цикloserином, в том числе установить обратимость ингибирования TA_Halhy D-цикloserином, определить основные продукты взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином и предложить способы восстановления активности ингибированного фермента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантной TA_Halhy. Наработку и очистку TA_Halhy проводили, как описано ранее [18]. Рекомбинантную TA_Halhy выделяли из биомассы штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21(DE3)pLys («Stratagene», США), несущего экспрессионный вектор pET_21d_Halhy_2446. Рекомбинантную TA_Halhy, содержащую 6-His-фрагмент на C-конце, отделяли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap HP («Cytiva», США). Далее 6-His-фрагмент отщепляли TEV-протеазой, TA_Halhy отделяли от TEV-протеазы и продуктов протеолиза с помощью повторной металл-хелатной аффинной хроматографии. В заключение проводили гель-фильтрацию в 20 mM HEPES/NaOH буфере (pH 7,5) с добавлением 150 mM NaCl, 100 мкМ PLP и 1 mM ди-тиотреитола. Очищенную TA_Halhy хранили в 50%-ном глицерине при -20°C . Чистоту и гомогенность препарата контролировали ДДС-ПААГ-электрофорезом. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

PLP-форму TA_Halhy получали инкубированием фермента в концентрации 2,5 мг/мл (74 мкМ) с избытком PLP (700 мкМ) в присутствии 10 mM α -кетоглутарата в течение 30 мин при 40°C . Кетосубстрат и несвязавшийся PLP удаляли переводом в другой буфер, используя колонку HiTrap Desalting («Cytiva»), уравновешенную 50 mM К-фосфатным буфером (pH 8,0).

Кинетический анализ. Для анализа ингибирования TA_Halhy D-цикloserином были получены полные кинетические кривые реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом в присутствии разных концентраций D-цикloserина (3–50 мкМ) без предварительного инкубирования TA_Halhy с ингибитором. Накопление продукта реакции — пирувата — определяли по убыли NADH в сопряжённой ферментативной реакции с лактатдегидрогеназой из мышцы кролика (LDH) («Sigma», США). Расходование NADH определяли спектрофотометрически при 340 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) с использованием спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis («Thermo Scientific», США). Реакцию трансаминирования, катализируемую TA_Halhy, проводили в 50 mM К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40°C с субстратами D-аланином (5 mM) и α -кетоглутаратом (2 mM) с добавлением 30 мкМ PLP, 0,33 mM NADH, 5 мкг/мл LDH (удельная активность препарата составляет 200 мкмоль/мин на 1 мг белка). В условиях трансаминазной реакции препарат LDH был стабилен. Тем-

пературной инактивации TA_Halhy при 40°C не наблюдалось [18]. Реакцию инициировали добавлением α -кетоглутарата после инкубирования реакционной смеси с TA_Halhy в концентрации 0,35 мкг/мл (10 нМ) в течение 15 мин. D-Цикloserин к реакционной смеси добавляли вместе с α -кетоглутаратом.

Кинетические кривые аппроксимировали интегральным уравнением для медленно связывающегося ингибитора (1) [19]:

$$A_t = A_0 - v' \times t - \frac{v_0 - v'}{k_{\text{инг}}} \times (1 - \exp(-k_{\text{инг}} \times t)), \quad (1)$$

где A_t — значение поглощения в момент времени t ; A_0 — значение поглощения в начальный момент времени; v' — скорость ферментативной реакции после установления равновесия между ферментом и ингибитором; v_0 — начальная скорость ферментативной реакции; $k_{\text{инг}}$ — наблюдаемая константа скорости ингибирования.

Параметры ингибирования рассчитывали по уравнению (2) [19]:

$$k_{\text{инг}} = k_{\text{дисс}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I^{\text{каж}}}\right), \quad (2)$$

где $k_{\text{дисс}}$ — константа скорости диссоциации комплекса фермент–ингибитор, $[I]$ — концентрация ингибитора, $K_I^{\text{каж}} = k_{\text{дисс}}/k_{\text{асс}}$ — константа диссоциации комплекса фермент–ингибитор при заданной концентрации субстрата, $k_{\text{асс}}$ — константа скорости ассоциации фермента с ингибитором. Каждое измерение проводили в трёх повторностях.

Спектральный анализ. Эксперименты проводили в 50 mM К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40°C . К PLP-форме TA_Halhy в концентрации 0,85 мг/мл (25 мкМ) добавляли D-цикloserин в концентрации 25 mM и выдерживали смесь в течение 30 мин. Белковую фракцию отделяли от низкомолекулярных компонентов, используя колонку HiTrap Desalting. Кроме того, фракцию низкомолекулярных компонентов получали ультрафильтрацией с использованием центрифужного концентратора (30 кДа MWCO; «Millipore», США). Спектры поглощения фракций регистрировали с помощью спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis, концентрация белка не превышала 0,85 мг/мл (25 мкМ). Спектры флуоресценции фракций регистрировали в диапазоне 345–600 нм при длинах волн возбуждения 337 и 380 нм с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 («Horiba Scientific», Япония), концентрация белка не превышала 0,17 мг/мл (5 мкМ). За накоплением свободного РМР в растворе при разложении продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином следили по убыли

Параметры съёмки и данные кристаллографического уточнения структуры комплекса TA_Nalhy с D-цикло-серинном

Параметры съёмки	
Пространственная группа	C2
$a; b; c, \text{\AA}$	86,9; 71,94; 53,09
$\alpha; \beta; \gamma, \text{град}$	90,00; 101,47; 90,00
T, K	100
$\lambda, \text{\AA}$	0,9
Разрешение, $\text{\AA}$	42,52–1,41 (1,43–1,41)
Число независимых рефлексов	61 465 (3027)
Полнота набора, %	99,7 (99,9)
$I/\sigma(I)$	6,5 (0,6)
$R_{\text{meas}}, \%$	8,6 (4,7)
$CC_{1/2}, \%$	99,8 (94,6)
Уточнение	
$R_{\text{fact}}, \%$	17,2
$R_{\text{free}}, \%$	20,3
Общий средний B -фактор	23,9
Средний B -фактор по белку	22,8
Средний B -фактор по растворителю	32,8
Средний B -фактор по D-циклосерину	25,3
Число неводородных атомов	
Белок	2306
Растворитель	267
D-циклосерин	29
Всего	2608
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, $\text{\AA}$	0,016
Валентные углы, град	2,006
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	97,9
Допустимые, %	2,1
Код PDB	8АНУ

Примечание. В скобках приведены значения для последнего слоя.

поглощения при 337 нм. За регенерацией PLP-формы TA_Nalhy при добавлении α -кетоглутарата следили по росту поглощения при 416 нм. Для расчёта наблюдаемых констант скоростей $k_{\text{набл}}$ указанных процессов экспериментальные значения аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка (3):

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{\text{набл}} \times t), \quad (3)$$

где A_t – значение поглощения в момент времени t , A_∞ – предельное значение поглощения, A_0 – значение поглощения в начальный момент времени. Каждое измерение проводили в трёх повторностях.

Получение кристаллов комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном. Кристаллы комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном получали настаиванием. Для этого кристалл PLP-формы TA_Nalhy, полученный как описано ранее [18], вылавливали петлёй и помещали в раствор, содержащий, помимо компонентов противораствора (0,1 М Na-ацетатного буфера (pH 4,8), 20% (v/v) PEG 3350), D-циклосерин в концентрации 10 мМ, до частичного обесцвечивания кристалла (около 10 с).

Сбор и обработка дифракционных данных. Непосредственно перед рентгеноструктурным экспериментом кристаллы TA_Nalhy помещали в криораствор, содержащий, помимо компонентов противораствора, 25% (v/v) глицерина и D-циклосерин в концентрации 10 мМ, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные данные, собранные при температуре -173°C на станции BL41XU синхротронного источника Spring8 (Япония), обрабатывали с использованием программы Dials [20] из пакета CCP4 [21]. Статистика собранного набора данных приведена в таблице.

Решение и уточнение структуры. Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [22]. В качестве стартовой модели использовали структуру холоформы трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* (PDB код: 7P7X). Кристаллографическое уточнение структуры проведено с использованием программ Refmac5 [23] и Coot [24] с использованием изотропных тепловых факторов и атомов водорода в фиксированных положениях до достижения R -факторами значений: $R_{\text{work}} = 17,2\%$, $R_{\text{free}} = 20,3\%$ (таблица). В независимой части кристалла комплекса TA_Nalhy с D-циклосеринном находится субъединица белка (283 видимых остатка), 267 молекул воды, одна молекула PLP в комплексе с D-циклосеринном

в двух положениях, а также одна молекула глицерина из криораствора. Визуальный анализ структурных данных проводили с использованием программ Coot и PyMOL Molecular Graphics System, Version 4.6 («Schrödinger», USA). Сравнение структур проводили с использованием сервиса PDBeFOLD [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ингибирование TA_Halhy D-цикloserином.

Вид полных кинетических кривых реакции трансаминирования, катализируемой TA_Halhy, при разных концентрациях D-цикloserина соответствовал росту эффективности ингибирования TA_Halhy D-цикloserином со временем (рис. 1, а). Рассчитанные из кинетических кривых значения v_0 не зависели от концентрации D-цикloserина, при этом константы скорости ингибирования линейно зависели от концентрации ингибитора (рис. 1, б), что соответствовало одностадийному механизму образования комплекса фермента с ингибитором: $E + I \rightarrow EI$ [19]. Константа скорости ассоциации фермента с ингибитором ($k_{\text{асс}}$) составила $0,040 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1} \cdot \text{мкМ}^{-1}$, константа скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$) — $0,086 \pm 0,014 \text{ мин}^{-1}$, кажущаяся константа диссоциации комплекса фермент–ингибитор ($K_i^{\text{каж}}$) — $2,1 \pm 0,4 \text{ мкМ}$. Проведённый кинетический анализ позволил количественно охарактеризовать процессы образования и диссоциации комплекса фермента с ингибитором, дальнейшие превращения D-цикloserина в активном центре TA_Halhy были проанализированы спектраль-

ными методами и рентгеноструктурным анализом.

Спектральный анализ продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином. PLP-форма Halhy имеет максимумы поглощения при 280 нм и 416 нм (рис. 2, а), что соответствует внутреннему альдиминому TA_Halhy. Выдерживание 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy в 50 мМ К-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 25 мМ D-цикloserина, в течение 30 мин при 40 °С приводило к снижению поглощения при 416 нм и росту поглощения при 337 нм. Конечный спектр имел максимумы поглощения при 280 нм и 337 нм с плечом при 380 нм (рис. 2, а). Максимум при 337 нм указывал на образование аддуктов кофактора и D-цикloserина с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора, а именно: циклического кетимина, раскрытого кетимина, изоксазола и РМР [26, 27]. Плечо при 380 нм указывало на присутствие среди продуктов оксима [28]. После перевода в другой буфер спектр продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином имел максимумы при 280 нм и 337 нм, плеча при 380 нм не наблюдалось, т.е. оксим в препарате фермента отсутствовал (рис. 2, б). Спектр низкомолекулярной фракции указывал на частичный выход в раствор продуктов взаимодействия кофактора и D-цикloserина, в том числе РМР и оксима (рис. 2, б). Дальнейшее выдерживание препарата после смены буфера (рис. 2, в) привело к сдвигу максимума поглощения с 337 нм на 324 нм, что соответствовало разложению продуктов взаимодействия до β -аминооксипирувата и РМР и их высвобождению из активного центра (спектр погло-

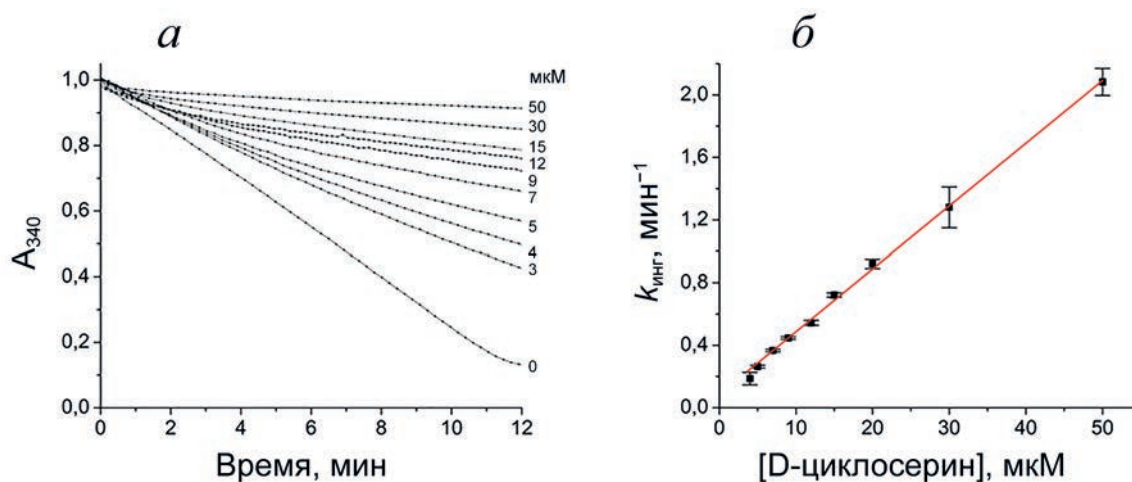


Рис. 1. Ингибирование D-цикloserином активности TA_Halhy в реакции трансаминирования между D-аланином (5 мМ) и α -кетоглутаратом (2 мМ) при 40 °С: а — кинетические кривые реакции, полученные при разных концентрациях добавленного D-цикloserина (указаны справа); б — зависимость наблюдаемой константы скорости ингибирования от концентрации D-цикloserина: экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, линейная аппроксимация показана красной линией

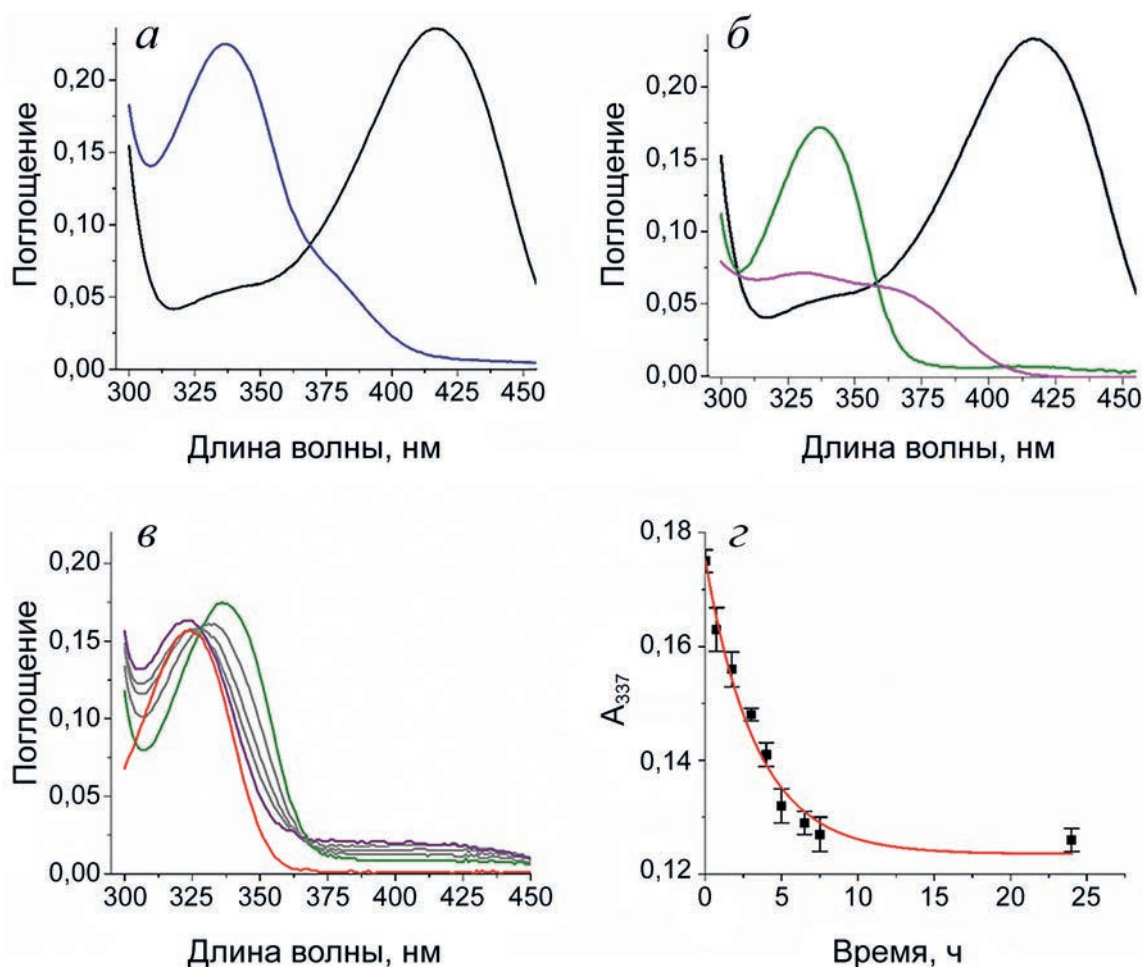


Рис. 2. Взаимодействие PLP-формы TA_Halhy (25 мкМ) с D-циclosеринном в концентрации 25 мМ при 40 °С: а – спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циclosеринном (синий); б – спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циclosеринном с последующим переводом в новый буфер (зелёный), спектр поглощения низкомолекулярной фракции (розовый); в – изменения в спектре поглощения продуктов взаимодействия PLP-формы TA_Halhy с D-циclosеринном после 30 мин инкубирования: сразу после смены буфера (зелёный), через 2, 4, 6 ч (серый) и через 24 ч (фиолетовый), спектр поглощения свободного РМР в концентрации 25 мкМ (красный); г – зависимость поглощения при 337 нм от времени (из спектров на рис. 2, в): экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, аппроксимация показана красной линией

щения РМР, связанного в активном центре TA_Halhy, имеет максимум при 337 нм, спектр поглощения свободного РМР в К-фосфатном буфере (рН 8,0) имеет максимум при 324 нм (рис. 2, в)). Наблюдаемая константа скорости накопления свободного РМР составила $0,37 \pm 0,07 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 2, г). Таким образом, в результате проведённого спектрального анализа установлено взаимодействие D-циclosерина с кофактором PLP в активном центре TA_Halhy, определены продукты взаимодействия, их постепенное разложение и, как следствие, накопление в растворе свободного РМР и апоформы TA_Halhy.

Анализ продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циclosеринном провели методом флуоресцентной спектроскопии. Спектр флуоресценции продуктов взаимодействия при воз-

буждении на 337 нм имел максимумы при 390 и 450 нм, при возбуждении на 380 нм – имел максимум при 450 нм (рис. 3), что соответствовало оксиму [26]. Максимум при 390 нм принято относить к аддуктам PLP с низкомолекулярными соединениями с sp³-гибридизацией C4'-атома PLP (циклический кетимин, раскрытый кетимин, изоксазол и РМР; схема) [26, 27]. Спектр флуоресценции продуктов взаимодействия после смены буфера при возбуждении на 337 нм имел один максимум при 390 нм. Спектры флуоресценции низкомолекулярной фракции при возбуждении на 337 нм и 380 нм соответствовали нескольким продуктам: оксиму, характеризующемуся максимумом флуоресценции при 450 нм [26], и аддуктам с sp³-гибридизацией C4'-атома, характеризующимся максимумом флуоресценции

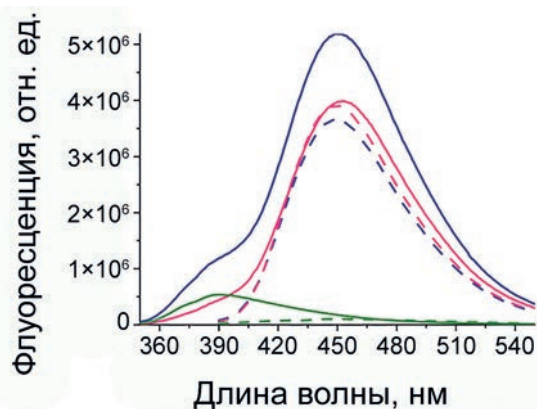


Рис. 3. Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином до (синий) и после смены буфера (зелёный), спектр флуоресценции низкомолекулярной фракции (розовый) при длинах волн возбуждения 337 нм (сплошная линия) и 380 нм (пунктирная линия)

при 390 нм [26, 27] (рис. 3). Таким образом, проведённый анализ подтвердил наличие среди продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином оксима и аддуктов с sp^3 -гибридизацией $C4'$ -атома, причём оксим полностью высвобождается из активного центра фермента в раствор, а соединения с sp^3 -гибридизацией $C4'$ -атома кофактора высвобождаются частично.

Анализ обратимости ингибирования. Обратимость ингибирования анализировали по регенерации PLP-формы TA_Halhy при добавлении к продуктам взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином как PLP, так и субстрата α -кетоглутарата. Для начала PLP-форму TA_Halhy (25 мкМ) выдерживали с 25 мМ D-циклосерином в 50 мМ К-фосфатном буфере (pH 8,0) при 40 °C в течение 30 мин и далее обновляли

буфер. К продуктам взаимодействия добавляли свободный PLP в концентрации 250 мкМ, что приводило в течение часа к полной регенерации PLP-формы фермента (рис. 4, а). Спектральные изменения указывали на вытеснение аддукта PLP и D-циклосерина молекулой PLP в активном центре TA_Halhy с образованием внутреннего альдимины с максимумом поглощения при 416 нм. При инкубировании продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циклосерином с субстратом α -кетоглутаратом в концентрации 10 мМ в спектре продуктов исчезал максимум поглощения при 337 нм и одновременно увеличивалось поглощение при 416 нм, что указывало на регенерацию PLP-формы фермента (рис. 4, б). Наблюдаемая константа скорости регенерации PLP-формы TA_Halhy составила $0,32 \pm 0,02 \text{ ч}^{-1}$ (рис. 4, в). Поскольку регенерация PLP-формы трансаминаз субстратом α -кетоглутаратом возможна только в полуреакции с РМР-формой фермента, то наблюдаемая регенерация субстратом PLP-формы TA_Halhy указывает на постепенное разложение продуктов взаимодействия до β -аминоксипирувата и РМР в активном центре фермента (схема) и дальнейшее превращение РМР в PLP в полуреакции с α -кетоглутаратом. Сходство величин наблюдаемых констант скоростей регенерации PLP-формы фермента и накопления свободного РМР в растворе указывает на общую лимитирующую стадию обоих процессов – образование РМР в активном центре фермента.

Анализ структуры комплекса TA_Halhy с D-циклосерином. Кристаллы комплекса TA_Halhy с D-циклосерином принадлежат к пространственной группе C2. Пространственная структура комплекса установлена с разрешением 1,4 Å

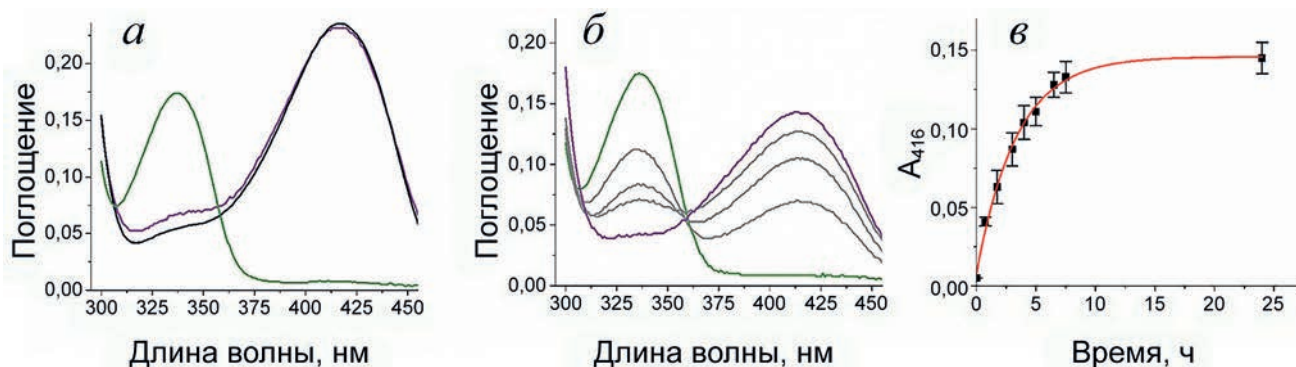


Рис. 4. Регенерация PLP-формы TA_Halhy: а – спектр поглощения 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy до (чёрный) и после 30 мин инкубирования с D-циклосерином в концентрации 25 мМ с последующим обновлением буфера (зелёный), после добавления PLP в концентрации 250 мкМ и повторной сменой буфера через 1 ч (фиолетовый); б – спектр поглощения 25 мкМ PLP-формы TA_Halhy после 30 мин инкубирования с D-циклосерином в концентрации 25 мМ с последующей сменой буфера (зелёный) и после добавления 10 мМ α -кетоглутарата через 2, 4, 6 ч (серый), и через 24 ч (фиолетовый); в – зависимость поглощения при 416 нм от времени (из спектров на рис. 4, б): экспериментальные значения показаны точками и представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, аппроксимация показана красной линией

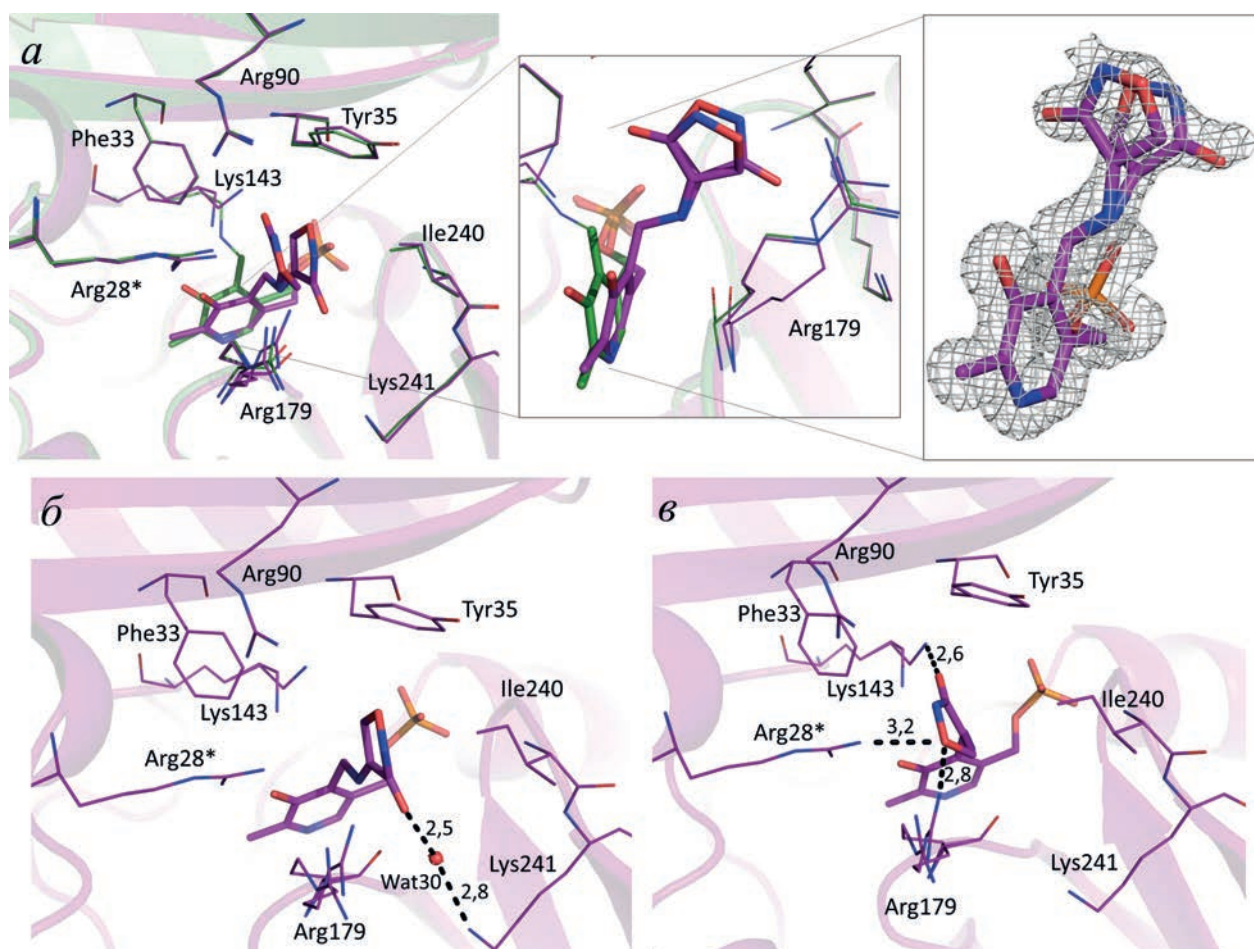


Рис. 5. Активный центр TA_Halhy в комплексе с D-циclosеринном: *a* – наложение структур комплекса TA_Halhy с D-циclosеринном (розовый; PDB код: 8AHU) и холоформы TA_Halhy (зелёный; PDB код: 7P7X), электронная плотность 2Fo-Fc на уровне срезаки 1,0 σ вокруг циклического кетимина; *б* и *в* – взаимодействие циклического кетимина с остатками активного центра TA_Halhy в двух положениях (*б* и *в*) с заселённостью 0,45 и 0,55 соответственно. Молекула PLP и циклического кетимина представлены палочковой моделью, остатки активного центра представлены проволоочной моделью, электронная плотность показана сетчатой поверхностью, водородные связи показаны чёрными пунктирными линиями, длины водородных связей указаны в ангстремах. * Остатки соседней субъединицы гомодимера

и представляет собой гомодимер (PDB код: 8AHU), аналогичный гомодимеру холоформы TA_Halhy (PDB код: 7P7X), RMSD по C α -атомам не превышает 0,18 Å. Боковые группы большинства остатков, формирующих активный центр, при связывании D-циclosерина не поменяли своих положений, конформационные изменения наблюдались только для боковой группы Arg179, которая имеет два положения, и для боковой группы каталитического Lys143, которая в структуре комплекса TA_Halhy с D-циclosеринном не образует ковалентной связи с кофактором (рис. 5, *a*). Таким образом, связывание D-циclosерина не приводит к реорганизации белковой глобулы TA_Halhy, наблюдаемые изменения ограничиваются конформационными изменениями боковых групп в активном центре.

Электронная плотность, обнаруженная в активном центре TA_Halhy, соответствует двум конформациям аддукта циклического D-ци-

лосерина с молекулой PLP, при этом ковалентных связей аддукта с остатками активного центра TA_Halhy не обнаружено (рис. 5, *a*). Карбонильные атомы кислорода двух конформаций аддукта ориентированы в противоположные стороны (рис. 5, *a*). D-Циклосерин в аддукте сохранил циклическую форму, однако его кольцо не является плоским, другими словами, образование ароматического изоксазола не произошло. Детальный анализ положения аддукта в активном центре фермента показал, что плоскость пиридинового кольца молекулы кофактора отклонилась от Lys143 в сторону Arg179 на угол около 20° относительно оси, проходящей по связи C6-N1 (рис. 5, *a*). Эти изменения подтверждают реакцию между PLP и D-циclosеринном, т.к. такое смещение кофактора характерно для трансаминаз после разрыва связи кофактора с каталитическим лизином в ходе полуреакции с аминокислотой [29, 30]. Двугранный угол C3-C4-C4A(C4')-N в струк-

туре комплекса TA_Halhy с D-цикloserином составил $\sim 84^\circ$, что указывает на переход C4'-атома PLP в sp³-гибридизацию, т.е. на образование циклического кетимина. Данный угол в структурах ингибиторных комплексов трансаминаз с sp²-гибридизацией C4'-атома PLP составляет 0–40° [29, 31] и, таким образом, соответствует сопряжённой π -электронной системе между двойной связью C4' = N и пиридиновым кольцом, т.е. образованию внешнего альдимины или оксима. Изменение гибридизации C4'-атома дополнительно подтверждается обесцвечиванием кристаллов PLP-формы TA_Halhy при вымачивании в растворе D-цикloserина. В активном центре TA_Halhy аддукт PLP и D-цикloserина координируется несколькими водородными связями, которые, однако, различаются для каждого из двух положений аддукта. Так, в одном положении атом кислорода карбонильной группы D-цикloserина координирован боковой группой Lys241 через молекулу воды Wat30 (рис. 5, б). Во втором положении боковые группы Arg28* и Arg179 (* – остаток, принадлежащий соседней субъединице) образуют две водородные связи с атомом O γ , а N ϵ -атом боковой группы каталитического остатка лизина образует водородную связь с атомом кислорода карбонильной группы D-цикloserина (рис. 5, в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведённых экспериментов установлено, что D-цикloserин обратимо ингибирует трансаминазу D-аминокислот из *H. hydrossis*, при этом D-цикloserин медленно связывается с ферментом. Подтверждено образование трёх продуктов взаимодействия: оксима, циклического кетимина и РМР. Образование оксима не является необратимым ингибированием для TA_Halhy, так как образующаяся в результате диссоциации оксима апоформа фермента полностью переходит в активную PLP-форму при добавлении PLP. Остальные соединения (циклический альдимин, раскрытый альдимин и раскрытый кетимин) также образуются в ходе взаимодействия, так как, согласно схеме, накопление РМР возможно только в результате превращения этих соединений. Изоксазол среди продуктов взаимодействия не обнаружен. Тем не менее, принимая во внимание подтверждённую недавно обратимость стадии превращения циклического кетимина в изоксазол [7], обратимое образование изоксазола из циклического кетимина не исключено и для TA_Halhy.

Активная PLP-форма TA_Halhy может быть восстановлена двумя путями: избытком кофактора PLP, в результате вытеснения аддуктов PLP и D-цикloserина из активного центра фермента, и избытком α -кетоглутарата, в результате образования РМР и его последующего перехода в PLP-форму в полуреакции с α -кетоглутаратом. Следует отметить, что описанная в данной работе регенерация PLP-формы TA_Halhy добавлением PLP в концентрации 250 мкМ не имеет биологического смысла, так как физиологическая концентрация PLP в клетке не превышает 1 мкМ [32]. Однако регенерация PLP-формы TA_Halhy избытком кетосубстрата α -кетоглутарата возможна и в клетке, так как разложение кетимина (как циклического, так и раскрытого) с образованием РМР-формы фермента протекает спонтанно, а концентрация свободного α -кетоглутарата в клетке достигает 2 мМ [33].

Опираясь на схему, механизм ингибирования TA_Halhy D-цикloserином можно представить следующим образом: в активном центре аминокислот D-цикloserина замещает боковую группу каталитического лизина с образованием внешнего циклического альдимины, который далее обратимо превращается в циклический кетимин, а через раскрытый альдимин – в оксим или раскрытый кетимин с последующим разложением до РМР и β -аминоксипировата с дальнейшим высвобождением продуктов из активного центра фермента. Значение кажущейся константы диссоциации комплекса TA_Halhy с D-цикloserином составляет $2,1 \pm 0,4$ мкМ и значительно ниже, чем значения используемых концентраций субстратов в трансаминазной реакции (5 мМ D-аланина и 2 мМ α -кетоглутарата) и чем значения констант Михаэлиса для данных субстратов (K_m составляет 23 ± 1 и $2,3 \pm 0,2$ мМ для D-аланина и α -кетоглутарата соответственно [18]).

Поскольку D-цикloserин взаимодействует с ферментом аналогично субстратам (D-аминокислотам), анализ положения циклического кетимина в активном центре TA_Halhy позволил уточнить остатки, способные связывать субстрат в активном центре фермента. В связывании D-цикloserина в активном центре TA_Halhy участвуют боковые группы четырёх остатков: Arg28*, Lys143, Arg179 и Lys241 (* – остаток, принадлежащий соседней субъединице). Для сравнения, в активном центре канонической трансаминазы из *Bacillus* sp. D-цикloserин координирован боковыми группами остатков Tyr31, Arg98*, His100* канонической триады, образующей сайт связывания α -карбоксильной группы субстратов [1].

Полученный комплекс TA_Halhy с D-цикло-серинном указывает на неканонический тип связывания α -карбоксильной группы в активном центре TA_Halhy с участием удалённых в пространстве остатков Arg28*, Arg179 и Lys241. Участие каталитического Lys143 в связывании D-циклосерина является результатом незавершённости полуреакции и артефактом кристаллизации.

Таким образом, несмотря на отличную от канонической организацию активного центра, трансаминаза D-аминокислот из *H. hydrossis* ингибируется D-циклосеринном. Связывание D-циклосерина в активном центре фермента отличается от описанных ранее вариантов связывания субстратов в активном центре трансаминаз. D-Циклосерин является эффективным, но обратимым ингибитором трансаминазы из *H. hydrossis*. Обобщая, стоит отметить, что наблюдаемая для разнообразных PLP-зависимых ферментов обратимость ингибирования D-циклосеринном и восстановление их активности избытком кофактора или субстрата снижает эффективность применения D-циклосерина как антибактериального препарата, однако не отменяет использование D-циклосерина как регулятора активности ферментов в биохимических экспериментах и при разработке биотехнологических процессов.

Вклад авторов. А.К. Бакунова — планирование экспериментов; Е.Ю. Безсуднова и В.О. Попов — концепция и руководство работой; А.К. Бакунова, А.Ю. Николаева, И.О. Матюта, К.М. Бойко — проведение экспериментов; А.К. Бакунова, И.О. Матюта, К.М. Бойко, Е.Ю. Безсуднова — обсуждение результатов исследования; А.К. Бакунова, Е.Ю. Безсуднова — написание текста; А.К. Бакунова, К.М. Бойко, А.Ю. Николаева, Е.Ю. Безсуднова, В.О. Попов — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00164) в части проведения кинетических экспериментов и кристаллизации комплекса, решения и уточнения структуры. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в части проведения спектральных исследований. Рентгеноструктурный эксперимент выполнен при поддержке Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) «Кристаллизатор»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peisach, D., Chipman, D. M., Van Ophem, P. W., Manning, J. M., and Ringe, D. (1998) D-Cycloserine inactivation of D-amino acid aminotransferase leads to a stable noncovalent protein complex with an aromatic cycloserine-PLP derivative, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2268-2274, doi: 10.1021/ja973353f.
2. Fenn, T. D., Stamper, G. F., Morollo, A. A., and Ringe, D. (2003) A side reaction of alanine racemase: transamination of cycloserine, *Biochemistry*, **42**, 5775-5783, doi: 10.1021/bi02702 2d.
3. Amorim Franco, T. M., Favrot, L., Vergnolle, O., and Blanchard, J. S. (2017) Mechanism-based inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* branched-chain aminotransferase by d- and l-cycloserine, *ACS Chem. Biol.*, **12**, 1235-1244, doi: 10.1021/acscchembio.7b00142.
4. Dindo, M., Grottelli, S., Annunziato, G., Giardina, G., Pieroni, M., Pampalona, G., Faccini, A., Cutruzzola, F., Laurino, P., Costantino, G., and Cellini, B. (2019) Cycloserine enantiomers are reversible inhibitors of human alanine:glyoxylate aminotransferase: implications for Primary Hyperoxaluria type 1, *Biochem. J.*, **476**, 3751-3768, doi: 10.1042/BCJ20190507.
5. Malashkevich, V. N., Strop, P., Keller, J. W., Jansonius, J. N., and Toney, M. D. (1999) Crystal structures of dialkylglycine decarboxylase inhibitor complexes, *J. Mol. Biol.*, **294**, 193-200, doi: 10.1006/jmbi.1999.3254.
6. Caminero, J. A., Sotgiu, G., Zumla, A., and Migliori, G. B. (2010) Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, *Lancet. Infect. Dis.*, **10**, 621-629, doi: 10.1016/S1473-3099(10)70139-0.
7. De Chiara, C., Homšak, M., Prosser, G. A., Douglas, H. L., Garza-Garcia, A., Kelly, G., Purkiss, A. G., Tate, E. W., and de Carvalho, L. P. S. (2020) D-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 686-694, doi: 10.1038/s41589-020-0498-9.
8. Priyadarshi, A., Lee, E. H., Sung, M. W., Nam, K. H., Lee, W. H., Kim, E. E., and Hwang, K. Y. (2009) Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 1030-1040, doi: 10.1016/j.bbapap.2009.03.006.
9. Noda, M., Matoba, Y., Kumagai, T., and Sugiyama, M. (2004) Structural evidence that ala-

- nine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product, *J. Biol. Chem.*, **279**, 46153-46161, doi: 10.1074/jbc.M404605200.
10. Wu, D., Hu, T., Zhang, L., Chen, J., Du, J., Ding, J., Jiang, H., and Shen, X. (2008) Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potently in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: enzymatic characterization with crystal structure analysis, *Protein Sci.*, **17**, 1066-1076, doi: 10.1110/ps.083495908.
11. Tassoni, R., van der Aart, L. T., Ubbink, M., van Wezel, G. P., and Pannu, N. S. (2017) Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **483**, 122-128, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.183.
12. Duff, S. M. G., Rydel, T. J., McClerren, A. L., Zhang, W., Li, J. Y., Sturman, E. J., Halls, C., Chen, S., Zeng, J., Peng, J., Kretzler, C. N., and Evdokimov, A. (2012) The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure, *Arch. Biochem. Biophys.*, **528**, 90-101, doi: 10.1016/j.abb.2012.06.006.
13. Bharath, S. R., Bisht, S., Harijan, R. K., Savithri, H. S., and Murthy, M. R. N. (2012) Structural and mutational studies on substrate specificity and catalysis of *Salmonella typhimurium* D-cysteine desulfhydrase, *PLoS One*, **7**, e36267, doi: 10.1371/journal.pone.0036267.
14. Braunstein, A. E. (1973) Amino group transfer, *The enzymes*, (Boyer, P., ed.) Academic Press, N.Y., pp. 379-481, doi: 10.1016/S1874-6047(08)60122-5.
15. Eliot, A. C., and Kirsch, J. F. (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations, *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 383-415, doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.074021.
16. Toney, M. D. (2011) Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1814**, 1407-1418, doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.019.
17. Soper, T. S., and Manning, J. M. (1981) Different modes of action of inhibitors of bacterial D-amino acid transaminase. A target enzyme for the design of new antibacterial agents, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4263-4268, doi: 10.1016/s0021-9258(19)69428-7.
18. Bakunova, A. K., Nikolaeva, A. Y., Rakitina, T. V., Isaikina, T. Y., Khrenova, M. G., Boyko, K. M., Popov, V. O., and Bezsudnova, E. Y. (2021) The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Halicomonobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme, *Molecules*, **26**, 5053, doi: 10.3390/molecules26165053.
19. Morrison, J. F., and Walsh, C. T. (1998) The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **61**, 201-301, doi: 10.1002/9780470123072.ch5.
20. Winter, G., Waterman, D. G., Parkhurst, J. M., Brewster, A. S., Gildea, R. J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I. D., Sauter, N. K., and Evans, G. (2018) DIALS: implementation and evaluation of a new integration package, *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, **74**, 85-97, doi: 10.1107/S2059798317017235.
21. Collaborative Computational Project, N. 4 (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **50**, 760-763, doi: 10.1107/S0907444994003112.
22. Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Crystallogr.*, **30**, 1022-1025, doi: 10.1107/S0021889897006766.
23. Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., and Vagin, A. A. (2011) REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **67**, 355-367, doi: 10.1107/S0907444911001314.
24. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2126-2132, doi: 10.1107/S0907444904019158.
25. Krissinel, E., and Henrick, K. (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **60**, 2256-2268, doi: 10.1107/S0907444904026460.
26. Beeler, T., and Churchich, J. E. (1976) Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase, *J. Biol. Chem.*, **251**, 5267-5271, doi: 10.1016/S0021-9258(17)33156-3.
27. Honikel, K. O., and Madsen, N. B. (1972) Comparison of the absorbance spectra and fluorescence behavior of phosphorylase b with that of model pyridoxal phosphate derivatives in various solvents, *J. Biol. Chem.*, **247**, 1057-1064, doi: 10.1016/S0021-9258(19)45615-9.
28. Delbaere, L. T. J., Kallen, J., Markovic-Housley, Z., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Karpeisky, M. Y., and Jansonius, J. N. (1989) Complexes of aspartate aminotransferase with hydroxylamine derivatives: spectral studies in solution and in the crystalline state, *Biochimie*, **71**, 449-459, doi: 10.1016/0300-9084(89)90175-2.
29. Okada, K., Hirotsu, K., Hayashi, H., and Kagamiyama, H. (2001) Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: induced fit and substrate recognition of the enzyme, *Biochemistry*, **40**, 7453-7463, doi: 10.1021/bi010384l.
30. Peisach, D., Chipman, D. M., Van Ophem, P. W., Manning, J. M., and Ringe, D. (1998) Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino

- acid aminotransferase, *Biochemistry*, **37**, 4958-4967, doi: 10.1021/bi972884d.
31. Marković-Housley, Z., Schirmer, T., Hohenester, E., Khomutov, A. R., Khomutov, R. M., Karpeisky, M. Y., Sandmeier, E., Christen, P., and Jansonius, J. N. (1996) Crystal structures and solution studies of oxime adducts of mitochondrial aspartate aminotransferase, *Eur. J. Biochem.*, **236**, 1025-1032, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.01025.x.
 32. Di Salvo, M. L., Contestabile, R., and Safo, M. K. (2011) Vitamin B(6) salvage enzymes: mechanism, structure and regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 1597-1608, doi: 10.1016/j.bbapap.2010.12.006.
 33. Thirstrup, K., Christensen, S., Møller, H. A., Ritzén, A., Bergström, A. L., Sager, T. N., and Jensen, H. S. (2011) Endogenous 2-oxoglutarate levels impact potencies of competitive HIF prolyl hydroxylase inhibitors, *Pharmacol. Res.*, **64**, 268-273, doi: 10.1016/j.phrs.2011.03.017.

MECHANISM OF D-CYCLOSERINE INHIBITION OF D-AMINO ACID TRANSAMINASE FROM *Haliscomenobacter hydrossis*

A. K. Bakunova^{1*}, I. O. Matyuta¹, A. Yu. Nikolaeva^{1,2}, K. M. Boyko¹,
V. O. Popov^{1,3}, and E. Yu. Bezsudnova^{1*}

¹ *Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia; e-mail: a.bakunova@fbras.ru, eubez@inbi.ras.ru*

² *Kurchatov Complex of NBICS-Technologies, National Research Centre "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia*

³ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

D-cycloserine inhibits pyridoxal-5'-phosphate (PLP)-dependent enzymes. The inhibition efficiency depends on the organization of their active center and the mechanism of the catalyzed reaction. D-cycloserine interacts with the PLP form of enzyme similarly to substrate amino donor, and the interaction is predominantly reversible. Inhibition products include hydroxyisoxazole-pyridoxamine-5'-phosphate, oxime between PLP and β -aminoxy-D-alanine, ketimine between pyridoxamine-5'-phosphate and cyclic or open forms of D-cycloserine, pyridoxamine-5'-phosphate, etc. For some enzymes the formation of a stable aromatic product – hydroxyisoxazole can lead to irreversible D-cycloserine inhibition at certain pH value. The aim of this work was to study the mechanism of D-cycloserine inhibition of PLP-dependent D-amino acid transaminase from the bacterium *Haliscomenobacter hydrossis*. Spectral methods revealed several products of the interaction of D-cycloserine with PLP in the active site of transaminase: oxime between PLP and β -aminoxy-D-alanine, ketimine between pyridoxamine-5'-phosphate and cyclic or open forms of D-cycloserine, pyridoxamine-5'-phosphate. The formation of hydroxyisoxazole-pyridoxamine-5'-phosphate was not observed. The 3D structure of the complex of transaminase with D-cycloserine was obtained by X-ray diffraction analysis. In the active site of transaminase, a ketimine adduct between pyridoxamine-5'-phosphate and D-cycloserine in the cyclic form was found; the ketimine occupied two positions and was coordinated via hydrogen bonds with different active site residues. Using kinetic and spectral methods we have shown that D-cycloserine inhibition is reversible, and the activity of transaminase from *H. hydrossis* can be restored by adding an excess of keto substrate as well as by adding an excess of cofactor. The results obtained confirm the reversibility of D-cycloserine inhibition and the conversion of various adducts of D-cycloserine and PLP into each other.

Keywords: D-amino acid transaminase, D-cycloserine, reversible inhibition, fluorescence, X-ray diffraction analysis

УДК 612.015;612.123;616.13-004.6;616.153.915;616.155.2;547.915.5;547.963

АДСОРБЦИЯ АЦИЛГИДРОПЕРОКСИ-ПРОИЗВОДНЫХ ФОСФОЛИПИДОВ БИОМЕМБРАН ЛИПОПРОТЕИДАМИ ПЛАЗМЫ КРОВИ

© 2023 В.З. Ланкин*, А.К. Тихазе, В.Я. Косач, Г.Г. Коновалова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова»
Минздрава России, 121552 Москва, Россия; электронная почта: lankin0309@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2023

После доработки 21.03.2023

Принята к публикации 21.03.2023

Установлено, что ацилгидроперокси-производные фосфолипидов окисленных митохондрий печени крысы при совместной инкубации с липопротеидами плазмы крови захватываются преимущественно частицами липопротеидов низкой плотности (ЛНП), но не липопротеидов высокой плотности (ЛВП), что опровергает ранее высказанную гипотезу об участии ЛВП в обратном транспорте окисленных фосфолипидов и подтверждает возможность различных механизмов накопления липогидропероксидов в ЛНП при окислительном стрессе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: окисленные фосфолипиды, трансмембранный перенос липопероксидов, липопротеиды низкой плотности (ЛНП), липопротеиды высокой плотности (ЛВП).

DOI: 10.31857/S0320972523050123, EDN: AZFLNP

ВВЕДЕНИЕ

Транспорт липидов в организме осуществляется липопротеидами плазмы крови, которые представлены двумя основными классами — липопротеиды низкой плотности (ЛНП) и липопротеиды высокой плотности (ЛВП). Частицы (наночастицы по размеру) этих классов липопротеидов существенно различаются по метаболическим функциям, а также по размеру и химическому составу [1–4]. Частицы ЛВП содержат апопротеины A₁, C₂ и E [1–4], тогда как частицы больших по размеру ЛНП содержат только апопротеин B-100 [1–4]. ЛНП, образующиеся в печени, транспортируют липиды в периферические ткани, а ЛВП осуществляют обратный транспорт липидов в печень [5–8]. Показано, что накопление окисленных ЛНП является основным событием, приводящим к возникновению и прогрессированию атеросклероза [9–11]. В то же время высокий уровень ЛВП защищает от развития атеросклероза [12, 13].

Единственный белок частиц ЛНП (апопротеин B-100) может подвергаться химиче-

ской модификации с участием низкомолекулярных дикарбониллов, образующихся при свободнорадикальном окислении полиеновых липидов (таких, как малоновый диальдегид — МДА) и при ферментативном окислении или автоокислении глюкозы и других 6-атомных углеводов (таких, как глиоксаль и метилглиоксаль) [14–16]. Частицы дикарбонил-модифицированных ЛНП опознаются scavenger-рецепторами и захватываются клетками сосудистой стенки, вследствие чего они превращаются в обогащенные липидами «пенистые клетки» [11, 14–17]. Пенистые клетки образуют в стенке сосудов первичные предатерогенные липоидозные повреждения сосудов при атеросклерозе и диабете [11, 14–17]. Частицы окисленных ЛНП могут связываться также со scavenger-рецептором LOX-1 эндотелиоцитов, что индуцирует экспрессию NADPH-оксидазы и генерирование супероксидных анион-радикалов [15, 16, 18]. Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК) в конечном итоге стимулирует апоптоз и приводит к дисфункции эндотелия [15, 16, 18]. Таким образом, очевидно, что окислительные превращения липопротеидов могут играть ведущую роль в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов при атерогенезе и диабетогенезе [14, 15]. Исходя из результатов собственных исследований и литературных

Принятые сокращения: ЛНП — липопротеиды низкой плотности; ЛВП — липопротеиды высокой плотности; ЛООН — липогидропероксиды.

* Адресат для корреспонденции.

данных, нами была сформулирована гипотеза о едином механизме повреждения стенки сосудов при атеросклерозе и сахарном диабете, ведущую роль в котором играет накопление дикарбонил-модифицированных ЛНП [15, 19]. Частицы ЛНП весьма подвержены инициации свободнорадикального окисления в наружном фосфолипидном монослое, тогда как частицы ЛВП достаточно устойчивы к липопероксидации [20]. Тем не менее было показано, что частицы ЛВП могут не только ингибировать окисление ЛНП при совместной инкубации этих частиц *in vitro* [21], но и осуществлять антиоксидантный эффект (подавлять окисление ЛНП) в кровотоке *in vivo* [22, 23]. Кроме того, была высказана гипотеза о том, что частицы ЛВП способны акцептировать окисленные фосфолипиды с надмолекулярных липид-белковых комплексов (липопротеидов и биомембран) и транспортировать их в печень, где происходит ферментативная детоксикация липопероксидов [24]. К сожалению, эта гипотеза не получила строгого экспериментального подтверждения с использованием адекватных подходов и методов, позволяющих получить неопровержимые однозначные результаты [25, 26]. Исходя из вышесказанного, в настоящей работе с помощью оригинальной методологии исследовали способность частиц ЛНП и ЛВП адсорбировать гидроперокси-производные фосфолипидов с поверхности окисленных биомембран.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изолирование разных классов (ЛНП, ЛВП) и субфракций (ЛВП₂, ЛВП₃) липопротеидов при помощи препаративного ультрацентрифугирования. Препаративное выделение ЛНП, общей фракции ЛВП и подфракций ЛВП₂ и ЛВП₃, из плазмы крови практически здоровых доноров проводили методом центрифугирования в градиенте плотности NaBr на ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman», США) с использованием ранее описанной процедуры [20, 27]. Выделение липопротеидов разных классов проводили из трех образцов плазмы крови, полученных от трех разных здоровых доноров. Пробирки для отбора крови содержали ЭДТА (1 мМ) в качестве антикоагулянта и антиоксиданта. Содержание белка в образцах, изолированных и очищенных диализом липопротеидов [20], определяли по методу Лоури.

Выделение митохондрий печени крысы и их свободнорадикальное окисление. Для выделения митохондрий печень крыс (самцы линии WKY,

250–300 г) перфузировали охлажденным изотоничным раствором KCl и гомогенизировали (1 : 10, вес/объем) в гомогенизаторе Поттера с тефлоновым пестиком в среде, содержащей 0,25 М раствор сахарозы, 10 мМ MOPS и 1 мМ ЭДТА [28]. Ядра и дебрис осаждали при 700 g в течение 10 мин в рефрижераторной центрифуге Eppendorf 5804 R («Eppendorf», Германия), и супернатант подвергали повторному центрифугированию при 8000 g в течение 10 мин для осаждения «тяжелых» митохондрий [28]. Осадок ресуспендировали в среде выделения без ЭДТА и дважды переосаждали митохондрии, после чего органеллы вновь ресуспендировали (1 мг белка/мл) в изотоничном K/Na-фосфатном буфере (pH 7,4). Свободнорадикальное окисление полиеновых фосфолипидов митохондриальных мембран индуцировали внесением 0,5 мМ аскорбата для восстановления эндогенного железа. Кинетику свободнорадикального окисления митохондрий в аэробных условиях измеряли по накоплению липогидропероксидов (LOOH), содержащих конъюгированную двойную связь, по поглощению при 233 нм на спектрофотометре UV-2600 («Shimadzu», Япония) с интегрирующей сферой ISR-2600, позволяющей проводить анализы в мутных средах. После 4-часовой инкубации (достижение плато на кинетической кривой) окисление митохондрий ингибировали внесением ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ.

Исследование переноса ацилгидроперокси-производных фосфолипидов окисленных мембран митохондрий в частицы липопротеидов при их совместной инкубации. Осадок окисленных митохондрий ресуспендировали в среде, содержащей изотоничный K/Na-фосфатный буфер (pH 7,4) и 1 мМ ЭДТА, дважды переосаждали при 8000 g в течение 10 мин, и осадок вновь ресуспендировали (1 мг белка/мл) в изотоничном K/Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 1 мМ ЭДТА. После этого в среду с окисленными митохондриями вносили ЛНП, ЛВП или субфракции ЛВП₂ и ЛВП₃ (200 мкг белка/мл) и проводили инкубацию в течение 6 ч. Через определенные интервалы времени отбирали аликвоты инкубационной среды, центрифугировали при 10 000 g в течение 15 мин для осаждения митохондрий и фрагментов их мембран, а затем в супернатанте, содержащем только частицы липопротеидов, по поглощению конъюгированных диенов при 233 нм, измеряли содержание LOOH. Эксперименты повторяли три раза, используя в каждом опыте липопротеиды, полученные от отдельных доноров. Разработанная нами методология позволила

быстро отделять окисленные мембраны от частиц липопротеидов и наблюдать кинетику накопления LOOH в ЛНП и ЛВП. Расчеты количества LOOH на одну частицу ЛНП и ЛВП проводили, исходя из определения в них апопротеида В-100 и апопротеида А-1 соответственно, как описано ранее [20]. Содержание LOOH (ΔD_{233}) в частицах ЛНП и ЛВП рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $22\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$. Концентрацию LOOH на 1 частицу ЛНП и ЛВП рассчитывали, исходя из содержания апопротеина В-100 в частицах ЛНП и апопротеина А₁ в частицах ЛВП (каждый из этих апопротеинов присутствует в количестве 1 молекулы на частицу ЛНП и ЛВП соответственно). Содержание апопротеина В-100 и апопротеина А₁ измеряли на химическом анализаторе Architect С8000 («Abbott», США) при использовании соответствующих тест-наборов этой же фирмы [20].

Статистический анализ. Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакетов программного обеспечения STATISTICA 10 («Statsoft», США), MedCalc version 12.7.0.0 («MedCalc Software», Бельгия) и Microsoft Excel 2010, версия 14.0.7263.5000, представляя данные как среднее $\pm$ ошибка среднего. Поскольку анализ данных показал, что распределение признаков во всех случаях отличается от нормального, для статистического анализа применяли непараметрические методы статистики. Анализ различий количественных показателей при межгрупповых сравнениях выполняли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U-test). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

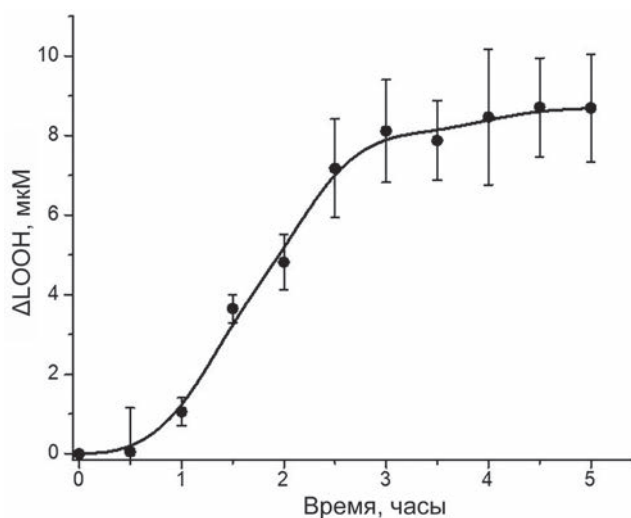


Рис. 1. Кинетика свободнорадикального окисления наружных мембран митохондрий печени крысы. Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы»

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Свободнорадикальное окисление наружных мембран митохондрий печени крысы. Кинетика свободнорадикального окисления наружных мембран митохондрий печени крысы представлена на рис. 1. Как видно из рассмотрения кинетической кривой, после 3-часовой инкубации дальнейшего окисления полиеновых фосфолипидов митохондриальных мембран практически не происходит (рис. 1).

В связи с этим через 3 ч после начала инкубации отбирали основное количество инкубационной среды, содержащей митохондрии, и их окисление останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 1 мМ для связывания катализирующих окисление ионов металлов переменной валентности. После 3-кратного переосаждения окисленных митохондрий для удаления фрагментов мембран и растворимых низкомолекулярных продуктов окисления полученные окисленные «тяжелые» митохондрии использовали для исследования абсорбции ацилгидроперокси-содержащих фосфолипидов митохондриальных мембран изолированными частицами неокисленных ЛНП и ЛВП.

Исследование кинетики абсорбции ацилгидроперокси-содержащих фосфолипидов митохондриальных мембран частицами ЛНП и ЛВП. Результаты исследования возможности переноса ацилгидроперокси-производных фосфолипидов с окисленных биомембран на частицы ЛНП и ЛВП представлены на рис. 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что нативные частицы ЛНП при совместной

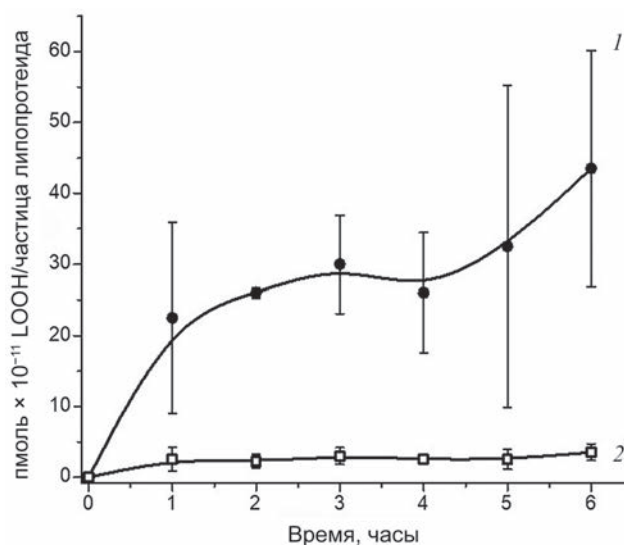


Рис. 2. Кинетика встраивания ацилгидроперокси-производных фосфолипидов из подвергнутых свободнорадикальному окислению мембран митохондрий печени крысы в частицы ЛНП (кривая 1) и ЛВП (кривая 2). Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы»

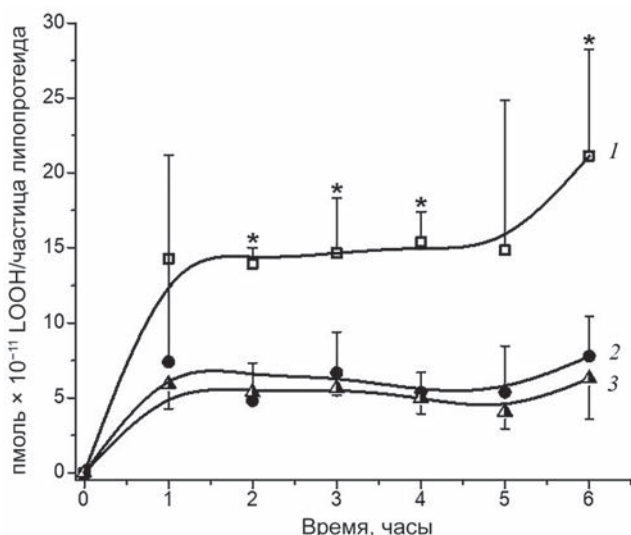


Рис. 3. Кинетика встраивания ацилгидроперокси-производных фосфолипидов из подвергнутых свободнорадикальному окислению мембран митохондрий печени крысы в общую фракцию частиц ЛВП (кривая 1), частицы ЛВП₂ (кривая 2) и ЛВП₃ (кривая 3). Отличия величин встраиваемых LOOH для частиц ЛВП₂ и ЛВП₃ статистически не достоверны на всех сроках наблюдения; * — отличия величин встраиваемых LOOH для общей фракции ЛВП и ЛВП₂ или ЛВП₃ статистически значимы при $p < 0,05$. Условия эксперимента приведены в разделе «Материалы и методы»

инкубации с окисленными митохондриями преимущественно захватывают ацилгидроперокси-производные фосфолипидов (рис. 2, кривая 1), тогда как скорость дрейфа окисленных фосфолипидов с биомембран на частицы ЛВП весьма незначительна (рис. 2, кривая 2). Кинетика абсорбции окисленных фосфолипидов субфракциями ЛВП — ЛВП₂ и ЛВП₃ — приведена на рис. 3.

Из рассмотрения рис. 3 можно сделать вывод, что абсорбция ацилгидроперокси-производных фосфолипидов окисленных митохондриальных мембран частицами ЛВП₂ и ЛВП₃ достоверно не отличается (рис. 3, кривые 2 и 3), но статистически значимо ниже абсорбции окисленных фосфолипидов частицами общей фракции ЛВП (рис. 3, кривая 1) на всех сроках наблюдения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные нами результаты (рис. 2) противоречат высказанной ранее гипотезе о возможности обратного транспорта окисленных липидов частицами ЛВП в печень [24]. Следует отметить, что принципиальная возможность переноса ацилгидроперокси-производных фосфолипидов с окисленных мембран эритроцитов («теней» эритроцитов) на ЛНП при

совместной инкубации была продемонстрирована ранее [28] и не представляется чем-то необычным. Многочасовое окисление теней эритроцитов использовали и в других работах [29], тем не менее при длительной инкубации с инициаторами свободнорадикального окисления образуется большое количество вторичных продуктов альдегидной природы [16], наличие которых может быть источником артефактов [16]. Необходимо отметить, что мембраны эритроцитов не являются удачным объектом для такого рода экспериментов, поскольку, в отличие от микросом и митохондрий печени, эритроциты весьма резистентны даже к ферментативной липопероксидации [30]. В соответствии с полученными нами данными, частицы ЛНП, в отличие от ЛВП, способны не только легко подвергаться эффективному свободнорадикальному окислению [20], но и захватывать окисленные фосфолипиды с других липид-белковых надмолекулярных комплексов при контакте с ними (рис. 2). Деструкция накопленных в ЛНП гидроперокси-производных фосфолипидов, несомненно, должна вызывать атерогенную модификацию частиц ЛНП вторичными продуктами окисления — низкомолекулярными дикарбонилами, такими как 4-гидрокси-2-ноненаль и МДА [14, 16, 17], что способствует прогрессированию атерогенеза [14–17]. Тем не менее имеются данные о возможности активного переноса окисленных липидов из наружного фосфолипидного слоя частиц ЛНП в частицы ЛВП при их совместной инкубации, при этом окисленные липиды из гидрофобного ядра частиц ЛНП в ЛВП не транспортируются, причем окисленные ЛВП теряют способность адсорбировать липопероксиды окисленных ЛНП [31]. Действительно, ацилгидроперокси-производные фосфолипидов наружного слоя частиц ЛНП являются значительно более полярными, чем неокисленные фосфолипиды [32]. Гидропероксиацилы фосфолипидов вследствие этого «выдвинуты» в водную фазу [32] и, вероятно, могут более эффективно обмениваться с другими липид-белковыми надмолекулярными комплексами при их контакте. Несмотря на то что именно субфракциям ЛВП — ЛВП₂ и ЛВП₃ — приписывают кардиопротекторный эффект [33–35], согласно полученным нами данным (рис. 3), он, если и существует, по всей вероятности, не связан с предполагавшейся способностью этих липопротеидов [24–26] участвовать в детоксикации липогидропероксидов. При рассмотрении рис. 3 видно, что суммарная абсорбция LOOH субфракциями ЛВП₂ и ЛВП₃ ниже (кривые 2 и 3), чем абсорбция LOOH

общей фракцией ЛВП (кривая 1). Это кажущееся противоречие может быть связано с тем, что в общей фракции ЛВП количество субфракций не исчерпывается только ЛВП₂ и ЛВП₃ [33]. Кроме того, при процедуре препаративного выделения ЛВП₂ и ЛВП₃ могут удаляться окисленные формы этих субфракций, присутствующие в общей фракции ЛВП [35].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные свидетельствуют о существовании различных механизмов, приводящих к обогащению «атерогенных» частиц ЛНП первичными продуктами свободнорадикального окисления, что в конечном итоге лишний раз подтверждает опасность патогенетически важной окислительной трансформации этих частиц *in vivo* [14–16]. «Антиоксидантное» действие ЛВП [36] может быть связано с присутствием в частицах этих липопротеидов параоксоназы-1, способной восстанавливать липопероксиды в частицах ЛНП при их совместной инкубации с ЛВП [29, 37]. Очевидно, что для доказательства этого механизма утилизации липопероксидов в плазме крови *in vivo* необходимы убедительные результаты, свидетельствующие об эффективном обмене окисленных фосфолипидов частиц ЛНП с частицами ЛВП. К сожалению, в настоящее время такого рода данные в доступ-

ной литературе отсутствуют. Несомненно, одно — обогащение частиц ЛНП окисленными липидами, как показывают полученные нами результаты, может происходить как при их интенсивном свободнорадикальном окислении, так и при захвате окисленных липидов с мембран клеток крови (эритроцитов и т.д.). Оба эти процесса должны способствовать увеличению атерогенности окислительно модифицированных ЛНП, т.е. способствовать их вовлечению в процесс повреждения стенки сосудов [14–16].

Вклад авторов. Ланкин В.З. — руководство работой, обсуждение результатов; Тихазе А.К. — написание и редактирование статьи; Косач В.Я., Коновалова Г.Г. — проведение экспериментов, подготовка статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

Благодарности. Авторы признательны А.В. Дорожку за помощь в проведении отдельных экспериментов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием животных, соответствовали этическим стандартам учреждения, в котором проводились исследования, и утвержденным правовым актам РФ и международных организаций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tomkin, G. H. (2010) Atherosclerosis, diabetes and lipoproteins, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, **8**, 1015–1029, doi: 10.1586/erc.10.45.
2. Arnao, V., Tuttolomondo, A., Daidone, M., and Pinto, A. (2019) Lipoproteins in atherosclerosis process, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 1525–1543, doi: 10.2174/0929867326666190516103953.
3. Getz, G. S., and Reardon, C. A. (2020) Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins, *Curr. Opin. Lipidol.*, **31**, 286–290, doi: 10.1097/MOL.0000000000000704.
4. Wang, H. H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., Wang, D. H. (2017) Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: recent advances in reverse cholesterol transport, *Ann. Hepatol.*, **16** (Suppl. 1), s27–s42, doi: 10.5604/01.3001.0010.5495.
5. Lee, J. M. S., and Choudhury, R. P. (2010) Atherosclerosis regression and high-density lipoproteins, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, **8**, 1325–1334, doi: 10.1586/erc.10.108.
6. Brewer, H. B. Jr. (2011) Clinical review: the evolving role of HDL in the treatment of high-risk patients with cardiovascular disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**, 1246–1257, doi: 10.1210/jc.2010-0163.
7. Hernáez, Á., Soria-Florido, M. T., Schröder, H., Ros, E., Pintó, X., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Corella, D., Arós, F., Serra-Majem, L., Martínez-González, Á. M., Fiol, M., Lapetra, J., Elosua, R., Lamuela-Raventós, R. M., and Fitó, M. (2019) Role of HDL function and LDL atherogenicity on cardiovascular risk: a comprehensive examination, *PLoS One*, **14**, e0218533, doi: 10.1371/journal.pone.0218533.
8. Carr, S. S., Hooper, A. J., and Sullivan, D. R. (2019) Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment, *Pathology*, **51**, 148–154, doi: 10.1016/j.pathol.2018.11.006.
9. Steinberg, D., and Witztum, J. L. (2002) Is the oxidative modifications hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date reflect the hypothesis? *Circulation*, **105**, 2107–2111, doi: 10.1161/01.CIR.0000014762.06201.06.

10. Parthasarathy, S., Santanam, N., and Auye, N. (1998) Oxidised low-density lipoprotein: a two-faced Janus in coronary artery disease? *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 279-284, doi: 10.1016/S0006-2952(98)00074-4.
11. Khatana, C., Saini, N. K., Chakrabarti, S., Saini, V., Sharma, A., Saini, R.V., and Saini, A. K. (2020) Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein induced atherosclerosis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020**, 1-14, doi: 10.1155/2020/5245308.
12. Barter, P. J., and Rye, K. A. (1996) High-density lipoproteins and coronary heart disease, *Atherosclerosis*, **121**, 1-12, doi: 10.1016/0021-9150(95)05675-0.
13. Rubins, H. B., Robins, S. J., Collins, D., Fye, C. L., and Anderson, J. W. (1999) Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans affairs high-density lipoprotein cholesterol intervention trial study group, *N. Engl. J. Med.*, **341**, 410-418, doi: 10.1056/NEJM199908053410604.
14. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.
15. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of ldl as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants*, **11**, 1565, doi: 10.3390/antiox11081565.
16. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2023) Malondialdehyde as a important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *J. Int. Mol. Sci.*, **24**, 128, doi: 10.3390/ijms24010128.
17. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kumskova, E. M. (2012) Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein, *Mol. Cell Biochem.*, **365**, 93-98, doi: 10.1007/s11010-012-1247-5.
18. Sun, Y., and Chen, X. (2011) Ox-LDL-induced LOX-1 expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **25**, 572-579, doi: 10.1111/j.1472-8206.2010.00885.x.
19. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Kumskova, E. M., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of the free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
20. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kosach, V. Ya. (2022) Comparative susceptibility to oxidation of different classes of blood plasma lipoproteins, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 1335-1341, doi: 10.1134/S0006297922110128.
21. Raveh, O., Pinchuk, I., Fainaru, M., and Lichtenberg, D. (2001) Kinetics of lipid peroxidation in mixtures of HDL and LDL, mutual effects, *Free Radic. Biol. Med.*, **31**, 1486-1497, doi: 10.1016/S0891-5849(01)00730-4.
22. Fumiaki, I., and Tomoyuki, I. (2020) High-density lipoprotein (HDL) triglyceride and oxidized HDL: new lipid biomarkers of lipoprotein-related atherosclerotic cardiovascular disease, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 362, doi: 10.3390/antiox9050362.
23. Bowry, V. W., Stanley, K. K., and Stocker, R. (1992) High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10316-10320, doi: 10.1073/pnas.89.21.10316.
24. Klimov, A. N., Nikiforova, A. A., Kuzmin, A. A., Kuznetsov, A. S., and Mackness, M. I. (1998) Is high density lipoprotein a scavenger for oxidized phospholipids of low density lipoprotein? In *Advances in Lipoprotein and Atherosclerosis Research, Diagnostics and Treatment*, Jena, Gustav Fisher Verlag, pp. 78-82.
25. Klimov, A. N., Kozhemyakin, L. A., Pleskov, V. M., and Andreeva, L. I. (1987) Antioxidative effect of high density lipoproteins in the oxidation of low density lipoproteins, *Bull. Expt. Biol. Med.*, **103**, 550-556, doi: 10.1007/BF00841817.
26. Klimov, A. N., Gurevich, V. S., Nikiforova, A. A., Shatilina, L. V., Kuzmin, A. A., Plavinsky, S. L., and Teryukova, N. P. (1993) Antioxidative activity of high density lipoproteins in vivo, *Atherosclerosis*, **100**, 13-18, doi: 10.1016/0021-9150(93)90063-z.
27. Lindgren, F. T. (1975) Preparative ultracentrifugal laboratory procedures and suggestions for lipoprotein analysis, in *Analysis of Lipids and Lipoproteins* (Perkins, E. G., ed) Champaign: Amer. Oil. Chemists Soc., pp. 204-224.
28. Vila, A., Korytowski, W., and Girotti, A. W. (2002) Spontaneous transfer of phospholipid and cholesterol hydroperoxides between cell membranes and low-density lipoprotein: assessment of reaction kinetics and prooxidant effects, *Biochemistry*, **41**, 13705-13716, doi: 10.1021/bi026467z.
29. Mastorikou, M., Mackness, B., Liu, Y., and Mackness, M. (2008) Glycation of paraoxonase-1 inhibits its activity and impairs the ability of high-density lipoprotein to metabolize membrane lipid hydroperoxides, *Diabetic Med.*, **25**, 1049-1055, doi: 10.1111/j.1464-5491.2008.02546.x.
30. Lankin, V. (2003) The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation, in *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*, Amsterdam etc.: IOS Press, 2003, NATO Science Series, **344**, pp. 8-23.
31. Rasmiena, A. A., Barlow, C. K., Ng, T. W., Tull, D., and Meikle, P. J. (2016) High density lipoprotein efficiently accepts surface but not internal oxidised lipids from oxidised low density lipoprotein,

- Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 69-77, doi: 10.1016/j.bbalip.2015.11.002.
32. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Osis, Yu. G. (2002) Modeling the cascade of enzymatic reactions in liposomes including successive free radical peroxidation, reduction, and hydrolysis of phospholipid polyenoic acyls for studying the effect of these processes on the structural-dynamic parameters of the membranes, *Biochemistry (Moscow)*, **67**, 566-574, doi: 10.1023/a:1015502429453.
 33. Superko, H. R., Pendyala, L., Williams, P. T., Momary, K. M., King, S. B., and Garrett, B. C. (2012) High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease, *J. Clin. Lipidol.*, **6**, 496-523, doi: 10.1016/j.jacl.2012.03.001.
 34. Williams, P. T., and Feldman, D. E. (2011) Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort, *Atherosclerosis*, **214**, 196-202, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.10.024.
 35. Honda, H., Hirano, T., Ueda, M., Kojima, S., Mashiba, S., Hayase, Y., Michihata, T., and Shibata, T. (2016) High-density lipoprotein subfractions and their oxidized subfraction particles in patients with chronic kidney disease, *J. Atheroscler. Thromb.*, **23**, 81-94, doi: 10.5551/jat.30015.
 36. Mackness, B., and Mackness, M. (2012) The antioxidant properties of high-density lipoproteins in atherosclerosis, *Panminerva Med.*, **54**, 83-90.
 37. Mackness, M., and Mackness, B. (2013) Targeting paraoxonase-1 in atherosclerosis, *Expert Opin. Ther. Targets.*, **17**, 829-837, doi: 10.1517/14728222.2013.790367.

ADSORPTION OF ACYLHYDROPEROXY-DERIVED PHOSPHOLIPIDS FROM BIOMEMBRANES BY BLOOD PLASMA LIPOPROTEINS

V. Z. Lankin*, A. K. Tikhaze, V. Y. Kosach, and G. G. Konovalova

*National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E. I. Chazov,
Ministry of Health of the Russian Federation,
121552 Moscow, Russia; e-mail: lankin0309@mail.ru*

It has been established that acylhydroperoxy derivatives of phospholipids of oxidized rat liver mitochondria during co-incubation with blood plasma lipoproteins are captured predominantly by LDL particles but not by HDL, which refutes the previously stated hypothesis about the involvement of HDL in the reverse transport of oxidized phospholipids and confirms the possibility of different mechanisms of lipohydroperoxide accumulation in LDL during oxidative stress.

Keywords: oxidized phospholipids, transmembrane transport of lipoperoxides, low-density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL)

УДК 577.34

ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ЭКСИТОННАЯ РЕЛАКСАЦИЯ В ХЛОРОСОМАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ ЗЕЛЁНОЙ БАКТЕРИИ *Chloroflexus aurantiacus*

© 2023 А.Г. Яковлев*, А.С. Таисова, З.Г. Фетисова

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119992 Москва, Россия; электронная почта: yakov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 30.01.2023

После доработки 20.03.2023

Принята к публикации 31.03.2023

В зелёных бактериях *Chloroflexus* (*Cfx.*) *aurantiacus* процесс фотосинтеза начинается с поглощения света хлоросомами — периферическими антеннами, состоящими из тысяч молекул бактериохлорофилла *c* (БХл *c*), объединённых в олигомерные структуры. При этом в БХл *c* образуются возбуждённые состояния, энергия которых мигрирует по хлоросоме по направлению к базовой пластинке и далее к реакционному центру, где происходит первичное разделение зарядов. Миграция энергии сопровождается безызлучательными электронными переходами между многочисленными экситонными состояниями, то есть экситонной релаксацией. В настоящей работе мы изучали динамику экситонной релаксации в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* с помощью разностной фемтосекундной спектроскопии при криогенной температуре (80 К). Хлоросомы возбуждались световыми импульсами длительностью 20 фс на длинах волн в диапазоне от 660 до 750 нм, а разностные (свет—темнота) кинетики поглощения измерялись на длине волны 755 нм. Математический анализ полученных данных выявил кинетические компоненты с характерными временами 140, 220 и 320 фс, отвечающие за экситонную релаксацию. По мере уменьшения длины волны возбуждения количество и относительный вклад этих компонент увеличивались. Теоретическое моделирование полученных данных было проведено на основе представлений о цилиндрическом строении агрегатов БХл *c*. Безызлучательные переходы между группами экситонных полос описывались системой кинетических уравнений. Наиболее адекватной оказалась модель, учитывающая энергетический и структурный беспорядок хлоросом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, зелёные бактерии, *Chloroflexus aurantiacus*, хлоросома, фемтосекундная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0320972523050135, **EDN:** AZKOVQ

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез отвечает за преобразование солнечной энергии в химическую энергию стабильных соединений, что в конечном счёте обуславливает само существование живой природы, производя кислород и органику на нашей планете. При всём многообразии фотосинтезирующих организмов первичный этап фотосинтеза у них одинаковый — это поглощение солнечного света специальными пигментами, объединёнными в светособирающие структуры, и передача энергии возбуждённых состояний этих пигментов в реакционные цен-

тры, где происходит разделение зарядов [1]. Энергия разделённых зарядов используется далее для синтеза химических соединений. Квантовая эффективность первичных стадий природного фотосинтеза близка к 100%, что пока недостижимо для искусственных преобразователей солнечной энергии. Эта уникальная особенность побуждает исследовать первичный фотосинтез на протяжении десятилетий.

Зелёные фотосинтезирующие бактерии обитают в условиях дефицита солнечного света, что обуславливает огромные размеры и сложную структуру их светособирающих комплексов — хлоросом. Типичная хлоросома (рис. 1) состоит

Принятые сокращения: БХл — бактериохлорофилл; ΔA — разность поглощения (свет—темнота); τ_{1-6} — характерное время кинетических компонент; $\lambda_{\text{возб.}}$ — длина волны возбуждения; $\lambda_{\text{зонд.}}$ — длина волны зондирования.

* Адресат для корреспонденции.

из 10^4 – 10^5 молекул бактериохлорофилла (БХл) *c*, *d*, *e* и имеет форму эллипсоида размером 100 – 200×40 – 100×10 – 30 нм, прикреплённого к внутренней стороне цитоплазматической мембраны [2]. Многочисленные исследования по спектроскопии хлоросом с помощью разнообразных методик показали сильную олигомеризацию молекул БХл в них [3–6]. Было показано, что в основе пространственной структуры хлоросом лежат квазилинейные цепи молекул БХл [5]. Олигомеризация молекул основного пигмента в хлоросомах происходит в основном благодаря образованию водородных связей между соседними молекулами [7–8]. В отличие от большинства других светособирающих комплексов, олигомеризация в хлоросомах происходит по принципу самоагрегации, то есть не требует наличия жёсткой белковой матрицы. Небольшое количество белка содержится только в оболочке хлоросом и в базовой пластинке, соединяющей хлоросому с мембраной [2, 9]. Эта уникальная особенность хлоросом позволяет рассматривать их в качестве прообраза для будущих искусственных преобразователей солнечной энергии. Базовая пластинка содержит молекулы БХл *a*, вмонтированные в белковую матрицу. Хлоросомы также содержат небольшое количество каротиноидов, выполняющих важную роль фотопротекции [9]. Оказалось, что зелёные бактерии одного и того же вида, живущие при разных интенсивностях света, отличаются размерами хлоросом: чем меньше световой поток, тем больше хлоросома [10, 11].

Пространственная организация хлоросом дебатировалась на протяжении многих лет, однако единого мнения пока не достигнуто [5, 12–19]. Определить координаты всех атомов хлоросом можно только с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов, однако получить такие кристаллы пока не удаётся. Данные электронной микроскопии хлоросом указывают на цилиндрические структуры диаметром 5–10 нм, расположенные параллельно их

длинной оси [13, 14]. Комбинируя эти данные с данными спектроскопии, было предложено несколько моделей пространственной структуры хлоросом [3, 9, 12, 15]. Согласно одной из них, хлоросома зелёной бактерии *Chloroflexus (Cfx.) aurantiacus* состоит из 10–20 полых цилиндрических структур (рис. 1), каждая из которых образована шестью параллельными цепями молекул БХл *c* [12]. Альтернативная модель предполагает наличие изогнутых параллельных плоскостей (ламелл), образованных двумерными агрегатами БХл [16]. Комбинация методов направленного мутагенеза, спектроскопии одиночных хлоросом и криоэлектронной микроскопии привела к представлению о концентрических спиральных нанотрубках, образованных слоями молекул БХл различной ориентации [17]. Ряд моделей предполагает структуру молекулярных агрегатов в виде рулонов или полуцилиндров [18, 19]. Принимая во внимание гетерогенность оптических свойств хлоросом, можно предположить, что все из перечисленных выше типов структур могут быть представлены в них.

В результате поглощения света хлоросомами образуются возбуждённые состояния олигомеров БХл. Теоретическое моделирование показало, что оптический спектр поглощения этих олигомеров состоит из большого количества экситонных полос, распределённых по нескольким группам [20]. Сильное перекрытие этих полос приводит к гладкому профилю интенсивной Q_y полосы поглощения хлоросом в красной области спектра. Миграция энергии возбуждения по олигомерам БХл в хлоросомах исследовалась в рамках различных экспериментальных и теоретических подходов [12, 20–30]. В цилиндрической модели хлоросом перенос энергии внутри отдельных цилиндров и между соседними цилиндрами занимает около 100 фс [30]. За 250 фс точечное возбуждение охватывает всю хлоросому, а через 500 фс оно концентрируется в тех агрегатах, которые

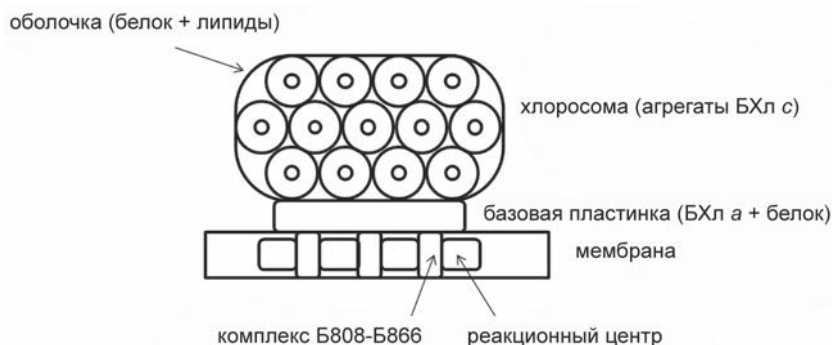


Рис. 1. Упрощённая структурная схема хлоросомы *Cfx. aurantiacus* (поперечный разрез) согласно цилиндрической модели

непосредственно примыкают к базовой пластинке. Таким образом, поток энергии направлен к базовой пластинке перпендикулярно главной оси хлоросомы и осям цилиндров. Далее происходит перенос энергии на молекулы БХл *a* базовой пластинки с характерным временем от одной до нескольких десятков пс, зависящем от вида бактерий и размера их хлоросом. Перенос энергии к реакционному центру также происходит в пикосекундном диапазоне. Миграция энергии по хлоросоме сопровождается её релаксацией, которая носит сложный экситонно-колебательный характер и происходит с характерным временем от ≤ 100 до 300 фс [22, 27–29, 31, 32]. В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* экситонная релаксация была обнаружена при криогенной [22] и комнатной [28, 31, 32] температурах, хотя в более ранней работе [21] сообщалось о неудачной попытке обнаружения этого довольно слабого процесса. Отметим, что изучение процессов релаксации энергии в хлоросомах важно для углубления знаний о связи структуры и функции этих уникальных природных объектов.

Процессы миграции, переноса и трансформации энергии отражаются в кинетиках изменения поглощения (свет–темнота) хлоросом, в которых представлены несколько компонент, отличающихся по характерному времени. В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* основная кинетическая компонента полосы Q_y БХл *c* имеет время жизни порядка 10 пс и отражает перенос энергии БХл *c* $\rightarrow$ БХл *a* [12, 21, 33]. Кроме этой компоненты, указанные кинетики содержат несколько более быстрых компонент с характерными временами порядка 1–2 и 0,1 пс [21–25]. Показано, что компонента 1–2 пс отражает перенос энергии БХл *c* $\rightarrow$ БХл *a*. Что касается самой быстрой компоненты 0,1 пс, то единого мнения о её происхождении нет. Скорее всего, эта компонента отражает некогерентную миграцию энергии между различными агрегатами хлоросомы [30], однако не исключена и её когерентная природа.

На примере хлоросомы зелёных бактерий природа демонстрирует изящный способ создания внешне простого устройства для высокоэффективного улавливания и переноса световой энергии. Для этого требуется определённое количество однотипных молекул, способных поглощать свет и одновременно способных к самоагрегации. Экситонное взаимодействие молекул пигмента обеспечивает высокую скорость миграции энергии, которая в конечном счёте переносится на реакционный центр, где происходит первичное разделение зарядов. При этом в хлоросоме отсутствует жёсткая матрица,

которая задаёт взаимное расположение молекул пигмента. Оптимальная пространственная конфигурация этих молекул в хлоросоме получается «сама собой» только благодаря олигомеризации. В результате хлоросома по своим физическим свойствам в чём-то напоминает жидкий кристалл. Несомненно, воспроизведение уникальных свойств хлоросом в работах по искусственному фотосинтезу поможет в создании высокоэффективных преобразователей солнечной энергии. Актуальность изучения хлоросом не ограничивается тематикой искусственного фотосинтеза. Построение адекватной математической модели переноса энергии в хлоросомах далеко от завершения, хотя отдельные стороны этого явления отражены теоретически достаточно полно (обзор в работе Яковлева и соавт. [1]). Эта модель должна органично учитывать как экситонное взаимодействие пигментов между собой, так и экситонно-колебательное взаимодействие пигментов с окружением. В этом контексте получение новой информации об экситонной релаксации в хлоросомах представляется актуальным.

В данной работе мы провели систематическое исследование фемтосекундных процессов экситонной релаксации в хлоросомах зелёной фотосинтезирующей бактерии *Cfx. aurantiacus*. Для возбуждения различных экситонных переходов длина волны импульсов возбуждения варьировалась от 660 до 750 нм, что соответствует всей полосе поглощения Q_y , включая протяжённое коротковолновое крыло. Длина волны зондирования была 755 нм, что близко к экситонному переходу с минимальной энергией и максимальным временем жизни [4]. В кинетиках разностного (свет–темнота) поглощения ΔA обнаружены слабые фемтосекундные компоненты, отвечающие за экситонную релаксацию. Оказалось, что количество, относительный вклад и характерные времена этих компонент зависят от длины волны возбуждения. Впервые экспериментально показано наличие экситонных переходов вдали от центра полосы Q_y , то есть в области слабого коротковолнового крыла при $\lambda < 700$ нм. Показано, что при возбуждении этих переходов происходит быстрая релаксация энергии к её минимальному значению, соответствующему длине волны ~ 755 нм. Теоретическое моделирование кинетик ΔA показало, что в хлоросомах одновременно происходят безызлучательные переходы между экситонными состояниями с различной энергией. Изменение энергии экситонов может быть обусловлено как их взаимодействием с окружением, так и миграцией по хлоросоме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культуры зелёной бактерии *Cfx. aurantiacus* Ok-70-f1 выращивали в анаэробных условиях при 55 °С на стандартной среде [10] при постоянном перемешивании и интенсивности света 500 Вт/м². Выделение хлоросом из клеток проводили в двух последовательных непрерывных градиентах концентраций (m/v) сахарозы (55–20% и 45–15%) в присутствии 10 мМ аскорбата натрия и 2 мМ тиоционата натрия, как описано ранее [34]. Фемтосекундные разностные (свет–темнота) кинетики поглощения (ΔA) измеряли с помощью лазерного спектрометра (рис. 2), собранного на базе титан-сапфирового генератора световых импульсов («Spectra Physics», США). В качестве генератора использовался лазер с синхронизацией продольных мод, работающий с частотой 76 МГц. В состав спектрометра также входил титан-сапфировый усилитель («Авеста», Россия) и многоканальный анализатор оптических спектров («Oriel», Франция). В процессе усиления световые импульсы проходили кристалл титан-сапфира 8 раз. Перед усилением фемтосекундные импульсы растягивались до пикосекундной длительности для предотвращения оптического пробоя кристалла. После усиления пикосекундные импульсы вновь сжимались до первоначальной фемтосекундной длительности. Разрешение по времени спектрометра составляло 20 фс. Выделение спектральных диапазонов возбуждения и зондирования проводили с помощью интерференционных фильтров из фемтосекундного континуума, для генерации которого усиленные импульсы (энергия 0,3 мДж, длина волны 805 нм, частота повторения 40 Гц) фокусировали в плоскую струю этиленгликоля толщиной 0,2 мм. Спектр континуума охватывал весь видимый диапазон, а также часть ближнего ИК- и ближнего УФ-диапазонов. Континуум разделялся на две части, меньшая из которых (~2%) после фильтрации использовалась для зондирования, а основная — для возбуждения образца. При необходимости возбуждающий свет дополнительно ослаблялся нейтральными светофильтрами. Для отсекающего рассеянного света континуума использовалось диафрагмирование с помощью пространственных фильтров. Спектральная дисперсия импульсов возбуждения и зондирования оптимизировалась перед входом в образец с помощью призмных компрессоров. Возбуждение образцов проводили на длинах волн 660, 675, 690, 705, 720, 735 и 750 нм, а зондирование — на длине волны 755 нм. Интенсивность возбуждения соответствовала

линейному режиму измерений и составляла $2\text{--}6 \times 10^{12}$ фотонов/см² за один импульс. Спектральная ширина импульсов на входе в образец была ~15 нм. Угол между плоскостями поляризации лучей возбуждения и зондирования составлял 54,7° (магический угол), что позволяло проводить изотропные (не зависящие от поляризации света) измерения. Коэффициент поглощения образцов хлоросом составлял 0,5 на длине волны 740 нм в кювете толщиной 1 мм. Для уменьшения уровня шумов проводили усреднение по 5000–15 000 измерений. Погрешность измерения кинетик ΔA составляла 0,4%. Изменение интервала времени между импульсами возбуждения и зондирования осуществлялось с помощью оптической линии задержки с точностью 1 фс. Задержка по времени между импульсами возбуждения и зондирования варьировала в диапазоне от –0,2 до 2 пс с шагом 10 фс. Рабочая частота спектрометра была 40 Гц. Измерения кинетик проводили при температуре 80 К, для чего кювету с хлоросомами помещали в криостат. При этом в образцы хлоросом добавляли глицерин в количестве 65% (v/v) для получения хорошей прозрачности. Для измерения стационарного спектра поглощения хлоросом при 80 К в качестве источника света использовалась лампа накаливания. Величины ΔA определялись как разность значений поглощения образца с возбуждением и без возбуждения:

$$\Delta A_{\lambda} = \log(I_0/I_{\text{возб.}})_{\lambda} - \log(I_0/I_{\text{без возб.}})_{\lambda}, \quad (1)$$

где I_0 — энергия света на входе в образец (опорный свет), I — энергия прошедшего через образец света. Аппроксимация экспериментальных кинетик ΔA проводилась суммой экспоненциальных и тригонометрических функций с учётом функции возбуждения J :

$$\Delta A(t) = J \times (B_0 + \sum (B_i \exp(-t/\tau_i) + C_i \cos(-\omega_i t) \exp(-t/\phi_i))), \quad (2)$$

где символ $\times$ означает свёртку, B_0 — амплитуда постоянной компоненты, B_i — амплитуда компоненты с характерным временем τ_i , C_i — амплитуда осциллирующей компоненты с частотой ω_i и характерным временем затухания ϕ_i . Наличие компоненты B_0 обусловлено медленными процессами с характерными временами, существенно превышающими временное окно измерений. В качестве функции возбуждения J использовалась кросс-корреляционная функция импульсов возбуждения и зондирования, которая измерялась при помощи коррелятора на основе нобата лития. Поскольку

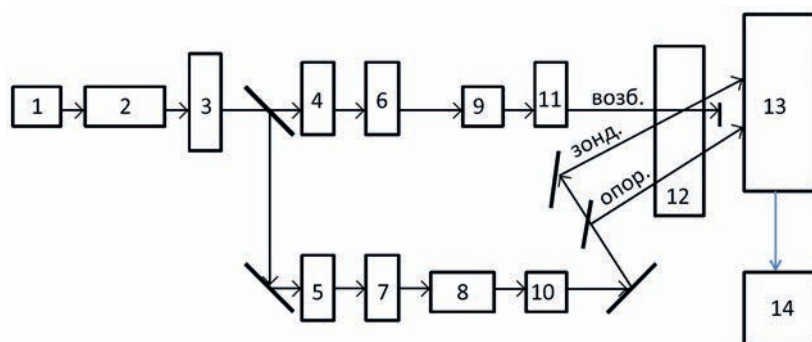


Рис. 2. Упрощённая блок-схема спектрометра. 1 — Титан-сапфировый лазер с синхронизацией мод; 2 — восьмипроходный титан-сапфировый усилитель; 3 — струя этиленгликоля; 4, 5 — пространственные фильтры; 6, 7 — спектральные фильтры; 8 — линия задержки; 9, 10 — системы компрессии фемтосекундных импульсов; 11 — механический прерыватель; 12 — образец хлоросом, помещённый в криостат; 13 — оптический многоканальный анализатор спектров; 14 — компьютер. 4, 6, 9, 11 — канал возбуждения; 5, 7, 8, 10 — канал зондирования, «опор» — опорный канал. Вспомогательная и контрольная аппаратура не показана

длительность лазерных импульсов была много меньше длительности изучаемых процессов, вместо формулы (2) использовалось приближённое выражение:

$$\Delta A(t) = F(B_0 + \sum (B_i \exp(-t/\tau_i) + C_i \cos(-\omega_i t) \exp(-t/\phi_i))), \quad (3)$$

где $F = \int J dt$ есть инструментальная функция.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стационарный спектр поглощения полосы Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus*, измеренный при температуре 80 К, показан на рис. 3. Полоса Q_y имеет максимум при 742 нм и асимметричную форму с крутым длинноволновым и пологим коротковолновым спадом. При $\lambda \leq 700$ нм в спектре наблюдается небольшая, но очень широкая подставка. Отметим, что при комнатной температуре центральная часть спектра полосы Q_y становится несколько шире, однако характерная асимметричная форма и коротковолновое крыло сохраняются. Полоса Q_y хлоросом значительно смещена в красную сторону по сравнению с аналогичной полосой мономерных молекул БХл с (максимум при 663 нм), что является следствием олигомеризации БХл с [35]. В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* экситонный переход с минимальной энергией имеет длину волны поглощения ~ 752 нм, то есть он заметно смещён в красную сторону относительно максимума полосы Q_y [4, 36]. Локализация этого перехода на шкале длин была определена по выжиганию характерного узкого провала в спектре поглощения хлоросом при криогенной температуре [4, 36]. Сравнительно большое (пикосекундное) время жизни этого перехода может приводить

к эффективному накоплению заселённости возбуждённого состояния при экситонной релаксации. Длины волн возбуждения и зондирования показаны вертикальными стрелками на рис. 3. Возбуждение при $\lambda \geq 700$ нм приходилось на центральную часть полосы Q_y , а при $\lambda \leq 700$ нм оно затрагивало коротковолновое крыло. Зондирование при 755 нм даёт информацию о динамике экситонных переходов с энергией, близкой к минимальной.

Кинетики ΔA (свет—темнота), измеренные на длине волны 755 нм при разных длинах волн возбуждения, показаны на рис. 4. Для наглядности кинетики нормированы и смещены по вертикали. Импульсное возбуждение приводит к выцветанию поглощения хлоросом, то есть к частичному опустошению основного состояния и заселению возбуждённых состояний. Это соответствует отрицательному знаку ΔA . Кроме того, импульсное зондирование

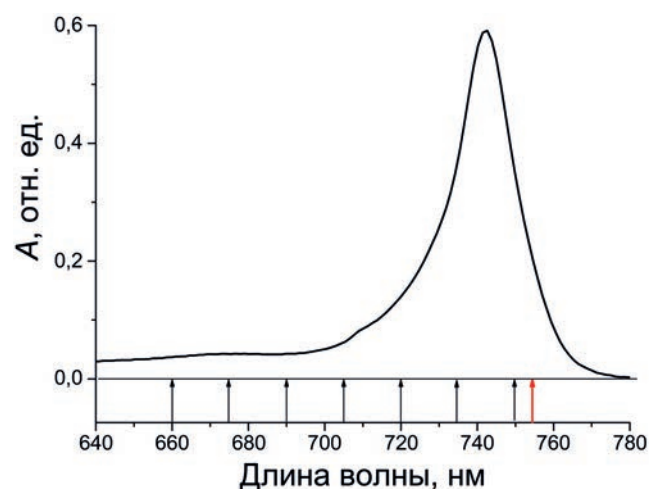


Рис. 3. Стационарный спектр поглощения полосы Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus*, измеренный при температуре 80 К. Стрелками показаны длины волн возбуждения (чёрный цвет) и зондирования (красный цвет)

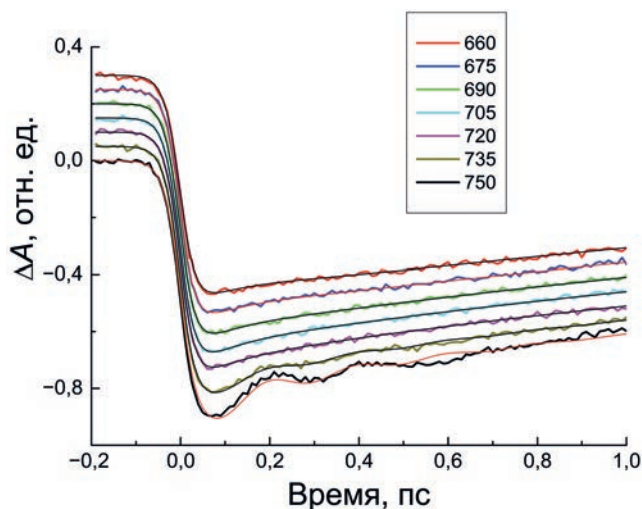


Рис. 4. Кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, измеренные на длине волны 755 нм при возбуждении импульсом длительностью 20 фс на длинах волн 660, 675, 690, 705, 720, 735 и 750 нм. Кинетики нормированы и смещены по вертикали для наглядности. Тонкими линиями даны аппроксимирующие кривые. Подробности аппроксимации — в тексте. В рамке указаны цвета кинетических кривых

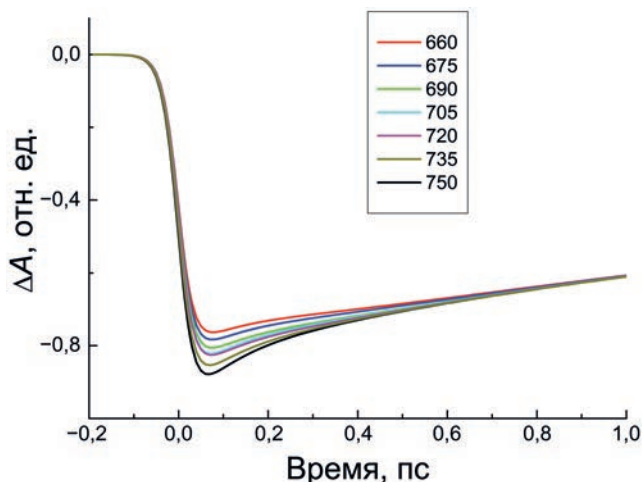


Рис. 5. Аппроксимирующие кривые кинетик ΔA , представленных на рис. 4, очищенные от осциллирующих компонент. Кривые нормированы при задержке 2 пс между импульсами возбуждения и зондирования. Параметры аппроксимации находятся в таблице и тексте. В рамке указаны цвета кинетических кривых

создаёт вынужденное излучение из возбуждённых состояний, что ещё более смещает ΔA в отрицательную сторону. После окончания импульса возбуждения все кинетики демонстрируют уменьшение заселённости возбуждённых состояний в пикосекундном диапазоне в основном из-за переноса энергии БХл *c* → БХл *a*. Если длины волн возбуждения и зондирования достаточно близки, в кинетиках ΔA наблюдаются слабые когерентные осцилляции, полностью затухающие в течение 1–2 пс по-

сле возбуждения (см. кинетики при $\lambda_{\text{возб.}} = 750$ и 735 нм). Согласно литературным данным, Фурье-анализ осцилляций в хлоросомах показывает спектр характерных частот в области 10–400 см^{-1} [1, 21]. Среди этих частот доминируют две: 50 и 150 см^{-1} , имеющие период около 600 и 200 фс соответственно. При аппроксимации кинетик мы ограничились учётом этих двух осцилляций в виде затухающих гармонических функций (см. формулу 2), что дало хорошее качественное приближение (см. тонкие линии на рис. 4). Математический анализ некогерентной части кинетик состоял в их аппроксимации суммой экспоненциальных функций с различными характерными временами и амплитудами. Результат этой аппроксимации показан на рис. 5, а параметры аппроксимирующих функций приведены в таблице. При аппроксимации учитывалась инструментальная функция, дающая начальный спад всех кинетик в результате возбуждения хлоросом. При анализе кинетик мы стремились минимизировать количество компонент и предпочитали варьировать их амплитуду, оставляя неизменным характерное время. Погрешность определения констант времени и амплитуд компонент составляла около 10%.

Компоненты τ_{1-3} представляют для нас наибольший интерес, поскольку имеют отрицательную амплитуду, то есть могут отражать дополнительный рост заселённости возбуждённых состояний БХл *c*. Характерные времена этих компонент составляют $\tau_1 = 140$, $\tau_2 = 220$ и $\tau_3 = 320$ фс, то есть значительно больше длительности импульса возбуждения. При $\lambda_{\text{возб.}} = 750$ нм данные компоненты отсутствуют в кинетике ΔA . При $\lambda_{\text{возб.}} = 735$ нм наблюдается одна компонента τ_1 , при $\lambda_{\text{возб.}} = 720$, 705 и 690 нм наблюдаются две компоненты, τ_1 и τ_2 , а при $\lambda_{\text{возб.}} = 675$ и 660 нм в кинетиках присутствуют три компоненты, τ_{1-3} . Суммарный вклад этих компонент возрастает от 4% при $\lambda_{\text{возб.}} = 735$ нм до 14% при $\lambda_{\text{возб.}} = 660$ нм, то есть остаётся относительно небольшим. Таким образом, по мере удаления $\lambda_{\text{возб.}}$ от $\lambda_{\text{зонд.}}$ наблюдается увеличение как числа компонент, так и их суммарного вклада. Наиболее вероятной причиной возникновения компонент τ_{1-3} является экситонная релаксация, в результате которой энергия возбуждения передаётся от коротковолновых к длинноволновым экситонным уровням. Избыток энергии поглощается окружением, в качестве которого могут выступать сами агрегаты БХл *c*. В этот процесс могут быть вовлечены разные колебательные состояния, поэтому правильнее считать эту релаксацию экситонно-колебательной.

Параметры аппроксимирующих функций экспериментальных кинетик ΔA

$\lambda_{\text{возб.}},$ нм	$\tau_1, \text{ пс}$	$\tau_2, \text{ пс}$	$\tau_3, \text{ пс}$	$\tau_4, \text{ пс}$	$\tau_5, \text{ пс}$	$\tau_6, \text{ пс}$
750				$0,1 \pm 0,012$ ($+0,16 \pm 0,01$)	$1,3 \pm 0,05$ ($+0,34 \pm 0,006$)	$11 \pm 0,3$ ($+0,5 \pm 0,008$)
735	$0,14 \pm 0,03$ ($-0,04 \pm 0,006$)			$0,1 \pm 0,007$ ($+0,16 \pm 0,01$)	$1,3 \pm 0,06$ ($+0,34 \pm 0,005$)	$11 \pm 0,4$ ($+0,5 \pm 0,008$)
720	$0,14 \pm 0,023$ ($-0,07 \pm 0,006$)	$0,22 \pm 0,04$ ($-0,01 \pm 0,0023$)		$0,1 \pm 0,008$ ($+0,16 \pm 0,012$)	$1,3 \pm 0,08$ ($+0,34 \pm 0,007$)	$11 \pm 0,3$ ($+0,5 \pm 0,01$)
705	$0,14 \pm 0,022$ ($-0,04 \pm 0,006$)	$0,22 \pm 0,025$ ($-0,04 \pm 0,0045$)		$0,1 \pm 0,008$ ($+0,16 \pm 0,013$)	$1,3 \pm 0,08$ ($+0,34 \pm 0,005$)	$11 \pm 0,4$ ($+0,5 \pm 0,007$)
690	$0,14 \pm 0,02$ ($-0,05 \pm 0,007$)	$0,22 \pm 0,03$ ($-0,05 \pm 0,005$)		$0,1 \pm 0,01$ ($+0,16 \pm 0,012$)	$1,3 \pm 0,06$ ($+0,34 \pm 0,006$)	$11 \pm 0,4$ ($+0,5 \pm 0,006$)
675	$0,14 \pm 0,025$ ($-0,04 \pm 0,005$)	$0,22 \pm 0,0035$ ($-0,04 \pm 0,004$)	$0,32 \pm 0,04$ ($-0,04 \pm 0,004$)	$0,1 \pm 0,006$ ($+0,16 \pm 0,015$)	$1,3 \pm 0,07$ ($+0,34 \pm 0,005$)	$11 \pm 0,3$ ($+0,5 \pm 0,008$)
660	$0,14 \pm 0,02$ ($-0,04 \pm 0,005$)	$0,22 \pm 0,03$ ($-0,04 \pm 0,003$)	$0,32 \pm 0,03$ ($-0,06 \pm 0,005$)	$0,1 \pm 0,008$ ($+0,16 \pm 0,012$)	$1,3 \pm 0,1$ ($+0,34 \pm 0,006$)	$11 \pm 0,3$ ($+0,5 \pm 0,01$)

Примечание. $\lambda_{\text{возб.}}$ — длина волны возбуждения, τ_{1-6} — характерное время экспоненциальной компоненты. В скобках даны относительные амплитуды компонент. Знак «+» или «-» обозначает рост или спад величины ΔA с течением времени

Компоненты τ_{4-6} имеют положительную амплитуду, что соответствует уменьшению заселённости возбуждённых состояний. Характерные времена и относительные вклады этих компонент практически не зависят от длины волны возбуждения с точностью около 10%. Мультиэкспоненциальный характер распада возбуждённых состояний хлоросом *Cfx. aurantiacus* с характерными временами, близкими к приведённым в таблице, отмечается во многих работах [21–23, 28, 31, 32]. Компоненты $\tau_5 = 1,3$ пс и $\tau_6 = 11$ пс отражают перенос энергии БХл $c \rightarrow$ БХл a , поскольку в кинетиках ΔA БХл a наблюдаются зеркальные изменения с близкими временами. Компонента $\tau_5 = 1,3$ пс может также отражать миграцию энергии между агрегатами БХл c . При измерениях кинетик с задержкой более 100 пс выявлен ряд слабых медленных компонент [21]. Природа компоненты $\tau_4 = 0,1$ пс до конца не выяснена. Данная компонента может быть следствием процессов синглет-синглетной аннигиляции экситонов, которая присуща спектроскопическим измерениям в хлоросомах даже при очень низкой энергии возбуждения [26, 27]. Кроме того, компонента τ_4 может иметь когерентную или артефактную природу.

Аннигиляция экситонов может существенно исказить кинетику ΔA в хлоросомах. При увеличении плотности возбуждения от $\sim 10^{12}$ до $\sim 10^{14}$ фотонов/см² за один импульс в кинетике

ΔA появляются новые субпикосекундные компоненты, имеющие разный знак и значительно меняющие начальную динамику ΔA [27]. В нашей работе оптическая плотность образцов при $\lambda < 700$ нм была в ~ 15 раз меньше таковой в центре полосы Q_y (рис. 3), а плотность возбуждения была в 3 раза больше (2×10^{12} фотонов/см² при $\lambda_{\text{возб.}} \geq 700$ нм и 6×10^{12} фотонов/см² при $\lambda_{\text{возб.}} \leq 700$ нм). Это означает, что начальная плотность экситонов для кинетик, измеренных при $\lambda_{\text{возб.}} \leq 700$ нм, была в несколько раз меньше, чем таковая для кинетик, измеренных при $\lambda_{\text{возб.}} \geq 700$ нм. Соответственно, влияние аннигиляции экситонов на кинетики, измеренные при $\lambda_{\text{возб.}} \leq 700$ нм, было меньше, чем на кинетики, измеренные при $\lambda_{\text{возб.}} \geq 700$ нм. Может показаться, что чем ближе $\lambda_{\text{возб.}}$ к центру полосы Q_y , тем больше быстрых компонент в неосциллирующей части экспериментальных кинетик (рис. 5). Сравнение кинетик, измеренных при разных $\lambda_{\text{возб.}}$, показывает, что это не так. Кинетики, измеренные при $\lambda_{\text{возб.}} = 660, 675, 690$ и 705 нм, имеют заметные отличия при $t < 300$ фс, тогда как начальная плотность экситонов в этих измерениях была примерно одинаковой. То же самое можно утверждать для неосциллирующих частей кинетик, измеренных при $\lambda_{\text{возб.}} = 720$ и 750 нм. Кинетика, измеренная при $\lambda_{\text{возб.}} = 735$ нм, имела самую большую начальную плотность экситонов среди всех

кинетик, однако она демонстрирует более пологий подъем неосциллирующей части, чем кинетика, измеренная при $\lambda_{\text{возб.}} = 750$ нм (рис. 5). По-видимому, полностью избавиться от аннигиляции невозможно даже при плотности возбуждения $\sim 10^{11}$ фотонов/см² за один импульс [27]. Другим серьёзным фактором, осложняющим анализ наших данных, являются когерентные явления, возникающие при фемтосекундном возбуждении хлоросом. Отделение осцилляций, имеющих сложную форму, от неосциллирующей части кинетик всегда содержит неопределённость. Эта задача становится неразрешимой при закритическом затухании когерентности. В этом случае периодическая осцилляция превращается в набор экспоненциальных компонент и становится неотличимой от некогерентных вкладов.

Впервые экситонная релаксация в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* наблюдалась при криогенной температуре [22]. В этой работе была обнаружена слабая кинетическая компонента ΔA ($\tau = 300$ фс) с отрицательной амплитудой при $\lambda_{\text{возб.}} = 731$ нм и $\lambda_{\text{зонд.}} = 758$ нм. Позднее кинетические компоненты ΔA , присущие экситонной релаксации, были обнаружены в кинетиках хлоросом *Cfx. aurantiacus* при комнатной температуре [28, 31, 32]. В работе Martiskainen et al. [28] эта компонента имела характерное время 150 фс и наблюдалась при $\lambda_{\text{возб.}} = 685$ нм и $\lambda_{\text{зонд.}} = 758$ нм, но отсутствовала при $\lambda_{\text{зонд.}} = 742$ нм. В работе Yakovlev et al. [31] обнаружена очень слабая компонента с характерным временем 70 фс при $\lambda_{\text{возб.}} = 725$ нм и $\lambda_{\text{зонд.}} = 755$ нм. В работе Yakovlev et al. [32] при $\lambda_{\text{возб.}} = 490$ нм и $\lambda_{\text{зонд.}} = 620\text{--}770$ нм наблюдались, среди прочих компонент, две компоненты кинетик ΔA с характерными временами 100–130 фс и 220–270 фс, которые можно объяснить экситонной релаксацией. В хлоросомах других фотосинтезирующих бактерий также обнаружены явные признаки экситонной релаксации. Так, в кинетиках хлоросом бактерии *Chlorobium phaeobacteroides*, состоящей из агрегатов БХЛ *e*, наблюдались компоненты экситонной релаксации с временами 200–500 фс [27]. В кинетиках хлоросом зелёных фотосинтезирующих бактерий *Chlorobaculum tepidum* и *Prosthecochloris aestuarii* при $\lambda_{\text{возб.}} = 685$ нм и $\lambda_{\text{зонд.}} = 758$ нм были выделены компоненты с временами 117–160 фс, которые были приписаны переносу энергии между экситонными полосами с различной энергией [29]. Подчеркнём, что пространственная миграция энергии внутри хлоросом неразрывно связана с релаксацией энергии, поскольку каждая экситонная полоса имеет собственное распределение электрон-

ной плотности по агрегатам БХЛ [30]. Из этого следует, что в общем случае безызлучательные переходы между экситонными уровнями могут быть связаны как с потерями энергии, так и с её миграцией. Трудность обнаружения кинетических компонент ΔA , отвечающих экситонной релаксации, связана с присутствием в этих кинетиках близких компонент, которые отражают иные процессы. В нашем случае компоненты $\tau_1 = 0,14$ пс и $\tau_4 = 0,1$ пс имеют разный знак и поэтому частично компенсируют друг друга. Отметим ещё раз, что серьёзным фактором, затрудняющим анализ кинетик, является синглет-синглетная аннигиляция, присущая молекулярным агрегатам [37]. В хлоросомах эта аннигиляция заметно искажает кинетику ΔA , что заставляет применять импульсное возбуждение с очень низкой интенсивностью порядка $10^{11}\text{--}10^{12}$ фотонов/см² для минимизации этого искажения [27]. Применение более интенсивного возбуждения ускоряет начальный этап кинетик, что может привести к ошибочному выводу о наличии очень быстрых процессов переноса энергии. В нашей работе интенсивность возбуждения была 2×10^{12} фотонов/см² при $\lambda_{\text{возб.}} \geq 700$ нм и 6×10^{12} фотонов/см² при $\lambda_{\text{возб.}} \leq 700$ нм, что соответствует относительно небольшой аннигиляции.

Как отмечалось во Введении, имеется большое количество структурных моделей хлоросом. Без точного знания атомных координат выбор в пользу той или иной модели невозможен. Общим для всех моделей является представление о квазилинейных цепях молекул БХЛ, которые могут образовывать более сложные трёхмерные структуры. Спектр поглощения хлоросом определяется в основном именно свойствами этих линейных цепей, и только в меньшей степени — взаимным расположением цепей. Данное утверждение особенно верно для хлоросом *Cfx. aurantiacus*, в которых относительно небольшая плотность упаковки молекул БХЛ приводит к тому, что среднее расстояние между соседними цепями (1–2 нм) исключает возможность образования водородных связей между молекулами из соседних цепей [12]. В этом случае слабое взаимодействие цепей достигается за счёт сил Ван-дер-Ваальса.

Для теоретического моделирования экситонной релаксации в хлоросоме *Cfx. aurantiacus* мы выбрали модель цилиндрических агрегатов БХЛ *c* [12, 36]. Эта модель предполагает, что линейные цепи молекул БХЛ объединены в длинные полые цилиндры. В рамках этой модели типичная хлоросома *Cfx. aurantiacus* состоит из 10–20 таких цилиндров, расположенных в 1–3 слоя по несколько цилиндров

в каждом слое. Каждый цилиндр состоит из примерно 500 молекул БХл *c* и поделен на одинаковые элементарные блоки по 20–40 молекул в каждом блоке. Для определённости мы предположили, что элементарный блок состоит из 6 линейных цепей, каждая из которых состоит из нескольких молекул БХл *c*. Данная модель хорошо объясняет экспериментальные спектры стационарного поглощения и флуоресценции при комнатной и криогенной температуре [36], спектры кругового дихроизма и фемтосекундные спектры ΔA [38], а также согласуется с данными количественного анализа хлоросом *Cfx. aurantiacus* [12]. Для имитации разброса энергетических и структурных параметров мы варьировали энергию взаимодействия соседних молекул БХл *c* и количество молекул в каждой цепи. Такой подход согласуется с экспериментами по спектроскопии одиночных хлоросом [39] и широко применяется во многих теоретических работах. В расчётах мы использовали гауссовский профиль экситонных переходов. Колебательная структура экситонных полос и эффект гиперхромизма не учитывались.

Рассчитанный спектр полосы поглощения полосы Q_y представлен на рис. 6. Детали теоретического моделирования можно найти в работах Fetisova et al. и Mairing et al. [12, 36]. Спектр образован большим количеством экситонных переходов. Теоретический спектр близок по форме к экспериментальному: он имеет асимметричную форму с растянутым коротковолновым крылом. Это крыло протянулось вплоть до $\lambda \sim 620$ нм, при этом центральная длина волны поглощения мономерных молекул БХл *c* полагалась равной 663 нм в соответствии с данными эксперимента [24]. Самый длинноволновый переход находится при 752,4 нм, а самый интенсивный – при 742 нм. Группа интенсивных переходов образует центральную часть полосы Q_y , а большая часть слабых переходов находится при $\lambda \leq 700$ нм. Для получения гладкого профиля полосы Q_y ширина каждого перехода полагалась много больше разности энергий между соседними переходами.

Для приближённого расчёта динамики релаксации энергии мы разделили все экситонные переходы на несколько групп, расположенных последовательно на шкале энергий, и рассмотрели безызлучательные переходы между возбуждёнными состояниями этих групп без детализации процессов, происходящих внутри каждой группы (рис. 7, вставка справа). Иными словами, каждая группа считалась одним состоянием с определённой энергией. Такой подход оправдан в случае сильного пе-

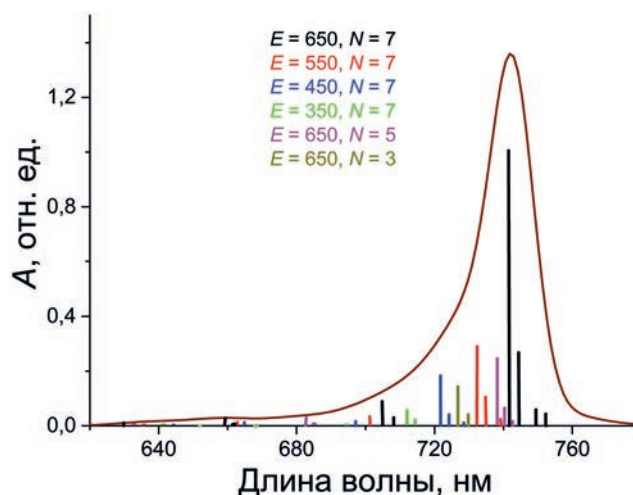


Рис. 6. Теоретический спектр стационарного поглощения полосы Q_y хлоросом *Cfx. aurantiacus*, полученный на основе модели цилиндрического агрегата [12, 36, 38]. Амплитуды и центральные длины волн экситонных переходов, дающих вклад в суммарный спектр, показаны вертикальными линиями разной высоты. Слабые переходы со вкладом менее 0,5% не показаны. Цветом выделены переходы для различных энергий взаимодействия E соседних молекул БХл и различного количества молекул N в каждой цепи агрегата. Математические подробности приведены в оригинальных теоретических работах

рекрытия энергий соседних переходов, когда невозможно селективное возбуждение и зондирование отдельного перехода, но каждая группа может возбуждаться селективно. Число таких групп составило 7 в диапазоне 660–750 нм в соответствии с набором из семи длин волн возбуждения в эксперименте. Учитывались прямые и обратные переходы как между соседними группами на шкале энергий, так и между более удалёнными по энергии группами (см. вставку на рис. 7). Отношение скоростей прямых и обратных переходов равнялось фактору Больцмана [40]. Предполагалось, что каждая группа реализует прямой перенос БХл *c* $\rightarrow$ БХл *a* (потери энергии системы) с одной одинаковой скоростью и независимо от других групп. Отметим, что так называемые лестничные или каскадные модели, подобные нашей, широко применяются для моделирования различных процессов релаксации энергии, в том числе для описания колебательной релаксации мономерных молекул [40, 41].

Результат моделирования кинетики группы возбуждённых состояний с минимальной энергией (длина волны 750 нм) представлен на рис. 7. Для наглядности кинетики нормированы при задержке 2 пс. Оказалось, что хорошее качественное согласие с экспериментом (рис. 7, вставка слева) достигается, если характерное время безызлучательного перехода между соседними группами равно 140 фс,

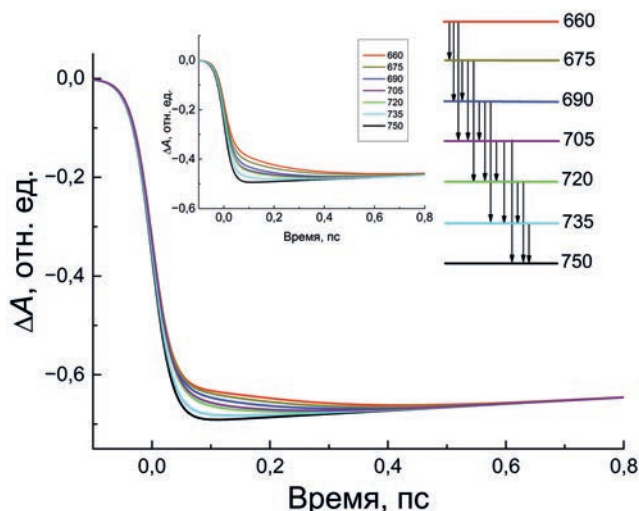


Рис. 7. Теоретические кинетики ΔA хлоросом *Cfx. aurantiacus*, рассчитанные на основе модели релаксационных переходов между группами экситонных полос, поглощающих на длинах волн 660, 675, 690, 705, 720, 735 и 750 нм (см. вставку справа). Цветом выделены кинетики для соответствующих длин волн возбуждения. Длина волны зондирования считалась равной 755 нм. Кривые нормированы при задержке 2 пс между импульсами возбуждения и зондирования. На вставке слева — аппроксимирующие кинетики с рис. 5, из которых удалены компоненты τ_4 и τ_5 . Подробности — в тексте

а между группами, разделёнными на шкале энергий одной или двумя соседними группами, это время составило около 220 и 320 фс. Эти времена совпадают с экспериментальными константами кинетических компонент (таблица). Возбуждение на длине волны 750 нм даёт кинетику, не содержащую релаксационных переходов. При $\lambda_{\text{возб.}} = 735$ нм в кинетике появляется компонента экситонной релаксации с константой времени 140 фс, соответствующая безызлучательному переходу в соседнюю группу. При $\lambda_{\text{возб.}} = 720$ нм в кинетике появляется вторая компонента релаксации с константой времени 220 фс, соответствующая безызлучательному переходу между группами, поглощающими при 720 и 750 нм. Третья компонента с константой времени 320 фс соответствует безызлучательным переходам типа $705 \rightarrow 750$, $690 \rightarrow 735$ и т. д. Эта компонента становится заметной при $\lambda_{\text{возб.}} \leq 690$ нм.

К сожалению, даже при криогенной температуре не удаётся селективно возбудить и зондировать отдельные экситонные переходы в хлоросомах. Можно предположить, что релаксационные переходы между соседними экситонными уровнями в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* происходят за время ≤ 100 фс. Это предположение согласуется с результатами ряда работ. Так, общая теория динамики поляронов в двумерной молекулярной матрице, применённая к цилиндрической модели

хлоросом, показывает, что делокализация и релаксация экситонов происходят за время около 100 фс [42]. К такому же выводу о том, что диффузия экситонов происходит за время ≤ 100 фс, приводят данные по двумерной электронной спектроскопии хлоросом зелёных серных бактерий [43].

Таким образом, данные нашей работы показывают, что увеличение разности энергий экситонных уровней приводит к общему замедлению релаксационного переноса энергии между ними в соответствии с теорией диссипации энергии в открытых системах [40]. В простейшем случае двухуровневой системы и слабой электронно-колебательной связи зависимость скорости релаксации от величины энергетического зазора приближённо описывается экспоненциальной функцией. В нашем случае эта зависимость качественно иная: с увеличением разности энергий между группами экситонных переходов возникают более медленные компоненты релаксации, но скорости всех компонент практически не зависят от этой разности. Наличие нескольких релаксационных компонент можно объяснить множественностью путей миграции экситонов по хлоросоме. Экситоны могут возбуждаться в разных частях хлоросомы и преодолевать разные расстояния до момента перехода в базовую пластинку. Чем больше времени длится миграция экситона по хлоросоме, тем больше энергии он потеряет, и наоборот. С другой стороны, диссипация энергии экситонов может происходить с участием разных термостатов и, следовательно, иметь разную скорость. В простейшем случае в качестве термостата может выступать одна колебательная мода [44]. В этом случае безызлучательный переход между двумя экситонными уровнями будет происходить по механизму внутренней конверсии. Поскольку в хлоросомах отсутствует белковая матрица [2], в качестве термостатирующего окружения могут выступать различные группы атомов, принадлежащих молекулам БХл, а также каротиноиды или белки и липиды, образующие оболочку хлоросом.

Аппроксимация спектра поглощения хлоросом *Cfx. aurantiacus* в рамках цилиндрической структурной модели даёт хороший результат (рис. 6). Тем не менее коротковолновое крыло экспериментального спектра может содержать колебательные переходы, не учтённые нашей моделью. Спектроскопия вынужденного комбинационного рассеяния хлоросом *Cfx. aurantiacus* выявила ряд колебательных переходов, самые сильные из которых имеют частоты 94, 148, 272, 753, 1153 и 1540 см^{-1} [45].

Фактор Хуана–Риса (Huang–Rhys) всех этих мод очень мал: он варьирует от 0,008 для моды 753 см^{-1} до 0,05 для моды 272 см^{-1} . Для самого сильного экситонного перехода ($\lambda = 742\text{ нм}$) 0–1 колебательный переход этих мод имеет длины волн в спектре поглощения при 737, 733, 727, 702, 683 и 666 нм соответственно. Возбуждение на длинах волн от 660 до 750 нм в нашей работе могло привести к заселению первого уровня данных мод. Колебательная релаксация в возбуждённом состоянии даёт дополнительное изменение спектра ΔA в области 0–0 перехода [41]. Величина этого изменения не превышает нескольких процентов. Характерные времена колебательной релаксации мономерных хлорофиллов составляют несколько сотен фс [44]. Аналогичные времена для хлоросом до сих пор не определены, однако допускается, что при олигомеризации хлорофиллов эти времена могут дополнительно уменьшиться. Кроме того, олигомеризация БХл с в хлоросомах *Cfx. aurantiacus* приводит к эффекту гиперхромизма, когда взаимодействие Q_y и $B_{x,y}$ переходов приводит к тому, что дипольный момент переходов Q_y дополнительно усиливается за счёт ослабления переходов $B_{x,y}$ [46]. Влияние этого эффекта на динамику экситонов не исследовано.

В хлоросомах *Cfx. aurantiacus* фемтосекундное возбуждение приводит к появлению когерентных осцилляций при достаточной близости длин волн возбуждения и зондирования (рис. 4). Эти осцилляции затухают в течение 1–2 пс после возбуждения и имеют частоты, характерные для колебательной когерентности, что подтверждается их близостью к частотам резонансного комбинационного рассеяния хлоросом [21, 47]. Первый, самый интенсивный пик этих осцилляций наблюдается сразу после возбуждения и имеет характерную длительность порядка 100 фс и относительную амплитуду до 10%. Когерентное возбуждение нескольких колебательных уровней формирует волновой пакет [48], который совершает осциллирующее движение по потенциальной поверхности возбуждённого электронного состояния. При своём движении волновой пакет излучает, причём длина волны этого излучения меняется во времени. Теоретически каждый экситонный уровень хлоросом имеет собственную потенциальную поверхность. Переход волнового пакета с одной поверхности на другую (если таковой возможен) сопровождается его деградацией. При значительной разнице между $\lambda_{\text{возб.}}$ и $\lambda_{\text{зонд.}}$ волновой пакет должен совершить несколько таких переходов и побывать на потенциальных поверхностях всех экситонных уровней, чьи

спектры находятся между $\lambda_{\text{возб.}}$ и $\lambda_{\text{зонд.}}$, прежде чем он начнёт излучать вблизи $\lambda_{\text{зонд.}}$. Это неизбежно приведёт к его полному исчезновению, что и подтверждается отсутствием осцилляций при $\lambda_{\text{возб.}} < 740\text{ нм}$ (рис. 4). При близких $\lambda_{\text{возб.}}$ и $\lambda_{\text{зонд.}}$ могут возбуждаться и зондироваться одни и те же экситонные переходы, поэтому волновой пакет может успешно достичь области зондирования и остаться на первоначальной потенциальной поверхности. Отметим, что когда когерентные осцилляции имеют затухание больше критического, они становятся апериодическими и могут быть ошибочно приняты за обычные кинетические компоненты. Детальное исследование когерентных эффектов в хлоросомах может дать новую информацию о спектре экситонных переходов и, следовательно, о пространственном строении хлоросом.

В заключение отметим, что длинноволновые экситонные полосы с низкой энергией играют ключевую роль в процессе светосбора в хлоросомах, эффективно накапливая энергию перед её отправкой в базовую пластинку и далее в реакционный центр. Широкополосный солнечный свет приводит к экситонным переходам во всём видимом диапазоне, однако уже через несколько сотен фс после поглощения очередной порции фотонов их энергия преобразуется в энергию возбуждённых состояний, расположенных в красной области спектра (вблизи 752 нм в хлоросомах *Cfx. aurantiacus*). Эта релаксация энергии отражает миграцию экситонов по хлоросоме к базовой пластинке. Для эффективной передачи энергии в базовую пластинку экситоны с низкой энергией локализуются на агрегатах БХл, непосредственно примыкающих к базовой пластинке. Таким образом, изучение спектральной динамики экситонов раскрывает их пространственную динамику.

Благодарности. Авторы выражают глубокую признательность покойному академику В.А. Шувалову за общую поддержку и постоянное внимание к их работе.

Вклад авторов. З.Г. Фетисова – общее руководство работой, постановка задачи, обсуждение результатов; А.Г. Яковлев – постановка задачи, проведение экспериментов и расчётов, обсуждение результатов, написание статьи; А.С. Таисова – приготовление образцов, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена за счёт средств госзадания «Фотобиофизика преобразования солнечной энергии в живых системах» (№ АААА-А17-117120540070-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо ис-

следований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яковлев А. Г., Таисова А. С., Фетисова З. Г. (2020) Перенос энергии в светособирающих аппаратах природного фотосинтеза, *Усп. совр. биол.*, **140**, 166-182, doi: 10.31857/S0042132420020088.
2. Frigaard, N.-U., and Bryant, D. (2006) Chlorosomes: antenna organelles in green photosynthetic bacteria, in: *Complex Intracellular Structures in Prokaryotes. Microbiology Monographs* (Shively, J. M., ed), Springer, Berlin, pp. 79-114, doi: 10.1007/7171_021.
3. Blankenship, R. E., Olson, J. M., and Miller, M. (1995) Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., Bauer, C. E., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 399-435, doi: 10.1007/0-306-47954-0_20.
4. Fetisova, Z., and Muring, K. (1992) Experimental evidence of oligomeric organization of antenna bacteriochlorophyll *c* in green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* by spectral hole burning, *FEBS Lett.*, **307**, 371-374, doi: 10.1016/0014-5793(92)80715-s.
5. Fetisova, Z., Freiberg, A., and Timpmann, K. (1988) Long-range molecular order as an efficient strategy for light harvesting in photosynthesis, *Nature (London)*, **334**, 633-634, doi: 10.1038/334633a0.
6. Van Dorssen, R. J., Vasmel, H., and Ames, J. (1986) Pigment organization and energy transfer in the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. II. The chlorosome, *Photosynth. Res.*, **9**, 33-45, doi: 10.1007/BF00029729.
7. Krasnovsky, A., and Bystrova, M. (1980) Self-assembly of chlorophyll aggregated structures, *BioSystems*, **12**, 181-194, doi: 10.1016/0303-2647(80)90016-7.
8. Smith, K., Kehres, L., and Fajer, J. (1983) Aggregation of bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1387-1389, doi: 10.1021/ja00343a062.
9. Olson, J. M. (1998) Chlorophyll organization and function in green photosynthetic bacteria, *Photochem. Photobiol.*, **67**, 61-75, doi: 10.1111/j.1751-1097.1998.tb05166.x.
10. Pierson, B., and Castenholz, R. (1974) Pigments and growth in *Chloroflexus aurantiacus*, a phototrophic filamentous bacterium, *Arch. Microbiol.*, **100**, 283-305, doi: 10.1007/BF00446324.
11. Oelze, J. (1992) Light and oxygen regulation of the synthesis of bacteriochlorophyll *a* and bacteriochlorophyll *c* in *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Bacteriol.*, **174**, 5021-5026, doi: 10.1128/jb.174.15.5021-5026.1992.
12. Fetisova, Z. G., Freiberg, A. M., Muring, K., Novoderezhkin, V. I., Taisova, A. S., and Timpmann, K. E. (1996) Excitation energy transfer in chlorosomes of green bacteria: Theoretical and experimental studies, *Biophys. J.*, **71**, 995-1010, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79301-3.
13. Sprague, S., Staehelin, L., DiBartolomeis, M., and Fuller, R. (1981) Isolation and development of chlorosomes in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Bacteriol.*, **147**, 1021-1031, doi: 10.1128/jb.147.3.1021-1031.1981.
14. Staehelin, L., Golecki, J., Fuller, R., and Drews, G. (1978) Visualization of the supramolecular architecture of chlorosomes (*Chlorobium* type vesicles) in freeze-fractured cells of *Chloroflexus aurantiacus*, *Arch. Microbiol.*, **119**, 269-277, doi: 10.1007/BF00405406.
15. Olson, J. M. (1980) Chlorophyll organization in green photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **594**, 33-51, doi: 10.1016/0304-4173(80)90012-9.
16. Psencik, J., Ikonen, T. P., Laurinmaki, P., Merckel, M. C., Butcher, S. J., Serimaa, R. E., and Tuma, R. (2004) Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria, *Biophys. J.*, **87**, 1165-1172, doi: 10.1529/biophysj.104.040956.
17. Günther, L., Jendry, M., Bloemsma, E., Tank, M., Oostergetel, G., Bryant, D., Knoester, J., and Köhler, J. (2016) Structure of light-harvesting aggregates in individual chlorosomes, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 5367-5376, doi: 10.1021/acs.jpcb.6b03718.
18. Sawaya, N., Huh, J., Fujita, T., Saikin, S., and Aspuru-Guzik, A. (2015) Fast delocalization leads to robust long-range excitonic transfer in a large quantum chlorosome model, *Nano Lett.*, **15**, 1722-1729, doi: 10.1021/nl504399d.
19. Fujita, T., Huh, J., Saikin, S., Brookes, J., and Aspuru-Guzik, A. (2014) Theoretical characterization of excitation energy transfer in chlorosome light-harvesting antennae from green sulfur bacteria, *Photosynth. Res.*, **120**, 273-289, doi: 10.1007/s11120-014-9978-7.
20. Prokhorenko, V. I., Steensgaard, D. B., and Holzwarth, A. R. (2000) Exciton dynamics in the chlorosomal antennae of the green bacteria *Chloroflexus aurantiacus* and *Chlorobium tepidum*, *Biophys. J.*, **79**, 2105-2120, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76458-7.
21. Savikhin, S., Zhu, Y., Lin, S., Blankenship, R. E., and Struve, W. S. (1994) Femtosecond spectroscopy of chlorosome antennae from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Phys. Chem.*, **98**, 10322-10334, doi: 10.1021/j100091a056.

22. Savikhin, S., Zhu, Y., Blankenship, R. E., and Struve, W. S. (1996) Intraband energy transfers in the BChl *c* antenna of chlorosomes from the green photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17978-17980, doi: 10.1021/jp961752b.
23. Savikhin, S., Buck, D. R., Struve, W. S., Blankenship, R. E., Taisova, A. S., Novoderezhkin, V. I., and Fetisova, Z. G. (1998) Excitation delocalization in the bacteriochlorophyll *c* antenna of the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* as revealed by ultrafast pump-probe spectroscopy, *FEBS Lett.*, **430**, 323-326, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00691-7.
24. Yakovlev, A., Taisova, A., and Fetisova, Z. (2002) Light control over the size of an antenna unit building block as an efficient strategy for light harvesting in photosynthesis, *FEBS Lett.*, **512**, 129-132, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02238-x.
25. Yakovlev, A., Novoderezhkin, V., Taisova, A., and Fetisova, Z. (2002) Exciton dynamics in the chlorosomal antenna of the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: experimental and theoretical studies of femtosecond pump-probe spectra, *Photosynth. Res.*, **71**, 19-32, doi: 10.1023/A:1014995328869.
26. Psencik, J., Ma, Y. Z., Arellano, J. B., Garcia-Gil, J., Holzwarth, A. R., and Gillbro, T. (2002) Excitation energy transfer in chlorosomes of *Chlorobium phaeobacteroides* strain CL1401: the role of carotenoids, *Photosynth. Res.*, **71**, 5-18, doi: 10.1023/A:1014943312031.
27. Psencik, J., Ma, Y. Z., Arellano, J. B., Hala, J., and Gillbro, T. (2003) Excitation energy transfer dynamics and excited-state structure in chlorosomes of *Chlorobium phaeobacteroides*, *Biophys. J.*, **84**, 1161-1179, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74931-5.
28. Martiskainen, J., Linnanto, J., Kananavičius, R., Lehtovuori, V., and Korppi-Tommola, J. (2009) Excitation energy transfer in isolated chlorosomes from *Chloroflexus aurantiacus*, *Chem. Phys. Lett.*, **477**, 216-220, doi: 10.1016/j.cplett.2009.06.080.
29. Martiskainen, J., Linnanto, J., Aumanen, V., Myllyperkiö, P., and Korppi-Tommola, J. (2012) Excitation energy transfer in isolated chlorosomes from *Chlorobaculum tepidum* and *Prosthecochloris aestuarii*, *Photochem. Photobiol.*, **88**, 675-683, doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01098.x.
30. Linnanto, J. V., and Korppi-Tommola, J. E. I. (2013) Exciton description of excitation energy transfer in the photosynthetic units of green sulfur bacteria and filamentous anoxygenic phototrophs, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 11144-11161, doi: 10.1021/jp4011394.
31. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., Shuvalov, V. A., and Fetisova, Z. G. (2019) Ultrafast excited-state dynamics in chlorosomes isolated from the photosynthetic filamentous green bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, *Physiologia Plantarum*, **166**, 12-21, doi: 10.1111/ppl.12887.
32. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., and Fetisova, Z. G. (2021) Utilization of blue-green light by chlorosomes from the photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*: Ultrafast excitation energy conversion and transfer, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148396, doi: 10.1016/j.bbabo.2021.148396.
33. Causgrove, T. P., Brune, D. C., Wang, J., Wittmershaus, B. P., and Blankenship, R. E. (1990) Energy transfer kinetics in whole cells and isolated chlorosomes of green photosynthetic bacteria, *Photosynth. Res.*, **26**, 39-48, doi: 10.1007/BF00048975.
34. Taisova, A. S., Keppen, O. I., Lukashev, E. P., Arutyunyan, A. M., and Fetisova, Z. G. (2002) Study of the chlorosomal antenna of the green mesophilic filamentous bacterium *Oscillochloris trichoides*, *Photosynth. Res.*, **74**, 73-85, doi: 10.1023/A:1020805525800.
35. Mukamel, S. (1995) *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*, Oxford University Press, New York/Oxford.
36. Mairing, K., Novoderezhkin, V., Taisova, A., and Fetisova, Z. (1999) Exciton levels structure of antenna bacteriochlorophyll *c* aggregates in the green bacterium *Chloroflexus aurantiacus* as probed by 1.8-293 K fluorescence spectroscopy, *FEBS Lett.*, **456**, 239-242, doi: 10.1016/S0014-5793(99)00953-9.
37. May, V. (2014) Kinetic theory of exciton-exciton annihilation, *J. Chem. Phys.*, **140**, 054103, doi: 10.1063/1.4863259.
38. Yakovlev, A., Taisova, A., Arutyunyan, A., Shuvalov, V., and Fetisova, Z. (2017) Variability of aggregation extent of light-harvesting pigments in peripheral antenna of *Chloroflexus aurantiacus*, *Photosynth. Res.*, **133**, 343-356, doi: 10.1007/s11120-017-0374-y.
39. Jendry, M., Aartsma, T. J., and Köhler, J. (2014) Insights into the excitonic states of individual chlorosomes from *Chlorobaculum tepidum*, *Biophys. J.*, **106**, 1921-1927, doi: 10.1016/j.bpj.2014.03.020.
40. Петров Э. Г. (1984) *Физика переноса зарядов в биосистемах*, Наукова думка, Киев.
41. Struve, W. S. (1995) Vibrational equilibration in absorption difference spectra of chlorophyll *a*, *Biophys. J.*, **69**, 2739-2744, doi: 10.1016/S0006-3495(95)80145-1.
42. Márquez, A. S., Chen, L., Sun, K., and Zhao, Y. (2016) Probing ultrafast excitation energy transfer of the chlorosome with exciton-phonon variational dynamics, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 20298, doi: 10.1039/c5cp06491k.
43. Dostál, J., Mančal, T., Augulis, R., Vácha, F., Pšenčík, J., and Zigmantas, D. (2012) Two-dimensional electronic spectroscopy reveals ultrafast energy diffusion in chlorosomes, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11611-11617, doi: 10.1021/ja3025627.
44. Dong, L.-Q., Niu, K., and Cong, S.-L. (2007) Theoretical analysis of internal conversion pathways and vibrational relaxation process of chlorophyll-a in ethyl ether solvent, *Chem. Phys. Lett.*, **440**, 150-154, doi: 10.1016/j.cplett.2007.04.021.

45. Cherepy, N. J., Du, M., Holzwarth, A. R., and Mathies, R. A. (1996) Near-infrared resonance Raman spectra of chlorosomes: probing nuclear coupling in electronic energy transfer, *J. Phys. Chem.*, **100**, 4662-4671, doi: 10.1021/jp952992e.
46. Gülen, D. (2006) Significance of the excitonic intensity borrowing in the J-/H-aggregates of bacteriochlorophylls/chlorophylls, *Photosynth. Res.*, **87**, 205-214, doi: 10.1007/s11120-005-8408-2.
47. Yakovlev, A. G., Taisova, A. S., Shuvalov, V. A., and Fetisova, Z. G. (2018) Estimation of the bacteriochlorophyll *c* oligomerisation extent in *Chloroflexus aurantiacus* chlorosomes by very low-frequency vibrations of the pigment molecules: A new approach, *Biophys. Chem.*, **240**, 1-8, doi: 10.1016/j.bpc.2018.05.004.
48. Соколов А. А., Тернов И. М. (1970) *Квантовая механика и атомная физика*, Просвещение, Москва.

FEMTOSECOND EXCITON RELAXATION IN CHLOROSOMES OF THE PHOTOSYNTHETIC GREEN BACTERIUM *Chloroflexus aurantiacus*

A. G. Yakovlev*, A. S. Taisova, and Z. G. Fetisova

*Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
119992 Moscow, Russia; e-mail: yakov@belozersky.msu.ru*

In the green bacteria *Chloroflexus* (*Cfx.*) *aurantiacus*, the process of photosynthesis begins with the absorption of light by chlorosomes, peripheral antennas consisting of thousands of bacteriochlorophyll *c* (BChl *c*) molecules combined into oligomeric structures. In this case, excited states are formed in BChl *c*, the energy of which migrates along the chlorosome towards the baseplate and further to the reaction center, where the primary charge separation occurs. Energy migration is accompanied by nonradiative electronic transitions between numerous exciton states, that is exciton relaxation. In this work, we studied the dynamics of exciton relaxation in *Cfx. aurantiacus* chlorosomes using difference femtosecond spectroscopy at cryogenic temperature (80 K). Chlorosomes were excited by 20 fs light pulses at wavelengths from 660 to 750 nm, and the difference (light–dark) kinetics were measured at a wavelength of 755 nm. Mathematical analysis of the data obtained revealed the kinetic components with characteristic time constants of 140, 220, and 320 fs responsible for the exciton relaxation. As the excitation wavelength decreased, the number of components and their relative contribution increased. Theoretical modeling of the results obtained was carried out on the base of the cylindrical model of BChl *c* aggregates. Nonradiative transitions between groups of exciton bands were ascribed by the system of kinetic equations. The model in which the energetic and structural disorder was taken into account turned out to be the most adequate.

Keywords: photosynthesis, green bacterium, *Chloroflexus aurantiacus*, chlorosome, femtosecond spectroscopy

ДИСПЛЕЙ ОЛИГО- α -1,6-ГЛИКОЗИДАЗЫ *Exiguobacterium sibiricum* НА ПОВЕРХНОСТИ КЛЕТОК *Escherichia coli*

© 2023 Л.Н. Шингарова^{1*}, Л.Е. Петровская¹, Е.А. Крюкова¹, С.Ш. Гапизов^{1,2},
Д.А. Долгих^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹ ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: lshingarova@gmail.com

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

Поступила в редакцию 02.03.2023

После доработки 03.04.2023

Принята к публикации 04.04.2023

Олиго- α -1,6-гликозидазы широко применяются в биотехнологии для гидролиза крахмала. Клеточный дисплей, основанный на использовании якорных мотивов белков внешней мембраны, позволяет экспонировать целевые пептиды и белки на поверхности микробных клеток, что способствует созданию технологически и экологически оптимальной среды для получения целевого продукта. Ранее нами была получена и охарактеризована рекомбинантная олиго- α -1,6-гликозидаза психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl), демонстрирующая высокую каталитическую активность. Было также показано, что аутоотранспортер AT877 *Psychrobacter cryohalolentis* и его делеционные варианты эффективно экспонируют эстеразу EstPc и 10-й домен фибронектина III-го типа на поверхности клеток *Escherichia coli*. Целью работы явилось получение системы дисплея EsOgl на поверхности бактериальных клеток на основе AT877. Сконструированы гены гибридного аутоотранспортера EsOgl877 и его делеционных мутантов EsOgl877 Δ 239 и EsOgl877 Δ 310. Исследована ферментативная активность EsOgl877 и установлено, что клетки, экспрессирующие этот белок, сохраняли около 90% максимальной активности в температурном диапазоне 15–35 °С. Показано, что активность клеток, содержащих EsOgl877 Δ 239 и EsOgl877 Δ 310, была соответственно в 2,7 и 2,4 раза выше, чем клеток, экспрессирующих полноразмерный АТ. Анализ клеток, экспрессирующих укороченные варианты EsOgl877, после обработки протеиназой К показал, что пассажирский домен во всех случаях локализован на клеточной поверхности. Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации систем дисплея олиго- α -1,6-гликозидазы и других гетерологичных белков на поверхности клеток *E. coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: секрция, аутоотранспортер, олиго- α -1,6-гликозидаза, бактериальный дисплей.

DOI: 10.31857/S0320972523050147, **EDN:** AZQUAN

ВВЕДЕНИЕ

Крахмалосодержащие культуры составляют важную часть рациона питания и основу для производства различных биотехнологических продуктов при помощи химической и ферментативной обработки. Основным продуктом ферментативной переработки крахмала является глюкозный сироп, конечный выход которого определяется способностью используемых ферментов к эффективной конверсии олигосахаридов крахмала в глюкозу [1, 2].

Крахмал состоит из линейного полисахарида амилозы и амилопектина, цепочки которого соединены между собой α -1,6-связями в точках разветвления. Низкая эффективность гидролиза таких связей ограничивает итоговую концентрацию глюкозы в сиропе. С целью ее повышения используют ферменты, гидролизующие α -1,6-гликозидные связи, в том числе олиго- α -1,6-гликозидазы (ЕС 3.2.1.10), которые принадлежат к 31-му подсемейству 13-го семейства гликозилгидролаз. Эти ферменты широко распространены, в частности,

Принятые сокращения: АТ – аутоотранспортер; EsOgl – олиго- α -1,6-гликозидаза *Exiguobacterium sibiricum*; ¹⁰Fn3 – 10-й домен фибронектина человека III-го типа; PBS – фосфатно-солевой буфер; pNPG – *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид.

* Адресат для корреспонденции.

в различных микроорганизмах [3]. Описаны олиго- α -1,6-гликозидазы мезофильных (*Bacillus cereus*, [4]), термофильных и гипертермофильных (*Bacillus coagulans*, *Bacillus thermoglucosidasius* [5, 6]) бактерий. Известно, что использование холодоактивных ферментов обладает рядом преимуществ, в частности, позволяет проводить реакции при более низких температурах [7, 8]. Ранее нами была получена и охарактеризована рекомбинантная олиго- α -1,6-гликозидаза психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl), демонстрирующая высокую каталитическую активность в широком температурном диапазоне, в том числе при низких температурах [9].

Клеточный дисплей, основанный на использовании якорных мотивов белков внешней мембраны, позволяет экспонировать целевые пептиды и белки на поверхности микробных клеток. Перспективы его применения в биотехнологии и промышленности включают разработку живых вакцин, конструирование и скрининг комбинаторных библиотек, а также получение цельноклеточных биокатализаторов [10, 11]. Преимуществом таких биокатализаторов является отсутствие необходимости выделения и очистки целевых ферментов, что существенно снижает их стоимость [12, 13].

В литературе имеются сведения о биокатализаторах, полученных с помощью дисплея на поверхности клеток бактерий и обладающих каталитической активностью в отношении различных полисахаридов [13]. Так, β -амилаза батата была экспонирована на клетках *Escherichia coli* при помощи белка Omp1 внешней мембраны *Zymomonas mobilis* и проявляла активность по отношению к растворимому крахмалу [14]. Комплексный биокатализатор, включающий три фермента *Clostridium cellulolyticum* (эндо- α -глюканазу Cel5A, экзо- α -глюканазу Cel9E и β -глюкозидазу), был сконструирован в результате их объединения с якорным белком PgsA и использован для получения этанола [15]. Аутодисплей β -глюкозидазы BglC *Thermobifida fusca* был достигнут благодаря использованию якорных мотивов AIDA-I и липокалина [16, 17]. Однако нам не удалось обнаружить опубликованных данных о цельноклеточных биокатализаторах, обладающих олиго- α -1,6-гликозидазной активностью.

Одним из популярных якорных мотивов для клеточного дисплея является C-концевой транслокаторный домен белков семейства ауотранспортеров (АТ), обладающий структурой типа β -бочонка [11, 18]. Соответствующий домен ранее охарактеризованного нами ауотранспортера AT877 *Psychrobacter cryohalolentis*

был использован для дисплея эстеразы EstPc [19] и 10-го домена фибронектина III-го типа человека ($^{10}\text{Fn3}$) [20, 21]. Мы также предложили подходы для повышения эффективности полученной системы, включая конструирование гибридных пассажирских доменов [20] и использование делеционных вариантов АТ [22]. В данной работе мы поставили задачу сконструировать систему дисплея EsOgl на поверхности клеток *E. coli* на основе AT877.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы реактивы Coomassie R250 («Bio-Rad», США), MgCl_2 («Merck», США), ампициллин и глюкоза («Panreac», Испания), субстрат *p*-нитрофенил- α -D-глюкопиранозид (pNPG; «Sigma», США), компоненты сред для культивирования бактерий, триптон и дрожжевой экстракт («Amresco», США), органические растворители производства «Химмед» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue («Stratagene», США). Использовали ферменты производства «Thermo Fisher Scientific» (США). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Евроген» (Россия). Ген *EsOgl* амплифицировали на матрице плазмидной ДНК pET28EsOgl с использованием праймеров 1739f и 1739r [9], обрабатывали *Nco*I и *Xho*I, после чего клонировали ПЦР-фрагмент в вектор, полученный обработкой плазмиды pAT877 [19] рестриктазами *Nco*I и *Sal*GI. Для конструирования делеционных вариантов EsOgl877 проводили ПЦР, как описано в работе Shingarova et al. [22]. Фрагменты клонировали в вектор pET20b по сайтам *Nco*I и *Xho*I, аналогично гену исходного белка, и подтверждали последовательность вставки секвенированием («Евроген»).

Выделение мембранной фракции. Культуру штамма *E. coli* C41(DE3), трансформированную одной из плазмид, выращивали в LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37 °C до значения ОП при 560 нм, равного 0,5–0,7, индуцировали добавлением 0,2 мМ изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG), после чего продолжали культивирование в течение 1,5 ч при 25 °C в присутствии 5 мМ MgCl_2 . Клетки осаждали при 2700 g 10 мин при 5 °C, после чего осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ EDTA, 20% сахарозы, лизоцим (0,2 мг/мл), и разрушали ультразвуком. Суспензию центрифугировали 30 мин при 6000 g. Полученный супернатант центрифугиро-

вали 1 ч при 100 000 g и суспендировали осадок мембранной фракции в 50 mM Tris-HCl (pH 8,0).

Вестерн-блот-анализ. Разделенные гелеэлектрофорезом в 10%-ном SDS-ПААГ по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad»). После инкубации в растворе 1%-ного BSA в Tris-солевом буфере (TBS, 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0) в течение 1 ч при 37 °C мембрану выдерживали в растворе конъюгата моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой (1 мкг/мл; «Invitrogen», США) в 1%-ном BSA в TBS в течение 1 ч при комнатной температуре. Окрашивание мембраны проводили с использованием преципитирующего 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB; «Clinical Science Products», США).

Обработка протеиназой К. Индуцированные клетки C41(DE3), экспрессирующие EsOgl877 или AT877, центрифугировали (3000 g, 15 мин при 4 °C) и промывали дважды 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4). После центрифугирования осадки суспендировали в 1 мл буфера, содержащего 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 5 mM CaCl₂. Раствор протеиназы К («Qiagen», США) добавляли до конечной концентрации 150 мкг/мл, и суспензию инкубировали в течение 1 ч при 37 °C и перемешивании. Реакцию останавливали добавлением фенол-метилсульфонилфторида (PMSF) до конечной концентрации 5 mM, смеси центрифугировали, дважды промывали PBS и суспендировали в 1,5 мл буфера, содержащего 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 200 mM NaCl, после чего выделяли мембранную фракцию клеток, как описано выше.

Иммуноферментный анализ (ELISA). Культуру клеток после индукции осаждали центрифугированием (2700 g 6 мин при 5 °C), дважды промывали PBS с добавлением 5 mM MgCl₂ и центрифугировали при тех же условиях. Доводили мутность суспензии до значения ОП при 560 нм, равного 1, и наносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета («Costar», США) для ELISA в трех повторностях. Клетки высушивали 20 ч в термостате при 37 °C, блокировали 2%-ным BSA и промывали PBS.

Для анализа экспонированности His-тага использовали конъюгат моноклональных антител к His-тагу с пероксидазой. Конъюгат добавляли в соотношении 1 : 10000 в PBS + 1% BSA, выдерживали 1 ч при 37 °C и перемешивании. После удаления антител промывали лунки 3 раза по 5 мин PBS. После отмывки в лунки добавляли по 100 мкл TMB, выдерживали 4 мин, затем останавливали реакцию добавлением 10%-ной H₂SO₄. Интен-

сивность окрашивания измеряли при 450 нм с помощью ридера Model 680 («Bio-Rad»).

Исследование ферментативной активности EsOgl877 проводили с использованием *p*NPG в качестве субстрата. Клетки после индукции центрифугировали (3000 g, 15 мин при 4 °C) и дважды промывали PBS с добавлением 5 mM MgCl₂. Осадок клеток суспендировали в реакционном буфере. К реакционной смеси (33 mM К-фосфатного буфера (pH 7,0), 0,36 mM субстрата) объемом 0,5 мл добавляли аликвоты очищенного фермента EsOgl (положительный контроль) или клеток. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, экспрессирующие гибридный AT Fn877, не обладающий ферментативной активностью. Смесь инкубировали 15 мин при 25 °C, реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 M Na₂CO₃. После центрифугирования в течение 5 мин в настольной центрифуге по 200 мкл реакционной смеси раскапывали в лунки 96-луночного планшета («Deltalab», Испания). Измеряли величину абсорбции при 405 нм на ридере Multiscan FC («Thermo Fisher Scientific»). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для высвобождения 1 мкмоль *p*-нитрофенола за 1 мин. Удельную активность определяли как количество единиц активности на 1 мг белка.

Оптимальную температуру реакции определяли путем измерения ферментативной активности при различных температурах (5–35 °C). Реакционную смесь инкубировали при каждой температуре в течение 10 мин, после чего измеряли активность, как описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Конструирование и экспрессия гибридного аутотранспортера EsOgl877. С целью экспонирования целевых белков на поверхности клеток проводят конструирование гибридного гена, кодирующего сигнальную последовательность (для экспорта в периплазматическое пространство), целевой белок и якорный мотив (для закрепления во внешней мембране клеток). В случае систем клеточного дисплея на основе АТ такими мотивами являются альфа-спиральный линкер и транслокаторный домен [11, 18]. Соответственно, для конструирования системы клеточного дисплея ген *EsOgl* был клонирован в вектор, содержащий кодирующие последовательности сигнального пептида PelB, альфа-спирального линкера и транслокаторного домена AT877 под контролем промотора T7lac, аналогично тому, как это

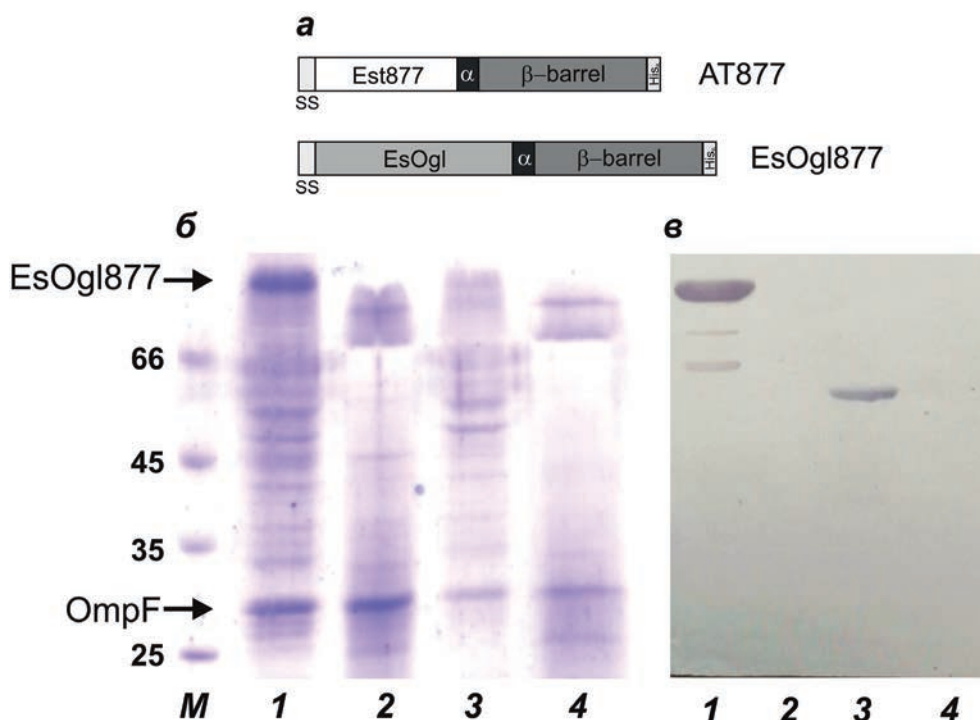


Рис. 1. Экспрессия EsOgl877 в клетках *E. coli*. *а* – Схемы строения AT877 и EsOgl877. Ss – Сигнальная последовательность PelB; α – альфа-спиральный линкер; β-barrel – транслокаторный домен AT877. *б* – Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ. *в* – Вестерн-блот с анти-His конъюгатом образцов мембранной фракции клеток C41(DE3), экспрессирующих EsOgl877 (дорожки 1 и 2) или AT877 (дорожки 3 и 4); до (дорожки 1 и 3) и после (дорожки 2 и 4) обработки клеток протеиназой К. *М* – маркеры молекулярной массы белков (кДа)

было сделано ранее в случае эстеразы EstPc и ¹⁰Fn3 [19, 20]. Таким образом, был сконструирован ген гибридного АТ EsOgl877, в котором природный пассажирский домен (эстеразу) заменили белком EsOgl (рис. 1, *а*).

Экспрессию полученного гена осуществляли в клетках *E. coli* штамма C41(DE3). Для определения локализации EsOgl877 проводили анализ с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистициновой последовательности. С помощью этих методов установлено, что рекомбинантный белок обнаруживается в мембранной фракции клеток в значительных визуализированных количествах, при этом его электрофоретическая подвижность соответствует расчетной молекулярной массе (~101 кДа; рис. 1, дорожка 1 на панелях *б* и *в*).

Для подтверждения поверхностной экспрессии EsOgl877 клетки после индукции обрабатывали протеиназой К, после чего выделяли мембранную фракцию и анализировали ее аналогичным образом. Подобно клеткам, экспрессирующим другие пассажирские домены, такая обработка приводила к исчезновению полос экспонированного целевого белка, в то время как полосы, соответствующие белку внешней мембраны OmpF, не изменились (рис. 1, дорожка 2 на панелях *б* и *в*).

Ферментативная активность EsOgl877. Олиго-α-1,6-гликозидазную активность EsOgl877 исследовали, инкубируя интактные клетки в буфере с субстратом *p*NPG. Измерения, проведенные при различных температурах, показали, что температурный оптимум фермента, экспонированного на поверхности клеток, состав-

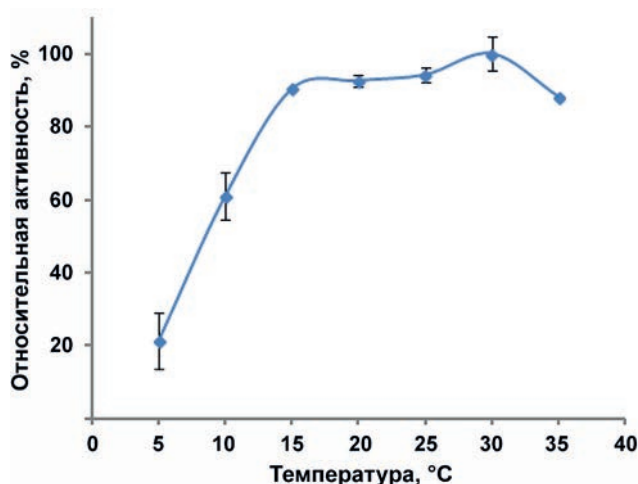


Рис. 2. Зависимость ферментативной активности клеток *E. coli*, экспрессирующих EsOgl877, от температуры. Клетки инкубировали в реакционной смеси, содержащей 33 мМ К-фосфатного буфера (pH 7,0) и 0,36 мМ *p*NPG в течение 15 мин при указанной температуре. Активность при 30 °C принята за 100%. Представлены средние значения трех опытов ± стандартное отклонение

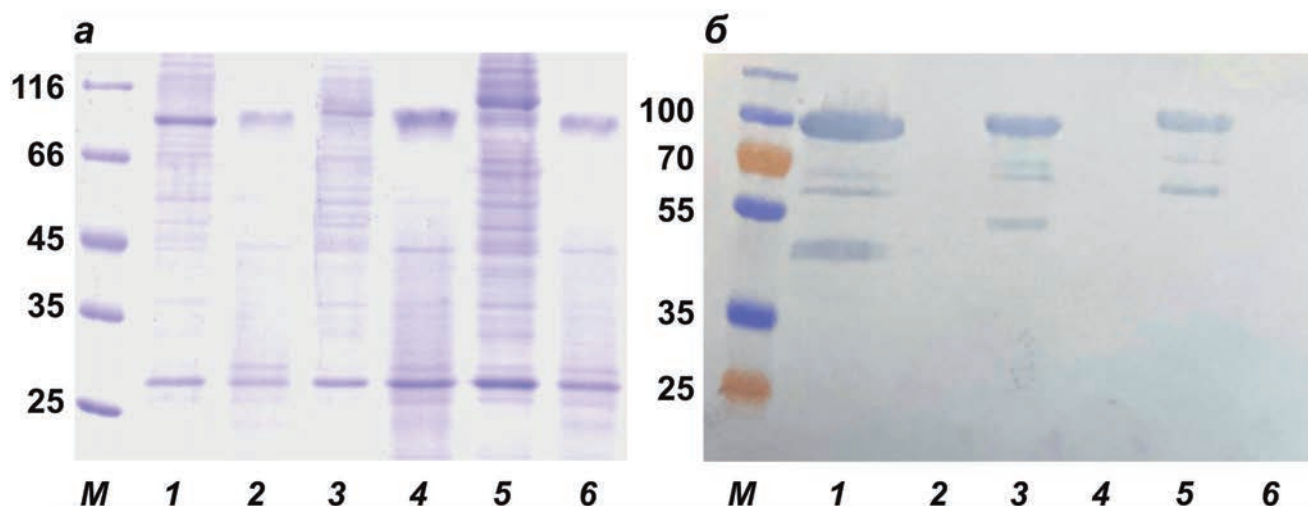


Рис. 3. Белковый электрофорез в 10%-ном SDS-ПААГ (а) и Вестерн-блот с анти-His конъюгатом (б) образцов мембранной фракции клеток C41(DE3), экспрессирующих делеционные варианты EsOgl877. Дорожки 1 и 2 – $\Delta 239$; дорожки 3 и 4 – $\Delta 310$; дорожки 5 и 6 – EsOgl877, до (дорожки 1, 3, 5) и после (дорожки 2, 4, 6) обработки клеток протеиназой К. М – маркеры молекулярной массы белков (кДа)

ляет 30 °С. Клетки, экспрессирующие EsOgl877, сохраняли около 90% ферментативной активности от максимальной (достигаемой при оптимальной температуре) в диапазоне 15–35 °С (рис. 2), что достаточно хорошо совпадает с температурным диапазоном активности исходного фермента EsOgl [9].

Используя ранее полученные данные об удельной активности EsOgl [9], мы смогли примерно оценить число молекул фермента на поверхности одной клетки, которое составило около 14 000.

Оптимизация системы дисплея EsOgl с использованием делеционных вариантов AT877. Ранее нами было показано, что использование делеционных вариантов AT877 позволяет повысить уровень экспонирования пассажирского домена $^{10}\text{Fn3}$ на поверхности клеток *E. coli* [22]. Для оценки возможности использования данного подхода с целью оптимизации системы дисплея EsOgl мы получили два делеционных варианта гибридного аутотранспортера EsOgl877 $\Delta 239$ и EsOgl877 $\Delta 310$, содержащие в составе транслокаторного домена четыре и семь бета-тяжей из двенадцати. Конструирование и экспрессию генов делеционных вариантов EsOgl877 проводили, как было описано ранее для Fn877 [22]. Исследование мембранных фракций клеток *E. coli* с помощью белкового электрофореза и Вестерн-блота с антителами к гексагистидиновой последовательности продемонстрировало, что укороченные варианты гибридного АТ обнаруживаются в мембранной фракции, подобно полноразмерному EsOgl877 (рис. 3, а). Анализ клеток, экспрессирующих укороченные варианты EsOgl877,

после обработки протеиназой К показал, что пассажирский домен во всех случаях локализован на клеточной поверхности (рис. 3, б).

Клетки *E. coli*, экспрессирующие делеционные варианты EsOgl877, демонстрировали олиго- α -1,6-гликозидазную активность по отношению к pNPG (рис. 4). При этом удельная активность клеток, содержащих EsOgl877 $\Delta 239$ и EsOgl877 $\Delta 310$, была соответственно в 2,7 и 2,4 раза выше, чем клеток, экспрессирующих полноразмерный АТ. Расчетное число молекул фермента на поверхности одной клетки для них составило соответственно 38 и 34 тысячи. Для подтверждения интактности клеток в процессе эксперимента был проведен их анализ методом ELISA с использованием антител к гексагистидиновой последовательности. Поскольку эта последовательность располагается

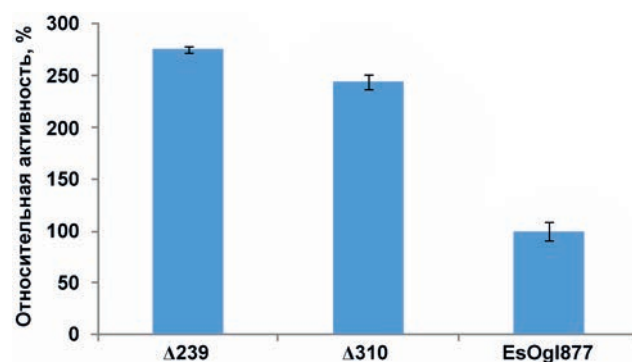


Рис. 4. Сравнительная ферментативная активность клеток C41(DE3), экспрессирующих EsOgl877 и его делеционные варианты, по отношению к pNPG. Представлены средние значения трех повторностей $\pm$ относительное стандартное отклонение. Активность клеток, экспрессирующих EsOgl877, принималась за 100%

на С-конце белка, который, предположительно, ориентирован в периплазму, в случае сохранения целостности мембраны она недоступна для связывания специфических антител. Действительно, уровень сигнала, обеспечиваемый клетками с экспрессией полноразмерного EsOgl877 и его делеционных вариантов после обработки лизоцимом или замораживания-оттаивания, оказался примерно в 4 раза выше, чем у клеток, не подвергавшихся такой обработке (данные не приведены), что доказывает отсутствие существенного лизиса.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование структурных элементов АТ является популярной стратегией для конструирования систем клеточного дисплея [11, 18]. В большинстве случаев природный пассажирский домен АТ может быть заменен целевым белком, который в результате процесса последовательного взаимодействия с компонентами секреторного аппарата клеток и специализированного Bam-комплекса оказывается экспонированным на клеточной поверхности [23, 24]. При этом структура пассажирского домена может оказывать непосредственное влияние на эффективность дисплея. Для природных пассажирских доменов с β -спиральной пространственной структурой (пертактина, EspP и других) установлена зависимость эффективности их экспорта на клеточную поверхность от наличия С-концевого аутошаперона, обладающего повышенной скоростью сворачивания [25–27]. В результате замены N-концевой части пассажирского домена пертактина мутантными вариантами дигидрофолатредуктазы было показано, что мутанты, обладающие меньшей стабильностью, способствуют увеличению эффективности секреции по сравнению с белком дикого типа [27, 28].

Известно, что холодоактивные ферменты обладают пониженной стабильностью, что является следствием особенностей их первичной и пространственной структуры [29–31]. Ранее мы показали, что холодоактивная эстераза EstPc *P. cryohalolentis*, обладающая липолитической активностью в температурном диапазоне 10–35 °C [32], может быть эффективно экспонирована на поверхности клеток *E. coli* с использованием сконструированной нами системы дисплея на основе АТ877 [19]. Кроме того, расположение EstPc на N-конце пассажирского домена позволило повысить уровень секреции $^{10}\text{Fn3}$, обладающего более стабильной структурой [20].

В данной работе мы продемонстрировали, что гибридный АТ, содержащий холодоактивную олиго- α -1,6-гликозидазу *Exi. sibiricum*, также обеспечивает высокий уровень транспорта пассажирского домена на клеточную поверхность, что было показано с помощью анализа ферментативной активности и протеолитической обработки целых клеток. Клетки, экспрессирующие EsOgl на поверхности, демонстрируют высокую ферментативную активность при температуре 15–35 °C. Ранее мы показали, что EsOgl обладает максимальной активностью при 25 °C, и при этом сохраняет более 75% активности в диапазоне 10–40 °C [9]. Дальнейшее повышение температуры приводит к быстрой инактивации фермента.

Анализ полученных результатов позволяет высказать предположение о высокой совместимости со структурными элементами АТ и, как следствие, повышенной эффективности экспорта холодоактивных ферментов и других белков психрофильных организмов с использованием системы секреции V-типа. Безусловно, подтверждение данной гипотезы требует проведения дополнительных исследований и конструирования систем дисплея новых холодоактивных белков.

Ранее мы показали, что использование делеционных вариантов АТ877 позволяет повысить уровень экспорта пассажирского домена на поверхность клеток [22]. Белок $^{10}\text{Fn3}$, который являлся пассажирским доменом в предыдущем исследовании, обладает высокой скоростью сворачивания в цитоплазме клеток. Соответственно, эффективность его транспорта с использованием полноразмерного АТ877 исходно была достаточно низкой [20]. Интересно было проверить, позволит ли укорочение транслокаторного домена АТ877 повысить уровень секреции EsOgl. Проведенные нами эксперименты показали, что делеции положительно повлияли на эффективность транспорта и в данном случае, что привело к повышению ферментативной активности клеток в 2,7 и 2,4 раза, причем клетки, экспрессирующие более короткий белок, обладали большей гликозидазной активностью. Мы предполагаем, что это связано с увеличением числа молекул пассажирского домена (EsOgl) на поверхности клеток, экспрессирующих делеционные варианты гибридного АТ. В дальнейшем мы планируем продолжить работы по получению новых делеционных вариантов и исследованию их свойств.

Таким образом, можно утверждать, что предложенная система клеточного дисплея на

основе ауотранспортера AT877 *P. cryohalolentis* обладает достаточной универсальностью и позволяет экспонировать на поверхности клеток *E. coli* белки, обладающие различными ферментативными активностями, в том числе олиго- α -1,6-гликозидазной. В сочетании с другими цельноклеточными биокатализаторами полученный штамм может быть использован для эффективной биотехнологической переработки крахмалосодержащего сырья. Разработанные нами подходы к повышению эффективности секреции белков семейства AT могут найти применение в конструировании систем бактериального дисплея других гетерологичных пассажирских доменов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проделанной работы получены гибридный AT, содержащий холодо-активную олиго- α -1,6-гликозидазу, и два его укороченных варианта. Все варианты обеспечивают высокий уровень транспорта пассажирского домена на клеточную поверхность. Следует отметить, что делеции привели к уве-

личению эффективности транспорта EsOgl и повышению ферментативной активности клеток в 2,7 и 2,4 раза, причем клетки, экспрессирующие самый короткий белок, обладали максимальной активностью. Полученные нами результаты могут быть использованы для оптимизации систем дисплея на поверхности клеток *E. coli*.

Вклад авторов. Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, М.П. Кирпичников – концепция и руководство работой; Л.Н. Шингарова, Е.А. Крюкова, С.Ш. Гапизов – проведение экспериментов; Л.Н. Шингарова, Л.Е. Петровская, Д.А. Долгих – обсуждение результатов исследования; Л.Е. Петровская, Л.Н. Шингарова – написание текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания ИБХ РАН № FMFM-2019-0007 (0101-2019-0007).

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. Van der Maarel, M. J. E. C., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family, *J. Biotechnol.*, **94**, 137-155, doi: 10.1016/s0168-1656(01)00407-2.
2. Hua, X., and Yang, R. (2016) *Enzymes in starch processing*, in *Enzymes in Food and Beverage Processing* (Chandrasekaran, M. ed.) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 139-170.
3. Dong, Z., Tang, C., Lu, Y., Yao, L., and Kan, Y. (2020) Microbial oligo- α -1,6-glucosidase: current developments and future perspectives, *Starch Stärke*, **72**, 1900172, doi: 10.1002/star.201900172.
4. Watanabe, K., Hata, Y., Kizaki, H., Katsube, Y., and Suzuki, Y. (1997) The refined crystal structure of *Bacillus cereus* oligo-1,6-glucosidase at 2.0 Å resolution: structural characterization of proline-substitution sites for protein thermostabilization, *J. Mol. Biol.*, **269**, 142-153, doi: 10.1006/jmbi.1997.1018.
5. Watanabe, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. (1996) Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2066-2073, doi: 10.1128/aem.62.6.2066-2073.1996.
6. Watanabe, K., Chishiro, K., Kitamura, K., and Suzuki, Y. (1991) Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006, *J. Biol. Chem.*, **266**, 24287-24294, doi: 10.1016/S0021-9258(18)54226-5.
7. Feller, G. (2013) Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology, *Scientifica*, **2013**, 512840, doi: 10.1155/2013/512840.
8. Barroca, M., Santos, G., Gerday, C., and Collins, T. (2017) *Biotechnological Aspects of Cold-Active Enzymes*, in *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology* (Margesin, R. ed.) Springer International Publishing, Cham, pp. 461-475, doi: 10.1007/978-3-319-57057-0_19.
9. Berlina, Y. Y., Petrovskaya, L. E., Kryukova, E. A., Shingarova, L. N., Gapizov, S. S., Kryukova, M. V., Rivkina, E. M., Kirpichnikov, M. P., and Dolgikh, D. A. (2021) Engineering of Thermal stability in a cold-active oligo-1,6-glucosidase from *Exiguobacterium sibiricum* with unusual amino acid content, *Biomolecules*, **11**, 1229, doi: 10.3390/biom11081229.
10. Van Ulsen, P., ur Rahman, S., Jong, W. S., Daleke-Schermerhorn, M. H., and Luirink, J. (2014) Type V secretion: from biogenesis to biotechnology, *Biochim.*

- Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1843**, 1592-1611, doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.006.
11. Nicolay, T., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2015) Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **41**, 109-123, doi: 10.3109/1040841X.2013.804032.
 12. De Carvalho, C. C. (2017) Whole cell biocatalysts: essential workers from nature to the industry, *Micr. Biotechnol.*, **10**, 250-263, doi: 10.1111/1751-7915.12363.
 13. Schüürmann, J., Quehl, P., Festel, G., and Jose, J. (2014) Bacterial whole-cell biocatalysts by surface display of enzymes: toward industrial application, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 8031-8046, doi: 10.1007/s00253-014-5897-y.
 14. He, M.-X., Feng, H., and Zhang, Y.-Z. (2008) Construction of a novel cell-surface display system for heterologous gene expression in *Escherichia coli* by using an outer membrane protein of *Zymomonas mobilis* as anchor motif, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 2111-2117, doi: 10.1007/s10529-008-9813-3.
 15. Ryu, S., and Karim, M. N. (2011) A whole cell biocatalyst for cellulosic ethanol production from dilute acid-pretreated corn stover hydrolyzates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, 529-542, doi: 10.1007/s00253-011-3261-z.
 16. Muñoz-Gutiérrez, I., Oropeza, R., Gosset, G., and Martinez, A. (2012) Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1141-1152, doi: 10.1007/s10295-012-1122-0.
 17. Soma, Y., Inokuma, K., Tanaka, T., Ogino, C., Kondo, A., Okamoto, M., and Hanai, T. (2012) Direct isopropanol production from cellobiose by engineered *Escherichia coli* using a synthetic pathway and a cell surface display system, *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 80-85, doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.019.
 18. Van Ulsen, P., Zinner, K. M., Jong, W. S. P., and Luirink, J. (2018) On display: autotransporter secretion and application, *FEMS Microbiol. Lett.*, **365**, fny165, doi: 10.1093/femsle/fny165.
 19. Petrovskaya, L., Novototskaya-Vlasova, K., Kryukova, E., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2015) Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* K5T, *Extremophiles*, **19**, 161-170, doi: 10.1007/s00792-014-0695-0.
 20. Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Shingarova, L., Boldyreva, E., Gapizov, S. S., Novototskaya-Vlasova, K., Rivkina, E., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2018) Fusion with the cold-active esterase facilitates autotransporter-based surface display of the 10th human fibronectin domain in *Escherichia coli*, *Extremophiles*, **22**, 141-150, doi: 10.1007/s00792-017-0990-7.
 21. Shingarova, L., Petrovskaya, L., Zlobinov, A., Gapizov, S. S., Kryukova, E., Birikh, K., Boldyreva, E., Yakimov, S., Dolgikh, D., and Kirpichnikov, M. (2018) Construction of artificial TNF-binding proteins based on the 10th human fibronectin type III domain using bacterial display, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 708-716, doi: 10.1134/S0006297918060081.
 22. Shingarova, L. N., Petrovskaya, L. E., Kryukova, E. A., Gapizov, S. S., Boldyreva, E. F., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2022) Deletion variants of autotransporter from *Psychrobacter cryohalolentis* increase efficiency of ¹⁰FN3 exposure on the surface of *Escherichia coli* cells, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 932-939, doi: 10.1134/S0006297922090061.
 23. Dalbey, R. E., and Kuhn, A. (2012) Protein traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way, *FEMS Microbiol. Rev.*, **36**, 1023-1045, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00327.x.
 24. Kim, K. H., Aulakh, S., and Paetzel, M. (2012) The bacterial outer membrane beta-barrel assembly machinery, *Prot. Sci.*, **21**, 751-768, doi: 10.1002/pro.2069.
 25. Peterson, J. H., Tian, P., Ieva, R., Dautin, N., and Bernstein, H. D. (2010) Secretion of a bacterial virulence factor is driven by the folding of a C-terminal segment, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **107**, 17739-17744, doi: 10.1073/pnas.1009491107.
 26. Junker, M., Besingi, R. N., and Clark, P. L. (2009) Vectorial transport and folding of an autotransporter virulence protein during outer membrane secretion, *Mol. Microbiol.*, **71**, 1323-1332, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06607.x.
 27. Renn, J. P., Junker, M., Besingi, R. N., Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) ATP-independent control of autotransporter virulence protein transport via the folding properties of the secreted protein, *Chem. Biol.*, **19**, 287-296, doi: 10.1016/j.chembiol.2011.11.009.
 28. Braselmann, E., and Clark, P. L. (2012) Autotransporters: the Cellular environment reshapes a folding mechanism to promote protein transport, *J. Phys. Chem. Lett.*, **3**, 1063-1071, doi: 10.1021/jz201654k.
 29. Siddiqui, K. S., and Cavicchioli, R. (2006) Cold-adapted enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 403-433, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142723.
 30. Struvay, C., and Feller, G. (2012) Optimization to low temperature activity in psychrophilic enzymes, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 11643-11665, doi: 10.3390/ijms130911643.
 31. Santiago, M., Ramírez-Sarmiento, C. A., Zamora, R. A., and Parra, L. P. (2016) Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes, *Front. Microbiol.*, **7**, 1408, doi: 10.3389/fmicb.2016.01408.
 32. Novototskaya-Vlasova, K., Petrovskaya, L., Yakimov, S., and Gilichinsky, D. (2012) Cloning, purification, and characterization of a cold adapted esterase produced by *Psychrobacter cryohalolentis* K5T from Siberian cryopeg, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **82**, 367-375, doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01385.x.

**DISPLAY OF OLIGO- α -1,6-GLYCOSIDASE
FROM *Exiguobacterium sibiricum* AT THE SURFACE
OF *Escherichia coli* CELLS**

**L. N. Shingarova^{1*}, L. E. Petrovskaya¹, E. A. Kryukova¹, S. S. Gapizov^{1,2},
D. A. Dolgikh^{1,2}, and M. P. Kirpichnikov^{1,2}**

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: lshingarova@gmail.com*

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

Cell-surface display based on the use of anchor motifs of outer membrane proteins allows the exposure of target peptides and proteins on the surface of microbial cells. Previously, we obtained and characterized recombinant oligo- α -1,6-glycosidase of the psychrotrophic bacterium *Exiguobacterium sibiricum* (EsOgl) which demonstrated high catalytic activity. It has also been shown that the autotransporter AT877 from *Psychrobacter cryohalolentis* and its deletion variants effectively exhibit the 10th domain of type III fibronectin (10Fn3) on the surface of *Escherichia coli* cells. The aim of the work was to obtain an EsOgl display system on the surface of bacterial cells based on AT877. The genes of the hybrid autotransporter EsOgl877 and its deletion mutants EsOgl877 Δ 239 and EsOgl877 Δ 310 were constructed. The enzymatic activity of EsOgl877 was investigated and it was found that the cells expressing this protein retained about 90% of the maximum activity in the range of 15–35°C. It was shown that activity of the cells containing EsOgl877 Δ 239 and EsOgl877 Δ 310 was 2.7 and 2.4 times higher, respectively, than of the cells expressing full-sized AT. Analysis of cells expressing shortened variants of EsOgl877 after treatment with proteinase K showed that the passenger domain is also localized on the cell surface. The obtained results can be used for optimization of the display systems of oligo- α -1,6-glycosidase and other heterologous proteins on the surface of *E. coli* cells.

Keywords: secretion, autotransporter, oligo- α -1,6-glucosidase, bacterial display

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. Общие положения

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

1.2. Журнал «Биохимия» публикует работы по всем разделам биохимии, а также концептуально важные работы по биохимическим аспектам смежных областей (молекулярной биологии, биофизики, биоорганической химии, микробиологии, иммунологии, физиологии, нейробиологии, геронтологии, биомедицинских наук и др.), направленные на понимание молекулярных и клеточных основ биологических процессов. В журнале печатаются описания новых экспериментальных методик в области биохимии, теоретических достижений, имеющих значение для биохимии, а также 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 редколлегией) обзоры по наиболее актуальным проблемам биохимии и смежных наук. К обзорным статьям предъявляются следующие требования: 1) у авторов должны быть свои работы по теме обзора; 2) список цитированной литературы должен включать работы, опубликованные по данной теме в течение последних 5 лет; 3) обзор не должен быть пересказом и, подчас, дословным цитированием кусков ранее опубликованных работ, в нем должен быть критический разбор цитируемых материалов и своя концепция, свое видение проблемы, побудившее авторов написать данный обзор. Редакция и рецензенты строго следят за плагиатом.

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

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

1.5. Правила для авторов и информацию о журнале можно найти на сайтах журнала

<https://biochemistrymoscow.com>,

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>,

а также на порталах издательств Pleiades

<https://pleiades.online/ru/journal/biochmsc/> и Springer

<https://link.springer.com/journal/10541>.

На сайте журнала на английском языке представлены содержания всех выпусков, начиная с 1996 г., с резюме статей, ключевыми словами и адресами авторов, а также в полном объеме – тематические выпуски журнала, посвященные наиболее актуальным проблемам биохимии.

1.6. Импакт-фактор Biochemistry (Moscow) в 2021 г. составил 2.824, импакт-фактор РИНЦ для «Биохимии» – 2.908. По данным Scopus журнал находится во 2-й квартили (Q2) среди журналов медико-биологического профиля.

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). Всю информацию о публикации статьи в свободном доступе можно найти на сайте издательства:

<http://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

ozrina@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 желательно 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 ин-

формация о потенциальных конфликтах интересов; 4) авторы ознакомились с правилами проведения исследований с участием человека и/или животных и соблюдают их; 5) каждый соавтор сообщает о своем согласии на авторство в статье (см. соответствующие Положения на сайтах журнала и на порталах Springer и Pleiades).

3. Требования к оформлению рукописей

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

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

Индекс УДК (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 решётки (#).

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 – обсуждение 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 содержится 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, ссылается 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 место работы.

Следует избегать появления дублированных ссылок в списке литературы, а также ссылки 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. Tran, Q. M., Fong, C., Rothery, R. A., Maklashina, E., and Cecchini, G. (2012) Out of plane distortions of the heme b of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase, *PLoS One*, **7**, e32641, doi: 10.1371/journal.pone.0032641.
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 биoluminesцентного 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)*, **78**, 1228-1237, doi: 10.1134/S0006297913110035.

Для авторов, использующих систему EndNote, редакция предоставляет стиль, который поддерживает форматирование цитат в тексте и список литературы. Стилевой файл можно найти на сайтах журнала

<https://biochemistrymoscow.com>,

<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>.

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, 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 Times New

Roman) 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».

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.