

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

№ 4 • 2015 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Физиология

Абрамочкин Д.В., Пустовит К.Б., Филатова Т.С. Действие диаденозиновых полифосфатов на калиевые токи входящего выпрямления в кардиомиоцитах крысы. 3

Геронтология

Вайсерман А.М. Эпигенетические и эндокринные детерминанты различий по длительности жизни между кастами социальных насекомых 8

Моргунова Г.В., Колесников А.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Ассоциированная со старением бета-галактозидаза — биомаркер старения, повреждения ДНК или ограничения клеточной пролиферации? 15

Биохимия

Мармий Н.В., Есипов Д.С. Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина 19

Молекулярная биология

Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Исследование ионного окружения и электрических характеристик нуклеосом методом молекулярной динамики 24

Вирусология

Атабеков И.Г., Никитин Н.А., Карпова О.В. Новый тип платформ для сборки вакцин *in vitro* 29

Микробиология

Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Пименов Н.В. Обнаружение анаэробных сульфат-редуцирующих бактерий в кислородсодержащих верхних водных горизонтах Черного и Балтийского морей. 36

Методы

Кудряшова К.С., Никитин Д.В., Чертков О.В., Герасимова Н.С., Валиева М.Е., Студитский В.М., Феофанов А.В. Разработка флуоресцентно-меченых моонуклеосом для изучения механизмов транскрипции методом микроскопии одиночных комплексов 41

Трифопова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц — новых биогенных платформ 46

Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2015 году 51

CONTENTS

Physiology

- Abramochkin D.V., Pustovit K.B., Filatova T.S.* Effects of diadenosine polyphosphates on inward rectifier potassium currents in rat cardiomyocytes 3

Gerontology

- Vaiserman A.M.* Epigenetic and endocrine determinants of differences in lifespan between castes of social insects 8
- Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N.* Senescence-associated beta-galactosidase — a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? 15

Biochemistry

- Marmiy N.V., Esipov D.S.* Biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. 19

Molecular biology

- Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* Distribution of ions and electrostatic potential in nucleosomes as studied with molecular dynamics 24

Virology

- Atabekov J.G., Nikitin N.A., Karpova O.V.* New type platforms for *in vitro* vaccines assembly . . 29

Microbiology

- Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Pimenov N.V.* Detection of anaerobic sulfate-reducing bacteria in oxygen-containing upper water layers of the Black and Baltic seas 36

Methods

- Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V.* Development of fluorescently labelled mononucleosomes to study transcription mechanisms by method of microscopy of single complexes 41
- Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov J.G.* Obtaining and characterization of spherical particles — new biogenic platforms 46
- Index of papers* published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2015 51

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 591.112.1

ДЕЙСТВИЕ ДИАДЕНОЗИНОВЫХ ПОЛИФОСФАТОВ НА КАЛИЕВЫЕ ТОКИ ВХОДЯЩЕГО ВЫПРЯМЛЕНИЯ В КАРДИОМИОЦИТАХ КРЫСЫ

Д.В. Абрамочкин, К.Б. Пустовит, Т.С. Филатова

(кафедра физиологии человека и животных; e-mail: abram340@mail.ru)

Диаденозиновые полифосфаты в настоящее время рассматриваются как новый класс эндогенных паракринных регуляторных соединений. Поскольку известно, что уровень диаденозиновых полифосфатов повышается в сердечной ткани при ишемическом повреждении и гибели кардиомиоцитов, предполагается важная роль этих соединений в патогенезе инфаркта миокарда. В связи с этим большой интерес представляет действие диаденозиновых полифосфатов на электрическую активность сердца и ионные механизмы этого действия.

В данной работе изучено влияние диаденозинпентафосфата (Ap5A), диаденозинтетрафосфата (Ap4A) и НАД^+ на трансмембранные токи, относящиеся к группе калиевых токов входящего выпрямления — фоновый ток входящего выпрямления (I_{K1}), АТФ-зависимый ток ($I_{\text{КАТР}}$) и ацетилхолинзависимый ток ($I_{\text{КАСЧ}}$). Эксперименты выполнены методом пэтч-кламп в конфигурации whole-cell на изолированных предсердных и желудочковых кардиомиоцитах крысы. Показано, что ни одно из исследуемых адениновых соединений не оказывает существенного влияния на I_{K1} и $I_{\text{КАСЧ}}$. Ap5A (10^{-5}M) существенно снижает величину как входящей, так и выходящей компоненты $I_{\text{КАТР}}$ соответственно на 22,1 и 19% от контрольной величины. Большая концентрация Ap5A ($3 \times 10^{-5}\text{M}$) вызывает более сильное подавление $I_{\text{КАТР}}$ — на 47,5% и 37,8% соответственно. Однако $I_{\text{КАТР}}$ оказался нечувствителен к Ap4A и НАД^+ .

Ключевые слова: сердце, ионные токи, АТФ, диаденозиновые полифосфаты, НАД^+ .

Диаденозиновые полифосфаты (ДАП) представляют собой семейство молекул, в структуру которых входят два аденозиновых основания, соединенных несколькими остатками фосфорной кислоты. В организме ДАП являются эндогенными соединениями: они могут образовываться с помощью специфических ферментных систем в большинстве тканей, присутствуют как в цитоплазме различных клеток, так и во внеклеточной среде и плазме [1]. В настоящее время ДАП и их производные считаются новым классом паракринных регуляторных соединений, обладающих широким спектром физиологической активности. Сходный по структуре с ДАП, никотинамидадениндинуклеотид (НАД^+), в составе которого один аденин заменен на никотинамид, рассматривается в настоящее время как новый нейротрансмиттер, так как он может выделяться из пресинаптических нервных окончаний, метаболизироваться вне клетки, связываться с рецепторами на клеточной мембране [2–4].

ДАП способны регулировать кровоток и тонус гладкой мускулатуры сосудов, полых органов, агрегацию тромбоцитов, клеточную пролиферацию [5]. В отношении действия ДАП и родственных соединений на миокард данных значительно меньше, несмотря на известное повышение уровня ДАП в сердечной ткани при ее ишемическом повреждении и гибели кардиомиоцитов, которое указывает на вероятную роль этих соединений в патогенезе инфаркта миокарда. Ранее нашей группой было

показано, что внеклеточный НАД^+ оказывает существенное влияние на конфигурацию потенциалов действия (ПД), а также сократительную активность рабочего миокарда [6] и пейсмекера сердца [7] крысы. Предварительные данные указывают также на способность диаденозинпентафосфата (Ap5A) и диаденозинтетрафосфата (Ap4A) модифицировать электрическую активность миокарда. Однако ионные механизмы эффектов ДАП и НАД^+ в миокарде остаются неизученными.

Одной из важнейших групп ионных токов, определяющих электрическую активность миокарда, является семейство калиевых токов входящего выпрямления (I_{K1}). Оно включает 3 тока: фоновый ток входящего выпрямления (I_{K1}), АТФ-зависимый ток ($I_{\text{КАТР}}$) и ацетилхолинзависимый ток ($I_{\text{КАСЧ}}$) [8]. Из этих токов только I_{K1} , основная функция которого — поддержание стабильного потенциала покоя, присутствует в кардиомиоцитах постоянно. Ток $I_{\text{КАСЧ}}$ активируется исключительно при стимуляции мускариновых или аденозиновых рецепторов за счет взаимодействия $\beta\gamma$ -субъединиц G_i -белков, сопряженных с этими рецепторами, с калиевыми ацетилхолинзависимыми каналами. Активация $I_{\text{КАСЧ}}$ приводит к гиперполяризации, выраженной главным образом в пейсмекерных клетках [9], и уменьшению длительности ПД. Каналы $I_{\text{КАСЧ}}$ экспрессируются главным образом в суправентрикулярном миокарде.

В отличие от I_{K1} и $I_{\text{КАСЧ}}$, ток $I_{\text{КАТР}}$ индуцируется в кардиомиоцитах исключительно в патологиче-

ских условиях дефицита энергии, например при ишемии. Снижение цитоплазматического уровня АТФ приводит к диссоциации АТФ, связанного в норме с молекулами каналов, что и приводит к открыванию этих каналов. Возникающий при этом $I_{КАТР}$ имеет значительную величину и может индуцировать не только укорочение ПД, но и снижение амплитуды ПД вплоть до полного прекращения электрической активности [8]. Предполагается, что умеренная активация $I_{КАТР}$ может иметь определенное протекторное значение, позволяя уменьшить расход энергии на сократительную активность.

В данной работе было впервые изучено влияние Ар5А, Ар4А и НАД⁺ на все три калиевых тока входящего выпрямления — I_{K1} , $I_{КАТР}$ и $I_{КАCh}$ — в желудочковых и предсердных кардиомиоцитах крысы.

Объекты и методы

При проведении работы были использованы 11 самцов белых беспородных крыс массой 300–350 г. Изолированные желудочковые и предсердные кардиомиоциты выделяли по описанной ранее методике [10]. Животным вводили внутривенно гепарин (1000 ед/кг), после чего декапитировали и вскрывали грудную клетку. Сердце выделяли и промывали раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl — 133,47; KCl — 4,69; NaH₂PO₄·2H₂O — 1,35; NaHCO₃ — 16,31; MgSO₄·7H₂O — 1,18; CaCl₂·2H₂O — 2,5; глюкоза — 7,77), насыщенным карбогеном (газовая смесь 95% — O₂, 5% — CO₂). Затем в течение 10 мин ретроградно перфузировали сердце по Лангендорфу в системе с постоянным протоком модифицированным бескальциевым раствором Тироде (состав в ммоль/л: NaCl — 120; KCl — 5,4; MgSO₄·7H₂O — 5; пируват натрия — 5; глюкоза — 20; таурин — 20 и Hepes — 10, pH 6,9). Далее сердце перфузировали раствором аналогичного состава с добавлением коллагеназы типа II (0,5 мг/мл) и 20 мкМ CaCl₂ в течение 15 или 25 мин для выделения желудочковых и предсердных кардиомиоцитов соответственно. Перфузию проводили при температуре 37±1°C и постоянном насыщении раствора карбогеном (95% — O₂, 5% — CO₂). После завершения перфузии желудочки либо предсердия сердца отрезали, измельчали и механически выделяли кардиомиоциты в растворе Крафтбрюэ следующего состава (ммоль/л): KCl — 30; глутамат калия — 50; K₂HPO₄·2H₂O — 30; MgSO₄·7H₂O — 3; EGTA — 0,5; глюкоза — 10; таурин — 20 и Hepes — 10, pH 7,2 [10]. Данный раствор использовали также для хранения клеток в течение 6–7 ч.

Ионные токи регистрировали методом пэтч-кламп в конфигурации whole cell при помощи усилителя EPC 800 USB (Heka Instruments, Германия). Кардиомиоциты помещали в экспериментальную камеру RC-26 (Warner Instrument Corp, Brunswick, CT, USA) объемом 150 мкл с постоянным протоком физиологического раствора (состав в ммоль/л: NaCl — 150; KCl — 5,4; CaCl₂ — 1,8; MgCl₂ — 1,2;

глюкоза — 10; Hepes — 10, pH 7,6) комнатной температуры (24±1°C). Пэтч-пипетки изготавливали из боросиликатного стекла (Sutter Instruments, США) и заполняли раствором следующего состава (ммоль/л): KCl — 140; MgCl₂ — 1; EGTA — 5; Mg-АТФ — 4; Hepes — 10, pH 7,2. Сопротивление пипеток составляло в среднем 3,7±0,5 МΩ. Перед началом регистрации компенсировали емкость пипетки, емкость клетки и сопротивление доступа.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica v.6.0. При оценке достоверности различий использовали критерий Вилкоксона для связанных выборок. Использование непараметрического критерия было обусловлено малыми размерами выборок, не позволяющими гарантировать нормальность распределения.

Результаты и обсуждение

Калиевые токи входящего выпрямления индуцировали изменением мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до –120 мВ. Токи регистрировали в присутствии во внеклеточном растворе 10^{–5}М нифедипина, блокирующего входящие кальциевые токи, и 2 мМ 4-аминопиридина, ингибирующего транзиторный и ультрабыстрый калиевые токи в кардиомиоцитах крысы. Натриевый ток инактивировался благодаря низкому уровню поддерживаемого потенциала (–40 мВ). Таким образом, в этих условиях оставался незаблокированным только один лишний ток — калиевый I_{ss} [11], однако благодаря достаточно медленной активации этот ток имел незначительную величину при используемом нами линейном протоколе изменения мембранного потенциала. Как видно на рис. 1, фоновый ток, регистрируемый в таких условиях, обладал выраженным входящим выпрямлением. Кроме того, ток полностью блокировался Ba²⁺ в концентрации 2 мМ. Это позволяет заключить, что данный ток действительно является I_{K1} . Ни один из протестированных ДАП в концентрации 10^{–5}М, показавшей свою эффективность в экспериментах с внутриклеточной регистрацией электрической активности [6, 7], не вызывал существенных изменений фонового тока I_{K1} как в желудочковых (рис. 1), так и в предсердных (рис. 2) кардиомиоцитах крысы.

Ацетилхолинзависимый калиевый ток $I_{КАCh}$ может достигать лишь очень небольших величин в желудочковых миоцитах в связи с малой плотностью мускариновых рецепторов. Поэтому для исследования действия диаденозиновых полифосфатов на $I_{КАCh}$ использовали предсердные кардиомиоциты крысы. Ток индуцировали добавлением во внеклеточный раствор карбамилхолина (CCh), негидролизуемого аналога ацетилхолина, в концентрации 10^{–5}М, при этом регистрировали суммарный ток входящего выпрямления (I_{Kir}) — совокупность I_{K1} и $I_{КАCh}$. Затем на фоне CCh добавляли Ар5А, Ар4А и НАД⁺ в концентрации 10^{–5}М. Ни

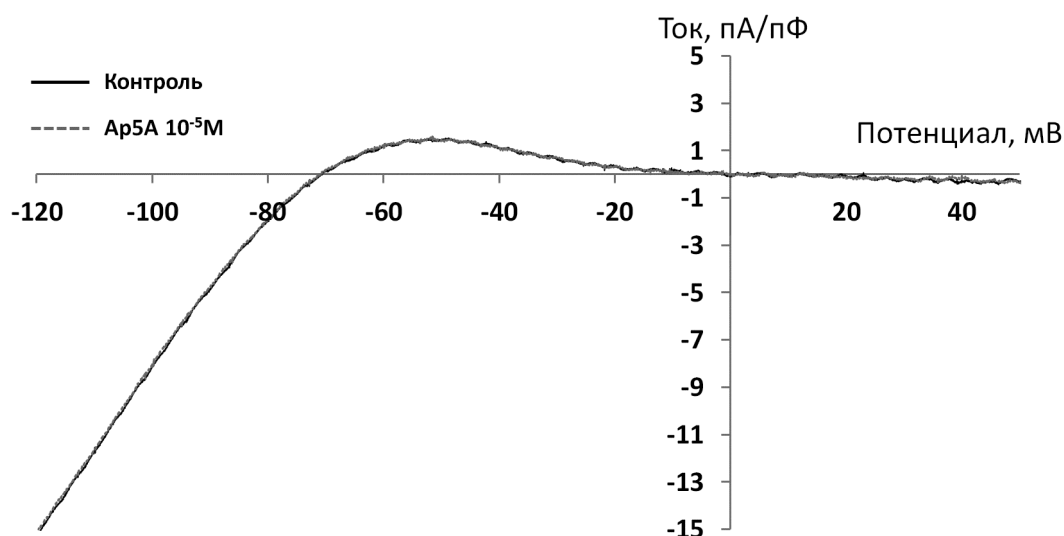


Рис. 1. Базальный калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} , зарегистрированный в желудочковых кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов. Вольт-амперные кривые I_{K1} в контроле и на фоне 10^{-5} М Ap5A, построенные по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте после вычитания тока утечки, зарегистрированного в присутствии 2 мМ хлорида бария. Здесь и далее ток входящего выпрямления регистрировали при изменении мембранного потенциала по линейному протоколу от +60 до -120 мВ

одно из трех соединений не вызвало достоверного изменения тока входящего выпрямления, регистрируемого на фоне CCh (рис. 2).

Для регистрации АТФ-зависимого калиевого тока I_{KATP} в желудочковых кардиомиоцитах крысы использовали пипеточный раствор модифицированного состава, в котором магниевая соль АТФ была заменена на эквивалентное количество хлорида магния. Кроме того, для ускорения индукции I_{KATP} во внеклеточный раствор добавляли ингибитор окислительного фосфорилирования — разобщитель электрон-транспортной цепи митохондрий — карбонил цианид 3-хлорофенилгидразон

(Carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP) в концентрации 10^{-7} М. После достижения I_{KATP} стабильного уровня добавляли ДАП или НАД^+ . НАД^+ (10^{-5} М) и Ap4A (10^{-5} М) не вызвали достоверного изменения I_{KATP} (рис. 3, Б). В отличие от них, воздействие Ap5A (10^{-5} М) привело к существенному снижению как входящей (при -120 мВ), так и выходящей (при 0 мВ) компоненты I_{KATP} (рис. 3) соответственно на 22,1 и 19% от контрольной величины суммарного тока входящего выпрямления. Ap5A в большей концентрации (3×10^{-5} М) вызвал более сильное подавление I_{KATP} — на 47,5 и 37,8% соответственно.

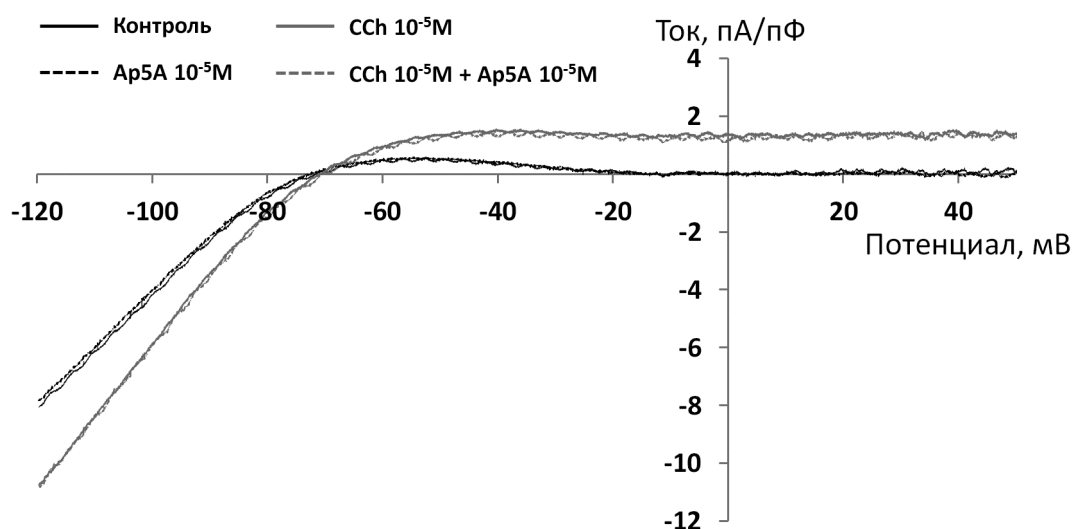


Рис. 2. Базальный калиевый ток входящего выпрямления I_{K1} и ацетилхолинзависимый калиевый ток входящего выпрямления I_{KACH} , зарегистрированные в предсердных кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов. Вольт-амперные кривые тока входящего выпрямления в нормальных условиях (базальный I_{K1}), в присутствии негидролизуемого аналога ацетилхолина CCh (сумма I_{K1} и I_{KACH}), а также при воздействии 10^{-5} М Ap5A самого по себе и на фоне 10^{-5} М CCh. Кривые построены по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте после вычитания тока утечки, зарегистрированного в присутствии 2 мМ хлорида бария

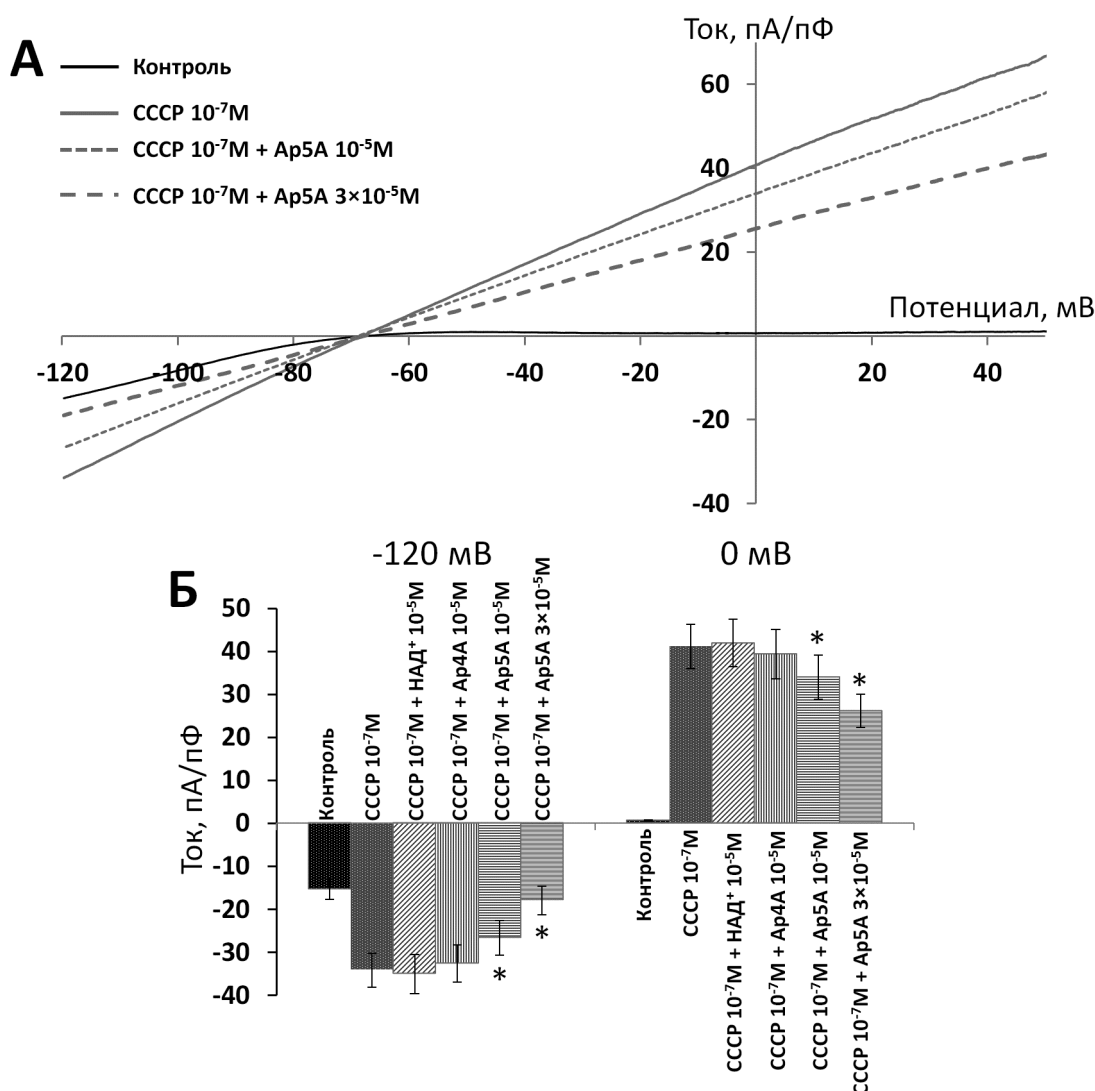


Рис. 3. АТФ-зависимый калиевый ток I_{KATP} , зарегистрированный в желудочковых кардиомиоцитах крысы в норме и на фоне действия диаденозиновых полифосфатов и НАД⁺. **А** — вольт-амперные кривые базального тока входящего выпрямления I_{K1} , а также суммарного тока входящего выпрямления ($I_{K1} + I_{KATP}$), зарегистрированного после индукции АТФ-зависимого тока ингибитором окислительного фосфорилирования CCCP (10^{-7} М), а также вольт-амперные кривые суммарного тока при добавлении 10^{-5} М и 3×10^{-5} М Ар5А на фоне 10^{-7} М CCCP. Кривые построены по оригинальным записям тока в репрезентативном эксперименте. **Б** — средние ($n = 8$, для второго столбца — $n = 32$) величины суммарного тока входящего выпрямления ($I_{K1} + I_{KATP}$), измеренного при -120 мВ (максимум входящей компоненты обоих токов) и 0 мВ (при этом потенциале I_{K1} отсутствует, весь ток представлен I_{KATP}), в контроле, после индукции I_{KATP} 10^{-7} М CCCP и при последующем добавлении на фоне CCCP диаденозиновых полифосфатов: 10^{-5} М НАД⁺, 10^{-5} М Ар4А, 10^{-5} М Ар5А, 3×10^{-5} М Ар5А. * — достоверность эффекта Ар5А на фоне CCCP (критерий Вилкоксона, $n = 8$)

Таким образом, среди всех токов входящего выпрямления лишь I_{KATP} показал некоторую чувствительность к воздействию ДАП. С одной стороны, данные результаты согласуются с отсутствием изменений потенциала покоя кардиомиоцитов под действием этих соединений [6, 7]. С другой стороны, добавление ДАП не вызывало какой-либо прибавки к регистрируемому фоновому току I_{K1} . Это означает, что наблюдаемое выраженное уменьшение длительности ПД под действием ДАП нельзя объяснить ранее описанным механизмом активации тока I_{KACH} через пуриновые рецепторы, поскольку в противном случае было бы зафиксировано появление дополнительного тока входящего выпрямления на фоне I_{K1} под действием ДАП.

Обнаруженная способность Ар5А снижать амплитуду I_{KATP} может играть существенную роль в условиях ишемии, подавляя протекторное воздействие данного тока. Однако для определения ионных механизмов электрофизиологических эффектов ДАП в непатологических условиях, когда ток I_{KATP} в кардиомиоцитах отсутствует, требуются дополнительные исследования.

Таким образом, токи I_{K1} и I_{KACH} нечувствительны ни к одному из протестированных соединений (НАД⁺, Ар4А, Ар5А). Ток I_{KATP} снижается под действием Ар5А, но нечувствителен к НАД⁺ и Ар4А.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00268).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baxi M.D., Vishwanatha J.K. Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 1995. Vol. 33. N 3. P. 121–128.
2. Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors // Physiol. Rev. 2007. Vol. 87. N 2. P. 659–797.
3. Smyth L.M., Yamboliev I.A., Mutafova-Yambolieva V.N. N-type and P/Q-type calcium channels regulate differentially the release of noradrenaline, ATP and beta-NAD in blood vessels // Neuropharmacology. 2009. Vol. 56. N 2. P. 368–378.
4. Yamboliev I.A., Smyth L.M., Durnin L., Dai Y., Mutafova-Yambolieva V.N. Storage and secretion of beta-NAD, ATP and dopamine in NGF-differentiated rat pheochromocytoma PC12 cells // Eur. J. Neurosci. 2009. Vol. 30. N 5. P. 756–768.
5. Flores N.A., Stavrou B.M., Sheridan D.J. The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system // Cardiovasc. Res. 1999. Vol. 42. N 1. P. 15–26.
6. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) на сократительную и биоэлектрическую активность сердца крысы // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2014. Т. 100. № 4. С. 445–457.
7. Пустовит К.Б., Кузьмин В.С., Сухова Г.С. Влияние внеклеточного никотинамидадениндинуклеотида (NAD⁺) на биоэлектрическую активность пейсмекера и проводящей системы сердца // Бюл. эксп. биол. мед. 2015. Т. 159. № 2. С. 4–6.
8. Hibino H., Inanobe A., Furutani K., Murakami S., Findlay I., Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles // Physiol. Rev. 2010. Vol. 90. N 1. P. 291–366.
9. Boyett M.R., Kodama I., Honjo H., Arai A., Suzuki R., Toyama J. Ionic basis of the chronotropic effect of acetylcholine on the rabbit sinoatrial node // Cardiovasc. Res. 1995. Vol. 29. N 6. P. 867–878.
10. Isenberg G., Klockner U. Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a “KB-medium” // Pflügers Arch. 1982. Vol. 395. N 1. P. 6–18.
11. Brouillette J., Clark R.B., Giles W.R., Fiset C. Functional properties of K⁺ currents in adult mouse ventricular myocytes // J. Physiol. 2004. Vol. 559. Pt. 3. P. 777–798.

Поступила в реакцию
11.05.15

EFFECTS OF DIADENOSINE POLYPHOSPHATES ON INWARD RECTIFIER POTASSIUM CURRENTS IN RAT CARDIOMYOCYTES

D.V. Abramochkin, K.B. Pustovit, T.S. Filatova

Diadenosine polyphosphates are now considered as a novel class of endogenous paracrine signal compounds. The putative role of these compounds in pathogenesis of myocardial infarction was proposed, since the concentration of diadenosine polyphosphates increases in the cardiac tissue following the ischemic lesion and myocardial necrosis. Therefore, possible effects of diadenosine polyphosphates on cardiac electrical activity and their ionic mechanisms are of considerable interest.

In the present study we have investigated the effects of diadenosine pentaphosphate (Ap5A), diadenosine tetraphosphate (Ap4A) and NAD⁺ on transmembrane currents, belonging to the family of potassium inward rectifiers: background inward rectifier (I_{K1}), ATP-dependent potassium current (I_{KATP}) and acetylcholine-dependent current (I_{KACH}). Experiments were performed using the whole-cell patch-clamp technique on isolated atrial and ventricular rat cardiomyocytes. We have demonstrated that none of tested adenine compounds affects I_{K1} and I_{KACH}. Ap5A (10⁻⁵M) induces considerable decrease of both inward and outward component of I_{KATP} by 22,1 and 19% of control value, respectively. Higher concentration of Ap5A (3×10⁻⁵M) produces stronger suppression of I_{KATP} — by 47,5 and 37,8%, respectively. However, I_{KATP} turned out to be insensitive to Ap4A and NAD⁺.

Key words: heart, ionic currents, ATP, diadenosine polyphosphates, NAD⁺.

Сведения об авторах

Абрамочкин Денис Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: abram340@mail.ru

Пустовит Ксения Борисовна — аспирант кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: k_pustovit@mail.ru

Филатова Татьяна Сергеевна — студент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: filka1994@gmail.com

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 595.7:577.24

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭНДОКРИННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РАЗЛИЧИЙ ПО ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЕЖДУ КАСТАМИ СОЦИАЛЬНЫХ НАСЕКОМЫХ

А.М. Вайсерман

(ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева” НАМН Украины, Киев, Украина; e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua)

Социальные насекомые являются перспективными модельными организмами при изучении механизмов, определяющих потенциал долгожительства. Они имеют кастовую систему, в которой существенно различающиеся по продолжительности жизни фенотипы возникают на основе идентичных геномов. У пчелы выбор различных “онтогенетических траекторий” зависит от длительности питания специфической питательной смесью (маточным молочком) на стадии личинки. Более длительное кормление маточным молочком приводит к формированию у королевы эпигенома, отличающегося от эпигенома рабочей пчелы. Подобные эпигенетические различия в свою очередь индуцируют эндокринные изменения, проявляющиеся в увеличении синтеза ювенильного гормона и активизации сигнального пути TOR (target of rapamycin), а также в модуляции инсулинового сигнального пути у “королевских” личинок. У взрослых особей от этих процессов зависит уровень синтеза вителлогенина (предшественника желтка яиц, в значительной степени влияющего на многие аспекты онтогенеза насекомых). В представленном обзоре обсуждаются эпигенетические и эндокринные механизмы, обуславливающие формирование контрастных по длительности жизни каст социальных насекомых.

Ключевые слова: касты социальных насекомых, онтогенетическое программирование, метилирование ДНК, эпигенетика, экспрессия гена, продолжительность жизни.

В исследованиях последних лет показано, что темп старения и продолжительность жизни (ПЖ) могут зависеть от условий раннего развития организма [1]. Несмотря на большое количество доказательств “онтогенетического программирования”, его механизмы все еще не до конца поняты. Перспективной моделью при исследовании этих механизмов являются социальные насекомые, имеющие касты, существенно различающиеся по ПЖ [2]. Например, у медоносной пчелы *Apis mellifera* из неоплодотворенных яиц развиваются самцы (трутни), а из оплодотворенных — самки (королевы и рабочие особи) [3]. Королева репродуктивно активна, в то время как рабочие пчелы стерильны. Рабочие особи развиваются из яиц, генетически не отличающихся от тех, из которых развиваются королевы. Последние, однако, имеют больший размер и живут гораздо дольше, чем рабочие пчелы. У различных видов социальных насекомых ПЖ королев и рабочих особей может отличаться в 100 раз [3]. ПЖ рабочих пчел составляет 15–38 сут в летний период и 150–200 сут в зимнее время, тогда как ПЖ королев — один-два года. Принадлежность к той или иной касте зависит от состава пищи на протяжении личиночной стадии развития насекомых [4, 5]. Королевы развиваются из личинок, потребляющих маточное молочко (royal jelly) на протяжении всего развития, а рабочие самки получают на последней личиночной стадии не столь обогащенный различными питательными компонентами субстрат (worker jelly).

Эпигенетические механизмы дифференцировки каст

Выявлено, что ключевую роль в процессе “онтогенетического программирования” каст играют индуцированные в раннем онтогенезе эпигенетические изменения (т.е. изменения экспрессии гена, не связанные с изменениями входящей в его состав ДНК), которые могут устойчиво воспроизводиться в ряду клеточных делений на протяжении всей жизни организма [1]. В последующих подразделах приведены доказательства роли эпигенетических факторов в определении каст у социальных насекомых.

Метилирование ДНК

Добавление к цитозиновым основаниям ДНК метильных групп ($-\text{CH}_3$) является ключевым механизмом “эпигенетического программирования” каст социальных насекомых [6]. В различных таксонах метилирование CpG островков (участков ДНК, обогащенных CG-парами) в регионе промотора гена приводит к ингибированию его транскрипции [7]. У различных видов старение связано с тотальным гипометилированием генома [8], хотя в некоторых промоторах может наблюдаться и гиперметилирование. В отличие от позвоночных, у которых процессы метилирования и деметилирования отчетливо выражены на всем протяжении онтогенеза, у многих родов насекомых, включая *Drosophila* и *Tribolium*,

метилирование ДНК выявляется только на ранних этапах эмбриогенеза [9]. Недавние исследования, однако, продемонстрировали, что этот механизм регуляции активности генов играет важную роль в онтогенезе социальных насекомых [6]. При подавлении при помощи малых интерферирующих РНК (миРНК) у личинок пчел экспрессии гена *Dnmt3*, кодирующего фермент, катализирующий метилирование ДНК, 72% вылупляющихся самок имели морфологические характеристики королев [10]. Выявлено, что в мозге рабочих пчел и королев по-разному метилированы более 550 генов [11]. 2399 из 6086 изученных Форетом с соавт. в полногеномном исследовании генов имели различные характеристики метилирования в головах личинок, принадлежащих к разным кастам [12]. Наибольшие различия выявлены в сигнальных путях инсулина и ювенильного гормона (ЮГ), а также гена киназы анапластической лимфомы, играющего важную роль в регуляции метаболизма. Различия между личинками разных каст обнаружены и в уровне метилирования некоторых CpG-сайтов гена *hexamerin 110*, кодирующего запасующий белок (storage protein) [13]. Изменение режима питания личинок повлияло на характеристики метилирования отдельных сайтов гена *dynactin p62*, являющегося важным регулятором питания у насекомых [14]. У личинок разных каст в возрасте 2, 4 и 6 сут выявлены отличия в уровне глобального метилирования [15]. Динамика изменения этого показателя также отличалась: у личинок королев уровень метилирования ДНК увеличивался от вторых до четвертых суток личиночного развития, а затем снижался, в то время как у личинок рабочих пчел он демонстрировал тенденцию к увеличению во всех возрастах. Общее количество по-разному метилированных генов также увеличивалось с возрастом: у 2-суточных личинок оно составляло 725, у 4-суточных — 3013 и у 6-суточных — 5049. При этом в 4- и 6-суточном возрасте уровень метилирования большинства из этих генов у личинок королев был существенно ниже, чем у рабочих особей. Наиболее выраженные различия выявлены в генетических путях, имеющих отношение к регуляции развития, метаболизма и репродукции.

Роль метилирования ДНК в процессе кастовой дифференциации выявлена также у муравьев, включая *Camponotus floridanus* и *Harpegnathos saltator* [16]. Особенно выраженные различия обнаружены в отношении генов, вовлеченных в регуляцию процессов химической коммуникации и нейрональные функции [17].

Альтернативный сплайсинг

Важную роль в дифференциации каст играет альтернативный сплайсинг (процесс, при котором экзоны гена соединяются друг с другом в различных комбинациях, образуя разные мРНК и, соот-

ветственно, изоформы белков) [12]. Лико с соавт., осуществив полногеномное исследование метилирования ДНК в мозге различных каст пчел, показали, что метилированные CpG локализованы преимущественно в экзонах, подвергшихся альтернативному сплайсингу [11]. Эта закономерность была выявлена, в частности, для генов, кодирующих гистоны.

Модификации гистонов

Модификации гистонов хроматина являются еще одним важным механизмом эпигенетической регуляции фенотипической пластичности социальных насекомых. Ацетилирование лизиновых остатков гистонов при помощи гистоновых ацетилтрансфераз является наиболее изученным механизмом, как правило, связанным с активацией генов. Гистоновые деацетилазы, напротив, удаляют ацетильные группы с “хвостов” гистонов, что приводит к конденсации структуры хроматина и тем самым к репрессии транскрипции [18].

Различия в локализации модификаций гистона H3 выявлены у разных каст муравья *Camponotus floridanus* [19]. Наиболее выраженными эти отличия были в отношении лизина 27 гистона H3 (H3K27ac). Большинство генов, в которых выявлены такие различия, вовлечены в регулирование нейрональных процессов, сенсорных реакций и развития мышечных тканей. Показано также, что эпигенетическое регулирование различий между кастами пчел зависит от активности ингибитора гистоновой деацетилазы в маточном молочке [20].

МикроРНК

Важную роль в дифференциации каст играют малые некодирующие РНК (микроРНК). Биоинформатический анализ микроРНК, по-разному экспрессированных у разных каст, показал, что большинство генов, расположенных вблизи этих микроРНК, в соответствии с базой данных проекта “Генная онтология” (Gene Ontology), содержащего унифицированную терминологию для аннотации генов и генных продуктов всех биологических видов, имеют отношение к терминам “ядро”, “физиологический процесс” и “реакция на стресс” [21]. Количество некоторых микроРНК в пищевом субстрате, на котором происходит большая часть развития личинок рабочих пчел (worker jelly), намного (иногда — на порядки) превосходит таковое в маточном молочке. Большинство из этих микроРНК имеют отношение к развитию центральной нервной системы. Уровень их экспрессии в личинках рабочих особей в 2–4 раза выше, чем в личинках королев. Примечательно, что добавление даже небольшого количества определенных микроРНК (в частности, *MIR-184*) к маточному молочку, которым кормят личинок, начавших развиваться по

“королевской онтогенетической траектории”, приводит к развитию пчел с морфологическими признаками рабочих особей.

Экспрессия генов

Модификации гистонов хроматина, а также изменения в метилировании ДНК и синтезе микроРНК приводят к изменениям экспрессии генов, контролирующим различные аспекты жизненного цикла социальных насекомых, включая старение и ПЖ. Большинство генов, проявляющих кастоспецифические характеристики экспрессии на стадии личиночного развития, вовлечены в контроль метаболических путей [23–25]. У личинок королей повышен уровень экспрессии большинства генов, кодирующих метаболические ферменты, что, вероятно, отражает их ускоренный рост на последней стадии личиночного развития [24], а также уровень экспрессии гена *AmIF-2mT*, кодирующего митохондриальный фактор инициации трансляции [23]. У личинок рабочих особей в свою очередь повышен уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты с гидролазной активностью, а в личинках королей — с оксидоредуктазной активностью [25]. У молодых личинок рабочих особей выявлен повышенный уровень экспрессии гексамерных запасных белков, дигидродиолдегидрогеназы, белков теплового шока 70 и 90, нескольких белков, связанных с процессингом РНК и трансляцией, а также одного из ферментов системы цитохрома P-450 [23]. Различия между кастами также обнаружены в отношении уровня экспрессии генов, кодирующих митохондриальные белки, в том числе митохондриально-кодируемого гена субъединицы 1 цитохромоксидазы и ядерно-кодируемого гена цитохрома C [23].

У королей и рабочих пчел на трех ранних стадиях их личиночного развития различаются многие количественные и качественные характеристики митохондриального протеома [26]. В частности, у личинок королей выявлен более высокий уровень экспрессии белков, имеющих отношение к метаболизму углеводов, аминокислот и жирных кислот, а также ферментов, участвующих в фолдинге (укладке) белков.

Важная информация о генетических путях, имеющих отношение к определению каст, получена при исследовании транскриптомов разных каст пчел. Так, Барчук с соавт. продемонстрировали, что у личинок королей и рабочих особей по-разному экспрессированы 240 генов [27]. У личинок королей в сравнении с личинками рабочих пчел был снижен уровень экспрессии некоторых генов, имеющих отношение к регуляции развития, и повышен уровень экспрессии генов, участвующих в регуляции метаболизма и роста организма. Большая часть генов, в отношении которых продемонстрированы различия в уровне экспрессии у представителей разных каст, вовлечена в развитие мозга, конечностей и яичников, а также в формирование компо-

нентов цитоскелета. Еще в одном исследовании общегеномного профиля экспрессии показано, что большинство генов, по-разному экспрессированных в личинках разных каст, связаны с гормональной регуляцией, метаболизмом белков, липидным транспортом, посттрансляционной модификацией белков, процессами передачи энергии и рибосомального биогенеза [10]. В исследовании Чена с соавт. выявлено, что у личинок королей и рабочих пчел по-разному экспрессированы более 4500 генов [28]. На каждой из стадий личиночного развития более 70% дифференциально экспрессированных генов проявляли более высокий уровень экспрессии в личинках королей, чем рабочих пчел, что может свидетельствовать о том, что последним свойственен более низкий уровень транскрипционной активности в ходе раннего развития.

Грозингер с соавт. осуществили общегеномный анализ экспрессии генов в мозге имаго королей и рабочих пчел одинакового возраста (как стерильных, так и особей, у которых при помощи определенных процедур были активированы яичники и индуцирована яйцекладка) [29]. Различия между имаго королей и рабочих пчел выявлены по ~2000 генов, в то время как у стерильных и репродуктивно активных рабочих особей таких генов оказалось всего 221. Примечательно, что среди генов, уровень экспрессии которых был существенно повышен у королей, оказались группы генов, которые, как было продемонстрировано в работах на других модельных организмах, ассоциированы с долгожительством.

Различия между кастами в уровне экспрессии обнаружены в группах генов, предположительно вовлеченных в определение ПЖ пчел, например генов, определяющих реакцию на гипоксический стресс. У личинок рабочих пчел выявлен более высокий уровень транскрипции факторов гипоксического сигнального пути (*HIF α /Sima*, *HIF β /Tango* и *PHD/Fatig*), чем у личинок королей [30]. Показано, что взрослые королевы имеют более высокий уровень экспрессии двух генов, вовлеченных в процессы репарации и предотвращения окислительных повреждений, чем рабочие пчелы сопоставимого возраста, причем у последних активность этих генов проявляет тенденцию к снижению в ходе старения [31].

Различия в характере экспрессии генов между кастами обнаружены и у других видов социальных насекомых, например у земляных шмелей *Bombus terrestris* [32]. Большинство дифференциально экспрессированных генов у личинок королей имели повышенный уровень экспрессии на ранних стадиях личиночного развития, а у личинок рабочих особей — на поздних, что может свидетельствовать о том, что дифференциация каст этого организма зависит не так от качественного состава экспрессированных генов, как от сроков изменений их экспрессии. Различия между кастами в характере экспрессии генов выявлены у некоторых видов муравьев. Показано, что у разных каст *Tem-*

nothorax longispinosus по-разному экспрессированы ~2500 генов [33]. Различия между кастами в уровне экспрессии хемосенсорных генов и генов иммунного ответа выявлены у *Atta vollenweideri* [34]. У *Lasius niger* межкастовые различия в характере экспрессии обнаружены в отношении 16 генов, в том числе генов, имеющих отношение к молекулярным и физиологическим механизмам, определяющим ПЖ [35].

К настоящему времени реализовано только одно исследование [36], полностью посвященное изучению генетических путей, определяющих ПЖ социальных насекомых. В этой работе осуществлена проверка свободнорадикальной теории старения, в соответствии с которой этот процесс является следствием накопления окислительных повреждений. Определен уровень экспрессии восьми генов, кодирующих ключевые ферменты антиоксидантной системы, а также пяти генов, кодирующих белки дыхательных путей в разных тканях пчел. Показано, что уровень экспрессии генов антиоксидантной защиты снижается с возрастом у королев, но не у рабочих особей. Уровень экспрессии исследованных митохондриальных генов оказался повышенным у молодых королев, но быстрее снижался с возрастом в сравнении с рабочими пчелами. Исходя из полученных данных, авторы предположили, что долговечность королев не связана с повышенной мощностью их антиоксидантной системы, а различия в длительности жизни между кастами определяются их метаболическим статусом. Также высказано предположение, что различия между кастами пчел по ПЖ могут зависеть от активности митохондриальных генов и уровня генерации активных форм кислорода.

Подтверждение того, что ПЖ королев не является следствием повышенного уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов, получено и в исследованиях на муравье *Lasius niger*, где показано, что королевские имеют равные или даже сниженные уровни экспрессии гена Cu-Zn супероксиддисмутазы 1 и активности этого фермента по сравнению с таковыми у рабочих муравьев [37].

Роль гормональных факторов в детерминации различий между кастами

Индукцированные пищевыми факторами на стадии личиночного развития изменения экспрессии генов оказывают существенное влияние на эндокринную регуляцию онтогенеза социальных насекомых. Ключевую роль в этих процессах играют сигнальные пути инсулина, инсулиноподобного фактора роста 1 (ИФР-1), TOR (target of rapamycin) и ЮГ.

Роль в детерминации каст ЮГ, который отвечает за смену стадий в цикле развития насекомых, известна на протяжении нескольких десятилетий. Показано, что воздействие определенных пищевых факторов во время личиночной стадии развития

приводит к существенному росту уровня ЮГ у личинок королев [38]. Еще одним гормональным каскадом, играющим ключевую роль в дифференцировке каст, является инсулиновый сигналинг, хотя свидетельства его роли достаточно противоречивы. Уилер с соавт. выделили инсулиноподобный пептид, уровень экспрессии которого выше у личинок королев, чем рабочих пчел [39]. Показано также, что у личинок королев повышен уровень экспрессии гена инсулинового рецептора во время 2-й стадии личиночного роста. В ряде работ, однако, выявлены изменения сигналинга инсулина, противоположные тем, которых следовало бы ожидать, исходя из ускоренного роста личинок королев. Азеев со соавт. показали, что уровень экспрессии гена *AmILP-2*, кодирующего один из инсулиноподобных пептидов, выше у личинок рабочих особей, чем королев, а уровень экспрессии двух генов, кодирующих инсулиновые рецепторы (*AmInR-1* и *AmInR-2*), у личинок королев резко снижается на 4-й стадии личиночного роста [40]. Роль генов, кодирующих инсулиноподобные пептиды *AmILP1* и *AmILP2*, в определении каст была позже подтверждена в работе Ванга с соавт. [41]. Нокдаун гена *AmILP1* при помощи dsRNA (двухцепочечной РНК, подавляющей трансляцию гомологичной мРНК) привел к снижению уровня ЮГ, а гена *AmILP2* — к редукции размера яйчников у личинок пчел. Выявлено также, что нокдаун гена субстрата инсулинового рецептора индуцирует морфологические проявления рабочих пчел [42].

В работе Камакура [43] продемонстрировано, что важным гормональным регулятором онтогенеза пчел, включая их ПЖ, является рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР). Показано, что активизация РЭФР при помощи специфического белка роялактина (royalactin), содержащегося в маточном молочке, приводит к развитию фенотипа королев.

Еще одним гормональным каскадом, лежащим в основе полиморфизма каст, является сигнальный путь TOR, играющий важную роль в обмене веществ и росте организма [44]. Выявлено, что на 3-й стадии личиночного роста королевские пчел имеют более высокий уровень экспрессии гена *TOR*, чем рабочие особи [45]. Показано, что уровень экспрессии гена *TOR* у королев на 3-й личиночной стадии в два раза выше, чем у рабочих особей [44]. Нокдаун гена *TOR* либо ингибирование синтеза его продукта при помощи рапамицина у личинок, начавших развиваться по “королевской” траектории, привели к появлению рабочих особей. Нокдаун при помощи миРНК у личинок королев генов, кодирующих *TOR* и субстрат инсулинового рецептора, привел к возникновению пчел с характеристиками рабочих особей, включая уровни метилирования ДНК, экспрессию генов и протеомные профили [46]. При обоих вариантах нокдауна

применение ЮГ привело к появлению королев, что свидетельствует о том, что ЮГ может обеспечить “королевскую” траекторию развития личинок даже при пониженных уровнях экспрессии *TOR* и субстрата инсулинового рецептора. Вилер с соавт., изучая уровень экспрессии 14 генов инсулинового сигналинга и *TOR*, обнаружили у 40-суточных личинок пчел различия в экспрессии трех генов, имеющих отношение к индукции и передаче гормонального сигнала при изменении характера питания насекомых [47]. Перевод на питательную смесь, необходимую для развития рабочих особей, приводил к увеличению в личинках уровня экспрессии девяти генов, а на пищевой статус королев — только одного гена.

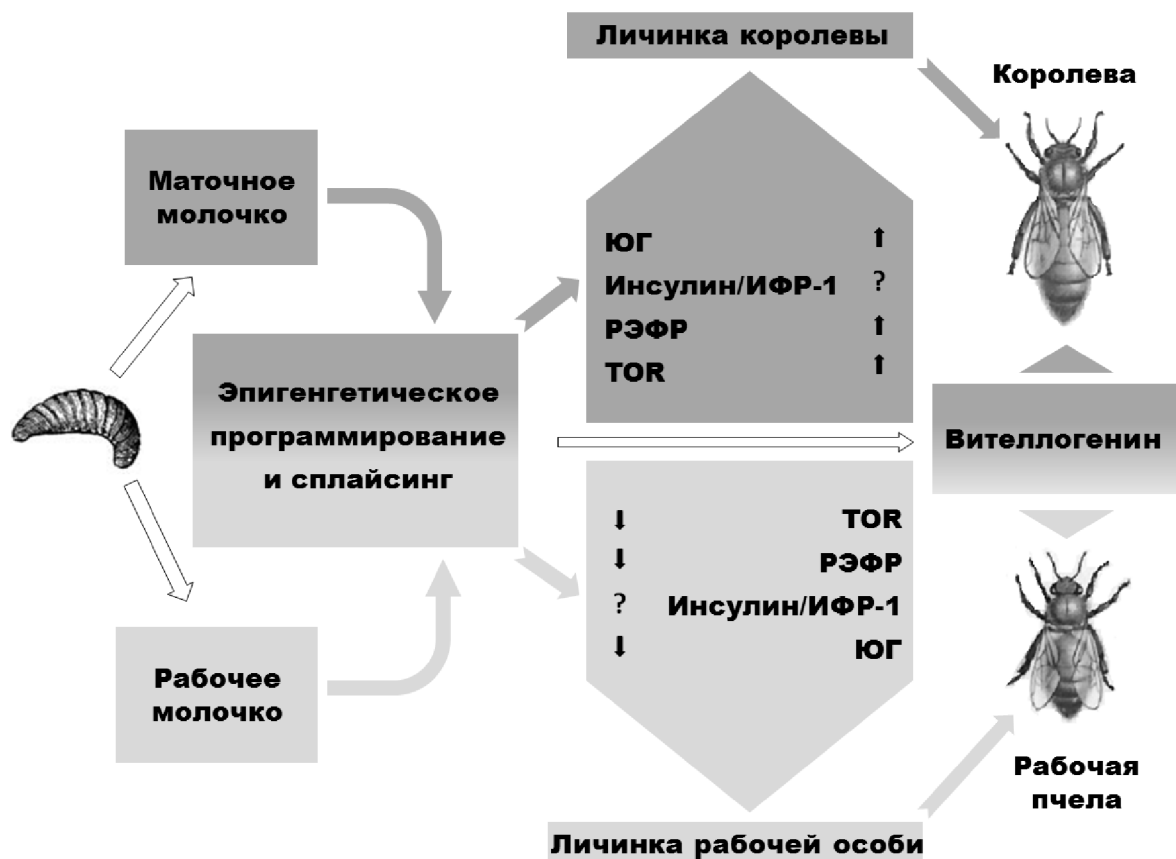
Важную роль в онтогенезе насекомых, включая их старение, играет желточный гликопротеид вителлогенин, эффекты которого связаны с ингибированием ЮГ и модуляцией инсулинового сигналинга. Показано, что вителлогенин проявляет антиоксидантную активность, поскольку активность гена, кодирующего этот белок, защищает рабочих пчел от индуцированного паракватом окислительного стресса [48]. Нокдаун гена вителлогенина при помощи миРНК привел к существенному сокращению ПЖ пчел. У королев пчел на поздних этапах жизни выявлены более высокие уровни экспрессии вителлогенина наряду с более низкими уровнями экспрессии инсулиноподобного пепти-

да и его предполагаемых рецепторов, чем у старых рабочих особей [49].

Гипотетическая схема регуляторных путей, вовлеченных в определение каст у пчел, представлена на рисунке.

Заключение

Социальные насекомые, формирующие на основе идентичных генотипов касты, радикально различающиеся по ПЖ, являются перспективной модельной системой для выявления механизмов, определяющих потенциал долгожительства. Эта сфера исследований представляется особенно перспективной в контексте современных теоретических концепций, в соответствии с которыми старение зависит от условий развития организма и в значительной степени определяется механизмами эпигенетической регуляции онтогенеза. Наибольшие надежды связывают с исследованием общеэпигеномных ассоциаций (epigenome-wide association study, EWAS) и последующим изучением роли отдельных генов-кандидатов при помощи РНК-интерференции. Использование подобных подходов позволит в будущем найти генетические пути, определяющие различия по ПЖ между разными кастами социальных насекомых, и разработать средства направленной коррекции этих путей с целью продления здорового периода жизни и увеличения ПЖ людей.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vaiserman A.M. Early-life nutritional programming of longevity // J. Dev. Orig. Health Dis. 2014. Vol. 5. N 5. P. 325–338.
2. Münch D., Kreibich C.D., Amdam G.V. Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee // J. Exp. Biol. 2013. Vol. 216. N 9. P. 1638–1649.
3. Remolina S.C., Hughes K.A. Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees // Age (Dordr). 2008. Vol. 30. N 2–3. P. 177–185.
4. Winston M.L. The biology of the honey bee. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1991. 294 p.
5. Welch M., Lister R. Epigenomics and the control of fate, form and function in social insects // Curr. Opin. Insect Sci. 2014. Vol. 1. P. 31–38.
6. Weiner S.A., Toth A.L. Epigenetics in social insects: a new direction for understanding the evolution of castes // Genet. Res. Int. 2012. Vol. 2012. ID: 609810.
7. Klose R.J., Bird A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators // Trends Biochem. Sci. 2006. Vol. 31. N 2. P. 89–97.
8. Ванюшин Б.Ф. Эпигенетика сегодня и завтра // Вавиловский журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 805–832.
9. Lyko F., Maleszka R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation // Trends Genet. 2011. Vol. 27. N 4. P. 127–131.
10. Kucharski R., Maleszka J., Foret S., Maleszka R. Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation // Science. 2008. Vol. 319. N 5871. P. 1827–1830.
11. Lyko F., Foret S., Kucharski R., Wolf S., Falckenhayn C., Maleszka R. The honey bee epigenomes: differential methylation of brain DNA in queens and workers // PLoS Biol. 2010. Vol. 8. N 11. e1000506.
12. Foret S., Kucharski R., Pellegrini M., Feng S., Jacobsen S.E., Robinson G.E., Maleszka R. DNA methylation dynamics, metabolic fluxes, gene splicing, and alternative phenotypes in honey bees // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. N 13. P. 4968–4973.
13. Ikeda T., Furukawa S., Nakamura J., Sasaki M., Sasaki T. CpG methylation in the hexamerin 110 gene in the European honeybee, *Apis mellifera* // J. Insect. Sci. 2011. Vol. 11. N 1. P. 74.
14. Shi Y.Y., Huang Z.Y., Zeng Z.J., Wang Z.L., Wu X.B., Yan W.Y. Diet and cell size both affect queen-worker differentiation through DNA methylation in honey bees (*Apis mellifera*, Apidae) // PLoS One. 2011. Vol. 6. N 4. e18808.
15. Shi Y.Y., Yan W.Y., Huang Z.Y., Wang Z.L., Wu X.B., Zeng Z.J. Genomewide analysis indicates that queen larvae have lower methylation levels in the honey bee (*Apis mellifera*) // Naturwissenschaften. 2013. Vol. 100. N 2. P. 193–197.
16. Bonasio R., Li Q., Lian J. et al. Genome-wide and caste-specific DNA methylomes of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator* // Curr. Biol. 2012. Vol. 22. N 19. P. 1755–1764.
17. Bonasio R., Zhang G., Ye C. et al. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator* // Science. 2010. Vol. 329. N 5995. P. 1068–1071.
18. Rothbart S.B., Strahl B.D. Interpreting the language of histone and DNA modifications // Biochim. Biophys. Acta. 2014. Vol. 1839. N 8. P. 627–643.
19. Simola D.F., Ye C., Mutti N.S., Dolezal K., Bonasio R., Liebig J., Reinberg D., Berger S.L. A chromatin link to caste identity in the carpenter ant *Camponotus floridanus* // Genome Res. 2013. Vol. 23. N 3. P. 486–496.
20. Spannhoff A., Kim Y.K., Raynal N.J., Gharibyan V., Su M.B., Zhou Y.Y., Li J., Castellano S., Sbardella G., Issa J.P., Bedford M.T. Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees // EMBO Rep. 2011. Vol. 12. N 3. P. 238–243.
21. Weaver D.B., Anzola J.M., Evans J.D., Reid J.G., Reese J.T., Childs K.L., Zdobnov E.M., Samanta M.P., Miller J., Elisk C.G. Computational and transcriptional evidence for microRNAs in the honey bee genome // Genome Biol. 2007. Vol. 8. N 6. P. 97.
22. Guo X., Su S., Skogerboe G., Dai S., Li W., Li Z., Liu F., Ni R., Guo Y., Chen S., Zhang S., Chen R. Recipe for a busy bee: microRNAs in honey bee caste determination // PLoS One. 2013. Vol. 8. N 12. e81661.
23. Corona M., Estrada E., Zurita M. Differential expression of mitochondrial genes between queens and workers during caste determination in the honeybee *Apis mellifera* // J. Exp. Biol. 1999. Vol. 202. N 8. P. 929–938.
24. Evans J.D., Wheeler D.E. Differential gene expression between developing queens and workers in the honey bee, *Apis mellifera* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. N 10. P. 5575–5580.
25. Cristino A.S., Nunes F.M., Lobo C.H., Bitondi M.M., Simões Z.L., da Fontoura Costa L., Lattorff H.M., Moritz R.F., Evans J.D., Hartfelder K. Caste development and reproduction: a genome-wide analysis of hallmarks of insect eusociality // Insect Mol. Biol. 2006. Vol. 15. N 5. P. 703–714.
26. Begna D., Fang Y., Feng M., Li J. Mitochondrial proteins differential expression during honeybee (*Apis mellifera* L.) queen and worker larvae caste determination // J. Proteome Res. 2011. Vol. 10. N 9. P. 4263–4280.
27. Barchuk A.R., dos Santos Cristino A., Kucharski R., da Fontoura Costa L., Simies Z.L.P., Maleszka R. Molecular determinants of caste differentiation in the highly eusocial honeybee *Apis mellifera* // BMC Dev. Biol. 2007. Vol. 7. N 70.
28. Chen X., Hu Y., Zheng H., Cao L., Niu D., Yu D., Sun Y., Hu S., Hu F. Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker-destined larvae // Insect Biochem. Mol. Biol. 2012. Vol. 42. N 9. P. 665–673.
29. Grozinger C.M., Fan Y., Hoover S.E., Winston M.L. Genome-wide analysis reveals differences in brain gene expression patterns associated with caste and reproductive status in honey bees (*Apis mellifera*) // Mol. Ecol. 2007. Vol. 16. N 22. P. 4837–4848.
30. Azevedo S.V., Caranton O.A., de Oliveira T.L., Hartfelder K. Differential expression of hypoxia pathway genes in honey bee (*Apis mellifera* L.) caste development // J. Insect Physiol. 2011. Vol. 57. N 1. P. 38–45.
31. Aamodt R.M. Age- and caste-dependent decrease in expression of genes maintaining DNA and RNA quality and mitochondrial integrity in the honeybee wing muscle // Exp. Gerontol. 2009. Vol. 44. N 9. P. 586–593.
32. Pereboom J.J., Jordan W.C., Sumner S., Hammond R.L., Bourke A.F. Differential gene expression in queen-worker caste determination in bumble-bees // Proc. Biol. Sci. 2005. Vol. 272. N 1568. P. 1145–1152.
33. Feldmeyer B., Elsner D., Foitzik S. Gene expression patterns associated with caste and reproductive status in ants: worker-specific genes are more derived than queen-specific ones // Mol. Ecol. 2014. Vol. 23. N 1. P. 151–161.

34. Koch S.I., Groh K., Vogel H., Hansson B.S., Kleiendam C.J., Grosse-Wilde E. Caste-specific expression patterns of immune response and chemosensory related genes in the leaf-cutting ant, *Atta vollenweideri* // PLoS One. 2013. Vol. 8. N 11. e81518.
35. Gräff J., Jemielity S., Parker J.D., Parker K.M., Keller L. Differential gene expression between adult queens and workers in the ant *Lasius niger* // Mol. Ecol. 2007. Vol. 16. N 3. P. 675–683.
36. Corona M., Hughes K.A., Weaver D.B., Robinson G.E. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity // Mech. Ageing Dev. 2005. Vol. 126. N 11. P. 1230–1238.
37. Parker J.D., Parker K.M., Sohal B.H., Sohal R.S., Keller L. Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. N 10. P. 3486–3489.
38. Capella I.C., Hartfelder K. Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary // J. Insect Physiol. 1998. Vol. 44. N 5–6. P. 385–391.
39. Wheeler D.E., Buck N., Evans J.D. Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera* // Insect Mol. Biol. 2006. Vol. 15. N 5. P. 597–602.
40. de Azevedo S.V., Hartfelder K. The insulin signaling pathway in honey bee (*Apis mellifera*) caste development — differential expression of insulin-like peptides and insulin receptors in queen and worker larvae // J. Insect Physiol. 2008. Vol. 54. N 6. P. 1064–1071.
41. Wang Y., Azevedo S.V., Hartfelder K., Amdam G.V. Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera* L.) // J. Exp. Biol. 2013. Vol. 216. N 23. P. 4347–4357.
42. Wolschin F., Mutti N.S., Amdam G.V. Insulin receptor substrate influences female caste development in honeybees // Biol. Lett. 2011. Vol. 7. N 1. P. 112–115.
43. Kamakura M. Royalactin induces queen differentiation in honeybees // Nature. 2011. Vol. 473. N 7348. P. 478–483.
44. Patel A., Fondrk M.K., Kaftanoglu O., Emore C., Hunt G., Frederick K., Amdam G.V. The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development // PLoS One. 2007. Vol. 2. N 6. e509.
45. Shao X.L., He S.Y., Zhuang X.Y., Fan Y., Li Y.H., Yao Y.G. mRNA expression and DNA methylation in three key genes involved in caste differentiation in female honeybees (*Apis mellifera*) // Dongwuxue Yanjiu (Zool. Res.). 2014. Vol. 35. N 2. P. 92–98.
46. Mutti N.S., Dolezal A.G., Wolschin F., Mutti J.S., Gill K.S., Amdam G.V. IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate // J. Exp. Biol. 2011. Vol. 214. N 23. P. 3977–3984.
47. Wheeler D.E., Buck N.A., Evans J.D. Expression of insulin/insulin-like signalling and TOR pathway genes in honey bee caste determination // Insect Mol. Biol. 2014. Vol. 23. N 1. P. 113–121.
48. Seehuus S.C., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G.V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. N 4. P. 962–967.
49. Corona M., Velarde R.A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K.A., Robinson G.E. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. N 17. P. 7128–7133.
50. Vaiserman A. Developmental epigenetic programming of caste-specific differences in social insects: an impact on longevity // Curr. Aging Sci. 2014. Vol. 7. N 3. P. 176–186.

Поступила в редакцию
16.04.15

ЕПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ЭНДОКРИННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РАЗЛИЧИЙ В ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ МЕЖДУ КАСТАМИ СОЦИАЛЬНЫХ НАСЕКОМЫХ

А.М. Вайсерман

Social insects are promising model organisms in the study of the mechanisms determining longevity. They have the caste system in which the same genome may produce phenotypes significantly differing in longevity. In honeybee, caste differentiation depends on the duration of supply by specific nutrient mixture (royal jelly) on the larval stage. Longer feeding by the royal jelly leads to the formation of the queen epigenome which differs from the epigenome of worker bee. Such epigenetic differences, in turn, induce endocrine changes manifested in increased synthesis of juvenile hormone and activation of TOR signaling pathway, as well as in the modulation of insulin/IGF-1 pathway in queen-destined larvae. In adults, these processes influence the synthesis of vitellogenin (egg yolk precursor affecting many aspects of insect ontogenesis). Epigenetic and endocrine mechanisms that underlie differences in longevity among social insect castes are discussed.

Key words: social insect castes, developmental programming, DNA methylation, epigenetics, gene expression, longevity.

Сведения об авторе

Вайсерман Александр Михайлович — докт. мед. наук, зав. лабораторией эпигенетики ГУ “Институт геронтологии им. Д.Ф. Чеботарева” НАМН Украины, Киев, Украина. Тел.: +38 (044) 431-05-58; e-mail: vaiserman@geront.kiev.ua

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

**АССОЦИИРОВАННАЯ СО СТАРЕНИЕМ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗА —
БИОМАРКЕР СТАРЕНИЯ, ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК
ИЛИ ОГРАНИЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ПРОЛИФЕРАЦИИ?****Г.В. Моргунова, А.В. Колесников, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов**

(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru)

Наиболее популярным биомаркером клеточного старения (БКС) является активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). В настоящее время именно этот БКС чаще всего используется в исследованиях, основанных на представлении (которое мы не разделяем) о клеточном старении как в первую очередь накоплении в клетках (чаще всего в тех, которым не свойственно репликативное старение) определенных БКС под действием различных внешних факторов, вызывающих повреждение ДНК. Однако данные целого ряда работ свидетельствуют о том, что активность SA- β -Gal — не такой уж хороший БКС, так как она часто зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследования, наличия определенных патологий и, что особенно важно, от пролиферативного статуса изучаемых клеток. Судя по всему, именно ограничение клеточной пролиферации (вследствие дифференцировки, контактного торможения, индукции повреждений ДНК, наличия некоторых заболеваний и др.) само по себе является тем фактором, который стимулирует экспрессию SA- β -Gal. Другими словами, SA- β -Gal появляется даже в “молодых” клетках, размножение которых заторможено. Такие данные, на наш взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности нашей концепции старения, постулирующей решающую роль ограничения клеточной пролиферации в накоплении с возрастом различных макромолекулярных повреждений (в первую очередь повреждений ДНК) в клетках.

Ключевые слова: ассоциированная со старением бета-галактозидаза, биомаркеры старения, цитогеронтология, “стационарное старение”, клеточное старение, повреждения ДНК, ограничение клеточной пролиферации.

В большинстве случаев, говоря о биомаркерах старения (БС), исследователи имеют в виду маркеры не столько старения, сколько биологического возраста. Иначе говоря, речь идет об определенных параметрах, хорошо коррелирующих с хронологическим возрастом организма, но не со старением, представляющим собой увеличение вероятности смерти со временем. Хотя выраженность седины прекрасно коррелирует с возрастом, она практически никак не связана со смертностью. Причина этого понятна — в геронтологии важны параметры, связанные (желательно причинно-следственно) с фундаментальными молекулярно-клеточными механизмами старения. И эти показатели, как правило, увязываются теперь с тем явлением, которое называется клеточным старением (cellular/cell senescence) — основным понятием в цитогеронтологии.

Сам термин “цитогеронтология” был введен в обращение Леонардом Хейфликом [1] для описания исследований старения *in vitro*, выражающегося в “возрастных” изменениях культивируемых нормальных клеток при исчерпании ими митотического потенциала (“феномен Хейфлика”). Позже цитогеронтологией стали называть любые исследования механизмов старения в экспериментах на культивируемых клетках [2–5].

Было сформулировано множество концепций, пытающихся объяснить суть феномена Хейфлика

и связать его со старением *in vivo*. Однако впоследствии все они были отвергнуты в результате открытия теломерного “счетчика” [6], определяющего то, что еще Хейфликом было названо термином “клеточное старение”. Главное, на чем делался упор при обосновании целесообразности исследований механизмов старения на этой модели, это то, что при увеличении количества удвоений клеточной популяции в культивируемых нормальных клетках происходят различные изменения на самых разных уровнях, сходные с таковыми в клетках стареющего организма. Таким образом, и в этом случае речь идет о корреляции — на этот раз о корреляции изменений определенных БС. Несмотря на “коррелятивность” модели Хейфлика, она получила широкое распространение и с ее помощью были получены многочисленные данные, позволившие прояснить многие аспекты функционирования живых организмов. Однако изучение старения *in vitro* практически никак не помогло геронтологам в понимании фундаментальных механизмов старения и долголетия. Более того, как нам кажется, произошедшая в последние годы трансформация термина “клеточное старение” даже нанесла серьезный вред современной экспериментальной геронтологии. Сейчас очень часто под “клеточным старением” в первую очередь понимается накопление/появление в клетках (чаще всего — трансформированных, которым

не свойственно репликативное старение) определенных “БС” (именно так, в кавычках, ибо в данном случае ни о каком реальном старении речь не идет) под влиянием различных внешних факторов, вызывающих повреждение ДНК. Это явление было названо DDR (DNA Damage Response — реакция на повреждения ДНК). “Старение” клеток в рамках данного определения происходит не само по себе, а вследствие воздействия ДНК-повреждающих агентов. Его еще называют “стресс-индуцированным старением” [7]. Такой подход, на наш взгляд, хотя и важен для определения стратегии борьбы с раком, но уже в который раз уводит нас от изучения реальных механизмов старения организма. Сходное мнение было недавно выражено и известным геронтологом Д. Харманом [8].

Необходимо подчеркнуть, что в используемой нами модели “стационарного старения” [9–11] мы тоже фиксируем появление определенных БС в культивируемых клетках, однако в этом случае они возникают из-за ограничения их пролиферации с помощью контактного торможения, т.е. вполне физиологического воздействия, которое само по себе не вызывает никаких повреждений в клетках (ситуация очень похожа на ту, что мы наблюдаем в многоклеточном организме).

Наиболее популярным из упомянутых биомаркеров клеточного старения является активность ассоциированной со старением бета-галактозидазы (бета-галактозидаза pH 6.0; senescence-associated beta-galactosidase, SA- β -Gal). Фермент β -галактозидаза, лизосомная гидролаза, высвобождает концевую бета-галактозу из содержащих ее соединений (лактозы, кератинсульфатов, сфинголипидов и др.). Она является участником некоторых “минорных” метаболических реакций и присутствует практически во всех тканях. Фермент проявляет свою максимальную активность при pH 4.0, но различия по этому показателю между “старыми” и “молодыми” клетками с помощью определенных биохимических методов могут быть лучше всего выявлены при pH 6.0. Целесообразность использования активности SA- β -Gal в качестве БС была впервые постулирована в 1995 г. в работе Димри с соавт. [12], продемонстрировавших, что интенсивность экспрессии этого фермента возрастает при старении как *in vitro*, так и *in vivo*.

В последующие годы данный БС широко использовался в цитогеронтологических экспериментах для оценки “возраста” клеток, а в настоящее время является наиболее распространенным в работах (см., например, [13, 14]), основанных на не устраивающем нас определении клеточного старения. Однако параллельно стали появляться публикации, подчеркивавшие, что активность SA- β -Gal в клетках — не такой уж хороший БС, ибо во многих случаях он зависит не столько от возраста (как *in vivo*, так и *in vitro*), сколько от метода исследова-

ния и/или наличия определенных патологий, а также, что представляется нам наиболее важным, от пролиферативного статуса изучаемых клеток [15–18]. Складывается впечатление, что ограничение пролиферации клеток по той или иной причине (дифференцировка, контактное торможение, DDR, некоторые болезни) и является тем фактором, который вызывает стимуляцию экспрессии SA- β -Gal. Иными словами, даже в “молодых” клетках появляется SA- β -Gal, если им не давать размножаться. Не так давно мы показали [19], что в находящейся в стационарной фазе роста культуре трансформированных клеток китайского хомячка растет со временем доля клеток, в которых методом Димри с соавт. определяется SA- β -Gal. Данные такого рода, на наш взгляд, служат дополнительным доказательством жизнеспособности развиваемой нами концепции старения, постулирующей решающую роль ограничения пролиферации клеток в накоплении в них различных макромолекулярных дефектов (наиболее важные из них — повреждения ДНК), приводящих, в свою очередь, к ухудшению функционирования органов и тканей и дальнейшему увеличению вероятности смерти макроорганизмов [9, 11, 20].

Интересно также заметить, что в соответствующих экспериментах, посвященных сравнению влияния на трансформированные клетки китайского хомячка их “стационарного” или “стресс-индуцированного” (воздействие 4%-м этанолом по 2 ч в день в течение 5 сут) старения, мы обнаружили, что в 14-суточной “стационарно старой” культуре процент клеток, окрашивающихся на SA- β -Gal по методу Димри с соавт., гораздо выше, чем в “молодой” (7-суточной) контрольной культуре, но сопоставим с этим показателем для 7-суточных клеток, подвергнутых влиянию этанола.

Хотелось бы напоследок также упомянуть работу [21], в которой было продемонстрировано, что и при “стресс-индуцированном преждевременном старении”, и при репликативном старении “по Хейфлику” SA- β -Gal не накапливается, если нарушена экспрессия гена *GLB1*, который кодирует лизосомную бета-галактозидазу.

Можно полагать, что остановка старения (если она возможна) не обязательно приведет к изменению возрастной динамики тех БС, которые непосредственно связаны с пролиферативным статусом клеток, образующих органы и ткани организма [9]. По крайней мере, это должно касаться тех БС, которые не вовлечены в механизмы увеличения вероятности смерти с возрастом. Если же какие-то БС являются “сущностными” [5], т.е. без влияния на них нельзя замедлить процесс старения, то постулируемый механизм отмены старения должен позволить объяснить, каким образом такие БС будут постоянно удаляться из постмитотических или очень медленно размножающихся клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayflick L. Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.
2. Хохлов А.Н. Итоги и перспективы цитогеронтологических исследований на современном этапе // Цитология. 2002. Т. 44. № 12. С. 1143–1148.
3. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
4. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytoogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.
5. Khokhlov A.N. Cytoogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
6. Olovnikov A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon // J. Theor. Biol. 1973. Vol. 41. N 1. P. 181–190.
7. Toussaint O., Dumont P., Remacle J., Dierick J.F., Pascal T., Fripiat C., Magalhaes J.P., Zdanov S., Chainiaux F. Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype: one *in vivo* reality, two possible definitions? // The Scientific World JOURNAL. 2002. Vol. 2. P. 230–247.
8. Harman D. About “Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009” // Biogerontology. 2009. Vol. 10. N 6. P. 783.
9. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
10. Vilenchik M.M., Khokhlov A.N., Grinberg K.N. Study of spontaneous DNA lesions and DNA repair in human diploid fibroblasts aged *in vitro* and *in vivo* // Studia biophysica. 1981. Vol. 85. N 1. P. 53–54.
11. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
12. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. N 20. P. 9363–9367.
13. Debacq-Chainiaux F., Pascal T., Boilan E., Bastin C., Bauwens E., Toussaint O. Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts // Free Radic. Biol. Med. 2008. Vol. 44. N 10. P. 1817–1832.
14. Sikora E., Arendt T., Bennett M., Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research // Ageing Res. Rev. 2011. Vol. 10. N 1. P. 146–152.
15. Choi J., Shendrik I., Peacocke M., Peehl D., Buttyan R., Ikeguchi E.F., Katz A.E., Benson M.C. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia // Urology. 2000. Vol. 56. N 1. P. 160–166.
16. Cristofalo V.J. SA beta Gal staining: biomarker or delusion // Exp. Gerontol. 2005. Vol. 40. N 10. P. 836–838.
17. Yegorov Y.E., Akimov S.S., Hass R., Zelenin A.V., Prudovsky I.A. Endogenous beta-galactosidase activity in continuously nonproliferating cells // Exp. Cell Res. 1998. Vol. 243. N 1. P. 207–211.
18. Severino J., Allen R.G., Balin S., Balin A., Cristofalo V.J. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence *in vitro* and *in vivo*? // Exp. Cell Res. 2000. Vol. 257. N 1. P. 162–171.
19. Vladimirova I.V., Shilovsky G.A., Khokhlov A.N., Shram S.I. “Age-related” changes of the poly(ADP-ribosyl)ation system in cultured Chinese hamster cells // Visualizing of senescent cells *in vitro* and *in vivo*. Programme and abstracts (Warsaw, Poland, 15–16 December 2012). Warsaw, Poland, 2012. P. 108–109.
20. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytoogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
21. Lee B.Y., Han J.A., Im J.S., Morrone A., Johung K., Goodwin E.C., Kleijer W.J., DiMaio D., Hwang E.S. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase // Aging Cell. 2006. Vol. 5. N 2. P. 187–195.

Поступила в редакцию
10.06.15

SENESCENCE-ASSOCIATED BETA-GALACTOSIDASE — A BIOMARKER OF AGING, DNA DAMAGE, OR CELL PROLIFERATION RESTRICTION?

G.V. Morgunova, A.V. Kolesnikov, A.A. Klebanov, A.N. Khokhlov

The most popular biomarker of cellular senescence (BCS) is the activity of senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal). Today, this is the prevailing BCS in the studies based on a definition of cell senescence (which we do not accept) understood primarily as accumulation in the cells (most often — not prone to replicative senescence) of certain BCS under the impact of various external factors causing DNA damage. However, some papers provide evidence that SA- β -Gal activity in the cells is not so good a BCS, because it often depends not so much on age (*in vitro* or *in vivo*) as on the method of research, the presence of certain pathologies, and, what is most important, on the proliferative status of the cells studied. It appears that restriction of cell proliferation under certain conditions (due to differentiation, contact inhibition, DNA damage, some diseases, etc.) is itself the factor that stimulates SA- β -Gal expression. In other words, SA- β -Gal appears even in “young” cells if their proliferation is suppressed. Such data, in our opinion, appear to provide additional evidence for the validity of our concept of aging that postulates the leading role of cell proliferation restriction in the age-related accumulation of various macromolecular defects (primarily DNA damage) in the cells.

Key words: senescence-associated beta-galactosidase, biomarkers of aging, cytoogerontology, “stationary phase aging”, cell senescence, DNA damage, cell proliferation restriction.

Сведения об авторах

Моргунова Галина Васильевна — аспирант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Колесников Александр Васильевич — инженер сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: kolesnikov@mail.bio.msu.ru

Клебанов Александр Александрович — науч. сотр. сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: klebanov@mail.bio.msu.ru

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

БИОХИМИЯ

УДК 57.053:577.123:577.218.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ 8-ОКСО-2'-ДЕЗОКСИГУАНОЗИНА

Н.В. Мармий, Д.С. Есипов

(кафедра биоорганической химии; e-mail: marmiynv@gmail.com)

В обзоре приведены имеющиеся на настоящий момент данные о биологической роли 8-оксо-2'-дезоксигуанозина. Это соединение довольно давно и успешно используется в качестве биомаркера окислительного стресса и сопряженных с ним заболеваний. Однако в последние годы появляется все больше публикаций, сообщающих о том, что биологическое значение 8-охо-dG заключается не только в его мутагенной роли, но и в участии в регуляции экспрессии генов, некоторых процессах репарации ДНК, контроле воспалительных и аутоиммунных реакций, запуске антиоксидантных систем. Возможно, существует перспектива применения 8-охо-dG в качестве лекарственного препарата.

Ключевые слова: 8-оксо-2'-дезоксигуанозин, антиоксидант, противовоспалительное действие, регуляция экспрессии генов, репарация, обзор.

8-Оксо-2'-дезоксигуанозин (8-охо-dG) — известный биомаркер окислительных повреждений ДНК, образующийся при взаимодействии 2'-дезоксигуанозина с гидроксил-радикалом. Логично, что появление в молекуле ДНК нового основания 7,8-дигидро-8-оксогуанина (8-охо-Guo) не может не сказаться на происходящих биохимических процессах и далее на жизнедеятельности клетки и даже организма в целом. Тем не менее, биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина на настоящий момент мало изучена. Известные на настоящий момент его эффекты можно подразделить на 3 группы: связанные с мутагенезом и процессами репарации нуклеиновых кислот, с регуляцией экспрессии генов и, наконец, с управлением воспалительными и окислительными процессами. Первые два осуществляются преимущественно 8-охо-dG в составе ДНК, а третий — свободным 8-охо-dG.

1. Мутагенез и репарация

Исторически первым было открыто мутагенное действие 8-охо-dG. В 1987 г. в журнале *Nature* вышла статья, сообщавшая, что при считывании 8-охо-dG фрагментом Кленова в пару ему встраивается аденин вместо цитозина. Это приводит к тому, что в следующих циклах репликации пара G:C замещается парой A:T со всеми вытекающими последствиями для структуры и функции кодируемых РНК и белка [1]. Позже в 2005 г. была показана способность 8-охо-dG участвовать в образовании сшивок ДНК — белок и тем самым блокировать продвижение ферментов репликации, транскрипции и репарации по спирали ДНК [2].

Также есть свидетельства того, что 8-охо-dG может быть виновником образования двунитевых разрывов в теломерах, приводящих к их фрагментации и необратимому укорочению. Интересно, что

в теломерной последовательности под действием УФ-излучения образуется в 5 раз больше 8-охо-dG, чем в нетеломерной, аналогичной по длине и содержащей такое же количество G, но лишенной характерного триплета GGG. Правда, к появлению двунитевого разрыва приводит не непосредственно 8-охо-dG, а деятельность фермента его эксцизионной репарации — OGG-1 [3]. В связи с этим интересен тот факт, что нарушение эксцизионной репарации 8-охо-dG и накопление его в ДНК вызывает резистентность опухолевых клеток к препаратам цисплатину и оксиплатину [4]. Такое же явление наблюдается при некоторых генетических заболеваниях, сопровождаемых наращиванием длины tandemных повторов ДНК. Согласно исследованиям Уолкера и Плама, если 8-охо-dG образуется с двух сторон от сигма-петли (возникающей в участке с tandemными повторами), с очень высокой вероятностью OGG-1 организует там двунитевой разрыв, который может приводить к изменению нуклеотидной последовательности. Как правило, вставляются лишние повторяющиеся триплеты [5]. Показано также, что дефицитный по репарационным ферментам штамм *Pseudomonas aeruginosa* становится устойчивым к антибиотику ципрофлоксацину [6], а окислительный стресс является фактором, способствующим возникновению ципрофлоксацин-устойчивых мутантов *P. aeruginosa*. Таким образом, репарация 8-охо-dG играет важную роль в предотвращении этих мутаций.

Но так ли однозначно и непреложно вредоносное мутагенное действие 8-охо-dG? Полимераза бактерии *Thermus thermophilus* образует исключительно пару 8-охо-dG:dC [7]. Среди полимераз человека только полимеразы α включает напротив 8-охо-dG аденозин в 200 раз чаще, чем цитозин. Полимеразы β и η , наоборот, предпочтительно включают цитозин — в 40 раз чаще, чем аденозин [8].

Отметим, что именно эти полимеразы ответственны за репаративный синтез ДНК. То есть трансверсии при считывании 8-охо-dG вовсе не обязательны. 8-Охо-dG не блокирует репликацию или транскрипцию [8], а вероятность негативных последствий от трансверсии значительно ниже, чем от двухцепочечного разрыва. Учитывая малое количество 8-охо-dG, образующегося в ДНК, частота вызванных им мутаций сравнительно невелика [9]. Так только ли ради удаления одного из побочных продуктов окислительного метаболизма существует отдельная ДНК-гликозилаза? Возможно, 8-охо-dG служит для систем репарации маркером сложно обнаруживаемых иными путями повреждений ДНК. Действительно, в экспериментах *in vitro* показано, что даже при интенсивном окислительном или радиационном воздействии вероятность образования 8-охо-dG в канонической паре G:C двухцепочечной ДНК с полноценной четвертичной структурой ничтожно мала. Она в десятки раз повышается при диссоциации ДНК от гистонов [10], для одноцепочечной ДНК возрастает в 16 раз в сравнении с двухцепочечной, для пары A:G увеличивается в 2,5 раза относительно канонической G:C-пары [11]. Это обусловлено тем, что поврежденная ДНК или неканоническая пара более доступны для окислительной атаки. Так, фермент Mut Y *E. coli*, осуществляющий репарацию ошибочных пар A:G, узнает на самом деле пару 8-охо-dG:dA [12, 13]. Вполне возможно, что по такому же принципу работают и другие подобные ферменты, так как механизм распознавания ошибочных пар оснований до сих пор неизвестен.

Нужно отметить, что дальнейшее окисление 8-охо-dG тоже происходит более интенсивно в одноцепочечных участках и неканонических парах (8-охо-dG:dA) в сравнении с нормальными, а образующиеся при этом спироиногидантоин и гуанидиногидантоин уже способны останавливать движение полимераз и прочих ферментов по двойной спирали и эффективно привлекать комплексы репарации нуклеотидов, а не оснований [14]. Таким образом, можно представить такую цепочку репаративных событий: на поврежденном участке ДНК с высокой вероятностью образуется 8-охо-dG, который распознается специфическим ферментом OGG-1 и удаляется вместе с поврежденным участком. Если же репаративный комплекс задерживается, то 8-охо-dG претерпевает дальнейшее окисление и блокирует транскрипцию и репликацию с поврежденного участка, предотвращая тем самым реализацию “испорченного” генетического материала, а выщепленный из ДНК 8-охо-dG уже в свободном виде участвует в сигнальных процессах клетки.

Также 8-охо-dG может напрямую участвовать в репаративных процессах в цепи ДНК, заменяя флавиновый кофактор при работе фермента фототиазы, осуществляющего репарацию тимидиновых димеров, которые образуются в ДНК под воздействием УФ-излучения. При этом 8-охо-dG должен находиться в непосредственной близости от цикло-

бутанового пиримидинового димера. Возможно, такая роль 8-охо-dG становится важной в условиях облучения, сопряженного с окислительным стрессом, когда флавин не успевает регенерировать, а 8-охо-dG, напротив, появляется в этом положении [15].

2. Регуляция экспрессии генов

Интересно также, что репарация 8-охо-dG может быть способом регуляции экспрессии генов. В 2008 г. Перилло с соавт. расшифровали механизм эстроген-индуцируемой транскрипции, где флавин использует в качестве акцептора электронов кислород, что приводит к генерации его активных форм и их атаке на гуанозин в составе ДНК. При этом образуется 8-охо-dG, для репарации которого задействуется топоизомераза II, которая релаксирует участок хроматина длиной, достаточной не только для работы репаративного комплекса, но и для посадки транскрипционного. Таким образом, запускается транскрипция генов [16]. Показательно, что в данном случае синтез 8-охо-dG производится целенаправленно.

Однако недавно выяснилось, что 8-охо-dG и самим фактом своего образования в спирали ДНК способен запустить экспрессию генов. Показано, что окисление гуанозина в G-квадруплексах в промоторах протоонкогенов *c-kit* и *c-myc* дестабилизирует структуру этих квадруплексов вплоть до преобразования в дуплексную. В норме G-квадруплекс представляет собой стабильную за счет множества водородных связей между остатками гуанина и π - π -электронных взаимодействий между тетрадами структуру из трех тетрад G, сложенных друг на друга. Транскрипция через участок ДНК с подобной структурой затруднительна. Таким образом, появление 8-охо-dG в подобных участках может приводить к активации экспрессии соответствующих генов. Но биологическая роль этой 8-охо-dG-зависимой активации промоторов *c-myc* и *c-kit* пока не ясна, как, впрочем, и функция этих протоонкогенов в здоровой клетке [17].

Сравнительно недавно исследуется влияние 8-охо-dG на метилирование — наиболее изученный путь эпигенетической регуляции. По сообщениям 2013-2014 гг., образование 8-охо-dG в ДНК вызывает стойкое снижение уровня ее метилирования. Это вполне логично, учитывая, что 8-охо-dG во всех исследуемых случаях прямо или косвенно способствует активации экспрессии, а метилирование, даже локальное — ее ингибированию. Что касается механизма этого снижения, то показано прямое ингибирование 8-оксогуанозином MBD2-домена метилазы DNMT1, однако до конца он не исследован [18, 19].

В целом, роль 8-охо-dG в регуляции экспрессии генов крайне мало изучена. Единичные публикации на эту тему пока, к сожалению, не дают представления об общих закономерностях.

3. Антиоксидантное и противовоспалительное действие

Выщеплением 8-охо-dG из ДНК его участие в биохимических процессах не ограничивается. Явление обратной связи, когда конечный продукт цепочки биохимических реакций ингибирует определенные стадии этой цепочки и тем самым свое избыточное образование, распространено в живых организмах повсеместно. Не обошла эта закономерность и 8-охо-dG.

При исследованиях 8-охо-dG в качестве биомаркера окислительных повреждений неоднократно отмечалось, что в первое время действия стрессового фактора содержание 8-охо-dG в ДНК повышается, а затем на определенный период возвращается к нормальным или даже пониженным значениям, несмотря на продолжающееся воздействие оксиданта. В этот период компенсации происходит резкий рост активности целого ряда антиоксидантных и репаративных ферментов [20, 21]. Правда, в большинстве случаев неочевидно, сам ли 8-охо-dG вызывает усиление экспрессии генов этих ферментов, либо это производится иными продуктами окислительных реакций.

Помимо спонтанных процессов генерации свободных радикалов в живых организмах существуют и регулируемые. Логично предположить, что именно на них сигнальная роль 8-охо-dG проявляется в полной мере. И действительно, хотя исследования в этой области начались совсем недавно, уже получены подтверждения этой функции 8-охо-dG. Среди всех известных процессов живого организма самый масштабный окислительный стресс способен вызвать деятельность иммунной системы. В результате множественных “окислительных взрывов” иммунокомпетентных клеток локальная концентрация свободнорадикальных форм кислорода и азота может быть сопоставима с таковой при искусственной обработке клеток перекисью водорода или при радиоактивном облучении. Иммунная система использует такие количества свободных радикалов для направленного уничтожения бактериальных клеток либо собственных, инфицированных вирусом, или мутантных. Однако часто “попутно” страдают нормальные ткани и наблюдается полный спектр воспалительных реакций — некроз, отек, инфильтрация, болевая и температурная реакции. Не так часто, но с более серьезными последствиями, вплоть до летальных, случаются “ошибки” иммунной системы — аллергические, аутоиммунные и септические реакции. А так как все эти процессы сопровождаются активным окислением, в том числе и ДНК, логично было бы предположить, что 8-охо-dG может их регулировать по принципу обратной связи, сигнализируя о значимом повреждении ДНК здоровых клеток и необходимости приостановить иммунную реакцию. То есть от 8-охо-dG можно ожидать противовоспалительного и антиаллергического действия, а также

облегчения состояния пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Исследования 2006–2014 гг. оправдали эти ожидания.

Была показана способность экзогенного 8-охо-dG ингибировать производство активных форм кислорода и воспалительных цитокинов макрофагами и нейтрофилами. Точный механизм этого воздействия пока не известен, но выявлено снижение активности НАДФН-оксидазы, ингибирование RAS-связанных функций, ограничение фосфорилирования киназы STAT-1, подавление транскрипции циклооксигеназы-2, интерлейкинов 1 и 6, фактора адгезии макрофагов [22–25]. Противовоспалительное действие 8-охо-dG показано на моделях атеросклероза и язвенной болезни желудка [26].

8-Охо-dG успешно подавлял симптомы аутоиммунных заболеваний, таких как энцефаломиелит и диабет второго типа. После его введения у мышей с аутоиммунным энцефаломиелитом наблюдалось уменьшение количества тучных клеток, локализованных в нервной ткани, и снижение экспрессии ряда факторов адгезии, цитокинов и белков активации в них [27]. А при диабете второго типа применение 8-охо-dG приводило к снижению показателей гипергликемии и жировой дистрофии печени [28]. Противоаллергическое действие 8-охо-dG наблюдалось у мышей с аллергией на овальбумин. Получение с питьем этого вещества подавляло гиперреактивность дыхательных путей и уменьшало симптомы аллергической бронхиальной астмы [27, 28]. Наконец, высокие дозы 8-охо-dG (60 мг/кг) предотвращали септическую смерть мышей при введении бактериальных липополисахаридов. При этом помимо вышеописанных механизмов также блокировался ЛПС-индуцированный синтез окиси азота [31].

Противовоспалительное действие 8-охо-dG только начинает исследоваться. Концентрации, в которых 8-охо-dG проявляет выраженный эффект, значительно выше тех, в которых он обнаруживается в клетке. До получения единой и непротиворечивой картины роли 8-охо-dG в воспалительных и аутоиммунных процессах еще далеко. Биохимическое образование свободнорадикальных форм кислорода не ограничивается иммунными реакциями. Их генерация происходит также в ходе работы митохондрий, реакций микросомального окисления и деградации ксенобиотиков, а также деятельности металлопротеинов, использующих в качестве кофактора металлы переменной валентности. Ингибирование митохондриального дыхания, конечно, вряд ли возможно, а вот регуляция остальных процессов по принципу обратной связи вполне оправдана. И действительно, на культуре эпителиальных клеток бесшерстных мышей показано ингибирование 8-охо-dG ряда матричных металлопротеиназ. Вместе с ними ингибированию подлежат ряд киназ группы MAPK (mitogen-activated protein kinase), а также наблюдается снижение концентрации активных форм кислорода в сравнении

с контрольными клетками. А при наружном использовании 8-охо-dG на бесшерстных мышах предотвращается УФ-индуцированная реакция кожи [32].

Таким образом, по данным проведенных на сегодняшний день исследований очевидно, что 8-охо-dG играет значимую роль в регуляции воспалительных и окислительных процессов организма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuchino Y., Mori F., Kasai H., Inoue H., Iwai S., Miura K., Ohtsuka E., Nishimura S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues // *Nature*. 1987. Vol. 327. N 6117. P. 77–79.
2. Johansen M.E., Muller J.G., Xu X., Burrows C.J. Oxidatively induced DNA-protein cross-linking between single-stranded binding protein and oligodeoxynucleotides containing 8-охо-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44. N 15. P. 5660–5671.
3. Kawanishi S., Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. Vol. 1019. P. 278–284.
4. Preston T.J., Henderson J.T., McCallum G.P., Wells P.G. Base excision repair of reactive oxygen species-initiated 7,8-dihydro-8-охо-2'-deoxyguanosine inhibits the cytotoxicity of platinum anticancer drugs // *Mol. Cancer. Ther.* 2009. Vol. 8. N 7. P. 2015–2026.
5. Völker J., Plum G.E., Klump H.H., Breslauer K.J. Energetic coupling between clustered lesions modulated by intervening triplet repeat bulge loops: allosteric implications for DNA repair and triplet repeat expansion // *Biopolymers*. 2010. Vol. 93. N 4. P. 355–369.
6. Morero N.R., Argaraña C.E. Pseudomonas aeruginosa deficient in 8-oxodeoxyguanine repair system shows a high frequency of resistance to ciprofloxacin // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. Vol. 290. N 2. P. 217–226.
7. Garrido P., Mejia E., Garcia-Diaz M., Blanco L., Picher A.J. The active site of TthPolX is adapted to prevent 8-охо-dGTP misincorporation // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 1. P. 534–543.
8. Delaney S., Jarem D.A., Volle C.B., Yennie C.J. Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA // *Free Radic. Res.* 2012. Vol. 46. N 4. P. 420–441.
9. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin // *Mutat. Res.* 1992. Vol. 275. N 3–6. P. 331–342.
10. Svoboda P., Harms-Ringdahl M. Influence of chromatin structure and radical scavengers on yields of radiation-induced 8-охо-dG and DNA strand breaks in cellular model systems // *Radiat. Res.* 2005. Vol. 164. N 3. P. 303–311.
11. Fleming A.M., Muller J.G., Dlouhy A.C., Burrows C.J. Structural context effects in the oxidation of 8-охо-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine to hydantoin products: electrostatics, base stacking, and base pairing // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134. N 36. P. 15091–15102.
12. Michaels M.L., Cruz C., Grollman A.P., Miller J.H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. N 15. P. 7022–7025.
13. Michaels M.L., Tchou J., Grollman A.P., Miller J.H. A repair system for 8-охо-7,8-dihydrodeoxyguanine // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31. N 45. P. 10964–10968.
14. Livingston A.L., O'Shea V.L., Kim T., Kool E.T., David S.S. Unnatural substrates reveal the importance of 8-oxoguanine for in vivo mismatch repair by MutY // *Nat. Chem. Biol.* 2008. Vol. 4. N 1. P. 51–58.
15. Nguyen K.V., Burrows C.J. A prebiotic role for 8-охо-guanosine as a flavin mimic in pyrimidine dimer photorepair // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Vol. 133. P. 14586–14589.
16. Perillo B., Ombra M.N., Bertoni A., Cuozzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E.V. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression // *Science*. 2008. Vol. 319. N 5860. P. 202–206.
17. Stebbins W.J., Lunec J., Larcombe L.D. An in silico study of the differential effect of oxidation on two biologically relevant G-quadruplexes: possible implications in oncogene expression // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 8. e43735.
18. Ma H., Zheng L., Li Y., Pan S., Hu J., Yu Z., Zhang G., Sheng G., Fu J. Triclosan reduces the levels of global DNA methylation in HepG2 cells // *Chemosphere*. 2013. Vol. 90. N 3. P. 1023–1029.
19. Bagan J., Sáez G.T., Tormos M.C., Gavalda-Esteve C., Bagan L., Leopoldo-Rodado M., Calvo J., Camps C. Oxidative stress in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws // *J. Oral. Pathol. Med.* 2014. Vol. 43. N 5. P. 371–377.
20. Burlaka A., Tsybulin O., Sidorik E., Lukin S., Polishuk V., Tsehmistrenko S., Yakymenko I. Overproduction of free radical species in embryonal cells exposed to low intensity radiofrequency radiation // *Exp. Oncol.* 2013. Vol. 35. N 3. P. 219–225.
21. Unnikrishnan A., Prychitko T.M., Patel H.V., Chowdhury M.E., Pilling A.B., Ventrella-Lucente L.F., Papakostantinou E.V., Cabelof D.C., Heydari A.R. Folate deficiency regulates expression of DNA polymerase β in response to oxidative stress // *Free Radic. Biol. Med.* 2011. Vol. 50. N 2. P. 270–280.
22. Kim H.S., Ye S.K., Cho I.H., Jung J.E., Kim D.H., Choi S., Kim Y.S., Park C.G., Kim T.Y., Lee J.W., Chung M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine suppresses NO production and COX-2 activity via Rac1/STATs signaling in LPS-induced brain microglia // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. Vol. 41. N 9. P. 1392–1403.
23. Huh J.Y., Son D.J., Lee Y., Lee J., Kim B., Lee H.M., Jo H., Choi S., Ha H., Chung M.H. 8-Hydroxy-2-deoxyguanosine prevents plaque formation and inhibits vascular smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation // *Free Radic. Biol. Med.* 2012. Vol. 53. N 1. P. 109–121.
24. Kim D.Y., Hong G.U., Ro J.Y. Signal pathways in astrocytes activated by cross-talk between of astrocytes and mast cells through CD40-CD40L // *J. Neuroinflammation*. 2011. Vol. 8. N 25. P. 1–16.
25. Kim D.H., Cho I.H., Kim H.S., Jung J.E., Kim J.E., Lee K.H., Park T., Yang Y.M., Seong S.Y., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression // *Exp. Mol. Med.* 2006. Vol. 38. N 4. P. 417–427.

26. Ock C.Y., Kim E.H., Choi D.J., Lee H.J., Hahm K.B., Chung M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases // *World J. Gastroenterol.* 2012. Vol. 18. N 4. P. 302–308.
27. Hong G.U., Kim N.G., Jeoung D., Ro J.Y. Anti-CD40 Ab- or 8-oxo-dG-enhanced Treg cells reduce development of experimental autoimmune encephalomyelitis via down-regulating migration and activation of mast cells // *J. Neuroimmunol.* 2013. Vol. 260. N 1. P. 60–73.
28. Ko S.H., Lee J.K., Lee H.J., Ye S.K., Kim H.S., Chung M.H. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates features of metabolic syndrome in obese mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. Vol. 443. N 2. P. 610–616.
29. Kim J.S., Kim D.Y., Lee J.K., Ro J.Y., Chung M.H. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine suppresses allergy-induced lung tissue remodeling in mice // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 651. N 1–3. P. 218–226.
30. Hong G.U., Kim N.G., Ro J.Y. Expression of airway remodeling proteins in mast cell activated by TGF- β released in OVA-induced allergic responses and their inhibition by low-dose irradiation or 8-oxo-dG // *Radiat. Res.* 2014. Vol. 181. N 4. P. 425–438.
31. Choi S., Choi H.H., Lee S.H., Ko S.H., You H.J., Ye S.K., Chung M.H. Anti-inflammatory effects of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine on lipopolysaccharide-induced inflammation via Rac suppression in Balb/c mice // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. Vol. 43. N 12. P. 1594–1603.
32. Lee J.K., Ko S.H., Ye S.K., Chung M.H. 8-Oxo-2'-deoxyguanosine ameliorates UVB-induced skin damage in hairless mice by scavenging reactive oxygen species and inhibiting MMP expression // *J. Dermatol. Sci.* 2013. Vol. 70. N 1. P. 49–57.

Поступила в редакцию
06.02.15

BIOLOGICAL ROLE OF 8-OXO-2'-DEOXYGUANOSINE

N.V. Marmiy, D.S. Esipov

The review presents currently available data on the biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. This compound has been successfully and for a long time used as a biomarker of oxidative stress and diseases associated with it. However, in recent years an increasing number of publications has appeared reporting that 8-oxo-dG is not simply a byproduct of oxidation processes, but is of great biological importance. It is assumed that it is involved in the regulation of gene expression, in some processes of DNA repair, in the control of inflammatory and autoimmune reactions, and in the activation of antioxidant systems. Probably there is a prospect of applying 8-oxo-2'-deoxyguanosine as a drug.

Key words: *8-oxo-2'-deoxyguanosine, antioxidant, anti-inflammatory action, regulation of gene expression, DNA repair, review.*

Сведения об авторах

Мармий Наталья Владимировна — аспирант кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-28; e-mail: marmiynv@gmail.com

Есипов Дмитрий Станиславович — канд. хим. наук, доцент кафедры биоорганической химии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-35-28; e-mail: desipov@gmail.com

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.323

ИССЛЕДОВАНИЕ ИОННОГО ОКРУЖЕНИЯ И ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК НУКЛЕОСОМ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан

(кафедра биоинженерии; e-mail: alex@molsim.org)

Работа посвящена изучению принципов устройства и формирования нуклеосом с помощью молекулярного моделирования. Формирование белками, гистонами и участками молекулы ДНК компактных образований — нуклеосом способствует не только упаковке молекулы ДНК в ядре клетки, но и играет важную роль в регуляции процессов транскрипции и экспрессии генов. Сборка и работа нуклеосом сильно зависят от ионного окружения и электрических характеристик среды. В работе исследуются карты распределения одновалентных ионов в системе, выявляются места их предпочтительного нахождения. Предлагается метод, позволяющий вычислять распределения физических величин в объеме расчетной ячейки вокруг дрейфующей макромолекулы. Рассматривается распределение электростатического потенциала вокруг нуклеосомы.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, молекулярная динамика, эпигенетика.

В ядрах эукариотических организмов содержатся крупные макромолекулы — ДНК, каждая такая молекула хранит в себе значительное количество генетической информации, закодированной в последовательности нуклеотидов. Хранение и реализация генетической информации — непростая задача, с которой эукариотическая клетка успешно справляется, несмотря на малые размеры ядра. Компактизация ДНК начинается на уровне нуклеосом — октамеров белков, которые несут на себе 147 нуклеотидных пар двухцепочечной спирали ДНК. На данный момент получено более 80 различных кристаллических структур нуклеосом [1, 2]. Гистонный состав нуклеосом непостоянен, например, в активно транскрибируемых генах происходит непрерывный обмен димерами гистонов H2A-H2B [3, 4]. Для дальнейшей компактизации хроматина к нуклеосомам присоединяется гистон H1.

Нуклеосомы не способны к спонтанной сборке при физиологической ионной силе, отчасти это происходит из-за того, что при такой концентрации соли гистоны неспецифически взаимодействуют с ДНК. Тем не менее искусственная сборка нуклеосом возможна, существуют протоколы для сборки нуклеосом *in vitro* как при помощи вспомогательных шаперонов [5], так и путем диализа — медленного изменения ионной силы. Благодаря тому что при высоких концентрациях соли тетрамер гистонов H3-H4 способен связываться с ДНК, а димеры 2 М раствора NaCl против 0,25 М раствора соли.

Отдельные компоненты нуклеосом способны к существованию в растворах с ДНК, например, димер H2A-H2B стабилен в 200 мМ растворе KCl, обработка димера гуанидинхлоридом приводит к одностадийной денатурации до бесструктурных цепей, с энергией перехода 17 ккал/моль [6]. При

этом гистоны H3-H4 в 200 мМ KCl представлены смесью тетрамера, димеров и иных частично денатурированных комплексов. Увеличение ионной силы до 1,5 М KCl, как и обработка ТМАО (триметиламинооксидом), сдвигает равновесие в сторону тетрамерной формы.

Известно, что двухвалентные катионы способствуют компактизации хроматина. В кристаллической структуре были определены места связывания ионов марганца. Марганец, ассоциированный с гистонами, находится на поверхности между нуклеосомами, организуя их взаимодействия в кристалле, 13 остальных ионов марганца скоординированы в большей бороздке ДНК, преимущественно в районе GG и GC динуклеотидов [7], вероятно, экранируя заряды ДНК на соседних нуклеосомах, что позволяет повысить плотность упаковки кристалла. Таким образом, очевидно, что ионное окружение играет важную роль в сборке и функционировании нуклеосом.

Изучение распределения ионов и электростатического потенциала представляет немалый интерес в силу того, что нуклеосома содержит в себе большое количество заряженных группировок, большинство положительных зарядов находится на поверхности гистонов, в то время как отрицательные заряды преимущественно представлены фосфатными группировками сахарофосфатного остова ДНК. Зарядовые взаимодействия между аминокислотами, ДНК, растворителем и ионами играют важную роль в стабилизации структуры нуклеосомы. Однако изучение таких взаимодействий биохимическими методами сильно затруднено. Молекулярное моделирование позволяет рассматривать крупные макромолекулы на атомарном уровне, уточняя и расширяя информацию, полученную методами структурной биологии.

Материалы и методы

Для исследования нуклеосом использовался метод молекулярной динамики в силовом поле AMBER99SB-ILDN [8]. Модель была создана на основании кристаллической структуры, взятой из банка RCSB PDB с индексом 1KX5 [1]. От нуклеосом были удалены гистоновые хвосты, молекула была погружена в прямоугольную расчетную ячейку. Затем в ячейку были добавлены вода и ионы до концентрации 150 мМ. Для описания динамики молекулярной воды применялась модель TIP3P. Ионы Mn^{2+} , содержащиеся в кристаллической структуре, были заменены на ионы Mg^{2+} , ионы Cl^- были оставлены в наблюдаемом в кристалле положении. После добавления воды и ионов общее количество атомов в системе составило 210024. Были произведены минимизация энергии и последующее моделирование в каноническом и изотермо-изобарическом ансамблях. Расчет траектории молекулярной динамики системы продолжался в течение 500 нс. Вычисления производились в программе Gromacs 4.5.4 [9] на суперкомпьютере МГУ “Ломоносов” с использованием от 64 до 1024 процессоров. Обработка траекторий производилась при помощи встроенных в пакет Gromacs утилит. Для визуализации траекторий и моделей применялась программа VMD 1.9.1 [10].

Для расчета карт распределения электростатического потенциала использовался модуль PMEROT [11] программы VMD. Модуль PMEROT способен рассчитывать усредненную по траектории МД карту распределения электростатического потенциала, но наибольший интерес представляет собой не усредненное по времени распределение потенциала в ячейке, а распределение потенциала вокруг исследуемого биополимера, который может перемещаться по ячейке, что приведет к смазыванию карты потенциала. Чтобы получить такое распределение, был создан модуль на языке python для программы VMD. Модуль позволяет выравнивать карты электростатического потенциала на каждом этапе расчета, для того чтобы избежать размытия карты за счет дрейфа молекулы в расчетной ячейке. Для ускорения работы реализована возможность параллельного вычисления карт на многопроцессорных системах.

Результаты и обсуждение

Моделирование масштабных систем методом молекулярной динамики предъявляет очень высокие требования к вычислительным ресурсам. С ростом размера систем появляется необходимость в использовании высокопараллельных расчетов. Тем не менее с ростом числа используемых вычислительных узлов скорость расчета растет нелинейно, основной причиной этого являются ограничения

по времени отклика и пропускной способности интерфейсов передачи данных между узлами. Следует понимать, что с увеличением числа используемых узлов растет вероятность аппаратных отказов, такой сбой неизбежно приводит к потере части данных и остановке счета. Таким образом, расчет крупных биологических систем — крайне ресурсоемкая задача.

В результате анализа 500 нс траектории системы было показано, что ионы распределены по нуклеосоме неравномерно: для натрия характерно преимущественное расположение вокруг ДНК, небольшое число ионов натрия обнаружено на поверхности гистонов и в межгистонных контактах. Ионы хлора не проникают между гистонами, но чаще катионов натрия заходят в нуклеосомную пору. Высокая концентрация ионов хлора в нуклеосомной поре объясняется наличием на поверхности гистонов большого количества положительно заряженных аминокислот.

Катионы натрия обнаружены преимущественно в малой бороздке ДНК, что объясняется их взаимодействием с фосфатными группировками. Аналогичные результаты были показаны в работе [12], такой характер распределения связан с комбинацией различных видов взаимодействий, в частности малый размер иона позволяет ему глубже проникать в бороздку ДНК и взаимодействовать с фосфатными группировками.

Повышенная концентрация ионов обнаружена вблизи димера H2A-H2B, над участком, называемым “кислотный лоскут” (“acidic patch”). В литературе предполагается, что этот участок является сайтом связывания для хвостов гистона H4 соседней нуклеосомы при формировании супрануклеосомных структур.

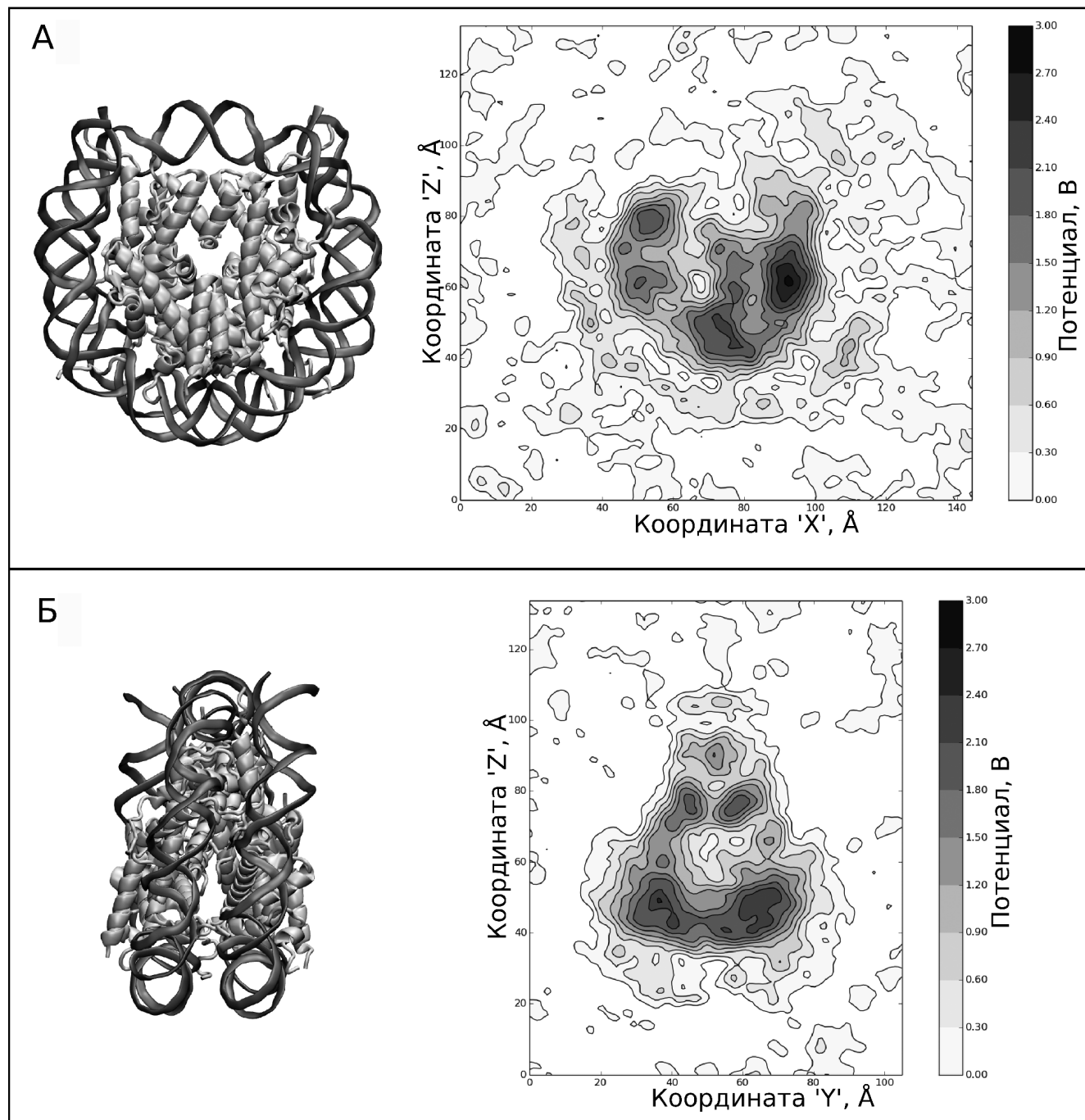
Расположение ионов натрия вблизи нуклеосомальной ДНК позволяет эффективно экранировать заряженные фосфатные группировки. В среднем вокруг ДНК находится 18–22 иона натрия на каждые 10 н.п. Такого рода экранирование позволяет снизить взаимодействия между соседними нуклеосомами, а также в местах примыкания соседних витков суперспирали ДНК. Уменьшение силы взаимодействий между витками ДНК может способствовать компактизации хроматина, так как нуклеосомы будут способны ближе подходить друг к другу.

Дополнение PMEROT [11] к программе VMD создано для того, чтобы рассчитывать карту распределения электростатического потенциала. Несмотря на то что алгоритм работы дополнения способен усреднять значения электростатического потенциала по времени, отсутствие возможности производить усреднение с выравниванием карты по изучаемой структуре приводит к значительному размытию карты и искажению теоретической кар-

ты распределения потенциала. Оригинальный метод, реализованный в данной работе, позволяет усреднять электростатический потенциал, используя при этом модуль РМЕРОТ. Полученные данным методом карты лишены артефактов, связанных со смазыванием значений потенциала из-за диффузии моделируемой молекулы в ячейке, и несут больше информации для исследователя.

В результате анализа показано, что электростатический потенциал вокруг нуклеосомы распределен относительно равномерно (на рисунке изображены сечения распределения потенциала)

и практически везде в растворителе равен нулю (несмотря на большое число отрицательных зарядов на ДНК), это свидетельствует о хорошей нейтрализации зарядов на нуклеосоме. Данное наблюдение согласуется с результатами работы [12], где отмечалось, что ДНК в нуклеосоме нейтрализована лучше, чем свободная. Нуклеосомная пора (на рисунке находится в геометрических центрах карт распределения потенциала) содержит в себе область со значениями потенциала, близкими к наружному. Потенциал снаружи от нуклеосомы наведен большим числом отрицательных зарядов на



Слева в виде элементов вторичной структуры показан внешний вид модели нуклеосомы, справа — соответствующее виду сечение карты распределения электростатического потенциала. А — вид спереди; Б — вид сбоку. Сечения построены по центру расчетной ячейки. Интенсивность окраски карты соответствует значению электростатического потенциала

ДНК, катионов и анионов, при этом между нуклеосомной порой и ДНК присутствуют лишь гистоны с относительно небольшим числом молекул воды и ионов. Значение потенциала в нуклеосомной поре указывает на то, что заряды на ДНК эффективно экранированы гистонами и ионами натрия на границе взаимодействия гистон–ДНК. Экранирование зарядов ДНК позволяет ее участкам, находящимся с противоположных сторон, не испытывать взаимодействий, которые будут стремиться раздвинуть петли ДНК, что может привести к разрушению нуклеосомы.

Для гистонов в целом показаны повышенные значения потенциала за исключением С-концевой α -спирали H2В и участка H2А, формирующих область контакта с хвостами гистонов соседних нуклеосом. Повышенные значения потенциала наблюдаются в областях контактов гистонов с ДНК, что объясняется высоким содержанием положительно заряженных аминокислотных остатков.

Электростатический потенциал между соседними участками ДНК, лежащими около входа в нуклеосому, сильно занижен, это свидетельствует о том, что заряды на ДНК не полностью экранированы ионами. Этот факт объясняет методику приготовления нуклеосом путем диализа из высокой ионной силы. Высокая концентрация соли позволяет экранировать цепи ДНК друг от друга большим числом ионов натрия, тем самым разрешая сборку нуклеосомы. Недостаточное экрани-

рование и отталкивание цепей ДНК друг от друга поясняет эксперименты по силовому растягиванию нуклеосом, где было показано, что для снятия первого витка ДНК нужна меньшая сила, чем для снятия последующих участков.

В заключение работы можно сделать следующие выводы: распределение электростатического потенциала в нуклеосоме имеет существенные положительные значения в области гистонового ядра, а в области расположения ДНК значения потенциала близки к значениям в области растворителя, что свидетельствует об эффективном экранировании зарядов фосфатного остова ДНК противоионами и водой. Величина электростатического потенциала в нуклеосомной поре соответствует величине потенциала в растворителе, окружающем нуклеосому. Данный факт свидетельствует о том, что несмотря на относительно малый размер нуклеосомной поры, центр нуклеосомы является областью с высокой диэлектрической проницаемостью и данный факт необходимо учитывать при построении огрубленных физических моделей организации хроматина.

Все вычисления произведены с использованием суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [13].

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 angstrom resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
2. Vasudevan D., Chua E.Y.D., Davey C.A. Crystal structures of nucleosome core particles containing the '601' strong positioning sequence // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 403. N 1. P. 1–10.
3. Thiriet C., Hayes J.J. Replication-independent core histone dynamics at transcriptionally active loci in vivo // *Gene Dev.* 2005. Vol. 19. N 6. P. 677–682.
4. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // *Cell.* 1995. Vol. 83. N 1. P. 19–27.
5. Andrews A.J., Luger K. A coupled equilibrium approach to study nucleosome thermodynamics // *Methods Enzymol.* 2011. Vol. 488. P. 265–85.
6. Banks D.D., Gloss L.M. Equilibrium folding of the core histones: The h3-h4 tetramer is less stable than the h2a-h2b dimer // *Biochemistry.* 2003. Vol. 42. N 22. P. 6827–39.
7. Davey C.A., Richmond T.J. DNA-dependent divalent cation binding in the nucleosome core particle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. N 17. P. 11169–11174.
8. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. Improved side-chain torsion potentials for the amber ff99sb protein force field // *Proteins.* 2010. Vol. 78. N 8. P. 1950–1958.
9. Pronk S., Pall S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. Gromacs 4.5: A high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics.* 2013. Vol. 29. N 7. P. 845–854.
10. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. Vmd: Visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph. Model.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38.
11. Aksimentiev A., Schulten K. Imaging alpha-hemolysin with molecular dynamics: Ionic conductance, osmotic permeability, and the electrostatic potential map // *Biophys. J.* 2005. Vol. 88. N. 6. P. 3745–3761.
12. Savelyev A., Papoian G.A. Electrostatic, steric, and hydration interactions favor Na(+) condensation around DNA compared with K(+) // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128. N 45. P. 14506–14518.
13. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. "Lomonosov": Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary high performance computing: from petascale toward exascale* / Ed. by S.V. Jeffery. Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию
16.04.15

DISTRIBUTION OF IONS AND ELECTROSTATIC POTENTIAL IN NUCLEOSOMES AS STUDIED WITH MOLECULAR DYNAMICS

G.A. Armeev, K.V. Shaitan, A.K. Shaytan

The principles of nucleosome organization and formation were studied using molecular modeling approach. Nucleosomes are compact protein–DNA complexes that plays the key role in DNA compactization and regulation of gene transcription and expression. Nucleosome assembly and operation strongly depends on the ionic environment and electrical characteristics of the medium. The distribution of monovalent ions in the system was determined. The preferred locations of the ions were identified. The distribution of electrostatic potential around nucleosome was investigated using a new method for averaging the distribution around macromolecule drifting in the volume of the computational cell.

Key words: *nucleosomes, chromatin, molecular dynamics, epigenetics.*

Сведения об авторах

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: armeev@molsim.org

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alex@molsim.org

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.2

НОВЫЙ ТИП ПЛАТФОРМ ДЛЯ СБОРКИ ВАКЦИН *IN VITRO*И.Г. Атабеков^{1,2}, Н.А. Никитин², О.В. Карпова²⁽¹⁾ Центр “Биоинженерия” РАН, г. Москва; ⁽²⁾ кафедра вирусологии; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru)

Изучение структуры вирионов фитовирусов и вирусных белков оболочки, а также возможностей их модификации и структурной перестройки крайне важно для разработки абсолютно новых подходов для создания биотехнологической продукции, в том числе медицинского назначения. Вирусы растений обладают безусловным преимуществом при получении новых функциональных и биологически активных материалов, в частности кандидатных вакцин, так как они не патогенны для млекопитающих, в том числе для человека. В настоящем обзоре основное внимание сосредоточено на характеристике и применении в биотехнологии сферических частиц (СЧ) — платформ нового типа, полученных в результате структурной перестройки вирусов растений. СЧ не имеют структурных аналогов среди икосаэдрических вирусов и представляют собой новый тип биогенных платформ. Сборка иммуногенных комплексов СЧ-антиген *in vitro* открывает перспективы недорогого и быстрого получения разнообразных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: спиральные вирусы, сферические частицы, платформы, комплексы с целевыми антигенами, иммуногенность, адъювантные свойства, обзор.

Вирусы растений в качестве инструментов биотехнологий

Вирусы растений, состоящие из идентичных субъединиц белка оболочки (БО) и РНК, могут применяться в качестве строительных блоков-матриц для создания различных бионеорганических материалов: нанотрубок, нанопроводников, нанoeлектронов, наноконтейнеров, для инкапсуляции неорганических соединений и получения неорганических нанокристаллов [1]. В силу своей химической и биологической полифункциональности вирусные частицы могут быть модифицированы с сохранением их структуры как химически, так и методами генной инженерии. Вирусы растений абсолютно безопасны для человека и сельскохозяйственных животных, так как растения и животные не содержат общих патогенов [2].

Полногеномные вирионы вирусов растений могут использоваться в качестве платформ для присоединения к их поверхности чужеродных антигенных детерминант. По данным Акоста-Ранирез с соавт. [3], вирус мозаики папайи (ВМП) в смеси с антигеном *Salmonella typhi* способен стимулировать иммунный ответ на целевой антиген. Аналогичные результаты могут быть получены с применением вирусоподобных частиц (ВПЧ), полученных при экспрессии БО ВМП в клетках *E. coli* [4, 5]. Имеющиеся сведения о структуре БО многих вирусов позволяют направленно присоединять целевой полипептид к концевым аминокислотам, локализованным на поверхности вирусной частицы. В частности, структура белковых субъединиц вируса табачной мозаики (ВТМ) изучена достаточно детально, что

позволяет локализовать положение разных аминокислот на поверхности вирусных частиц [6, 7]. Присоединение (химическим или генно-инженерным способом) активного чужеродного белка/пептида к поверхности субъединиц БО самореплицирующегося вируса позволяет использовать такие конструкции в качестве инструментов для прямой реализации активности чужеродного белка/пептида в составе модифицированного вируса. Так были сконструированы частицы ВТМ, несущие на С-конце субъединиц БО крупный фрагмент протеина А, сохранивший способность связывать моноклональные антитела при их очистке [8], или созданы частицы Х-вируса картофеля, несущие молекулы фермента липазы на N-конце субъединиц [9].

Создание на основе полноразмерных геномов фитовирусов векторов, содержащих в своем составе последовательности чужеродных антигенов, при экспрессии которых в растениях образуются вирусные частицы, несущие на своей поверхности антигенные детерминанты патогенов человека, открыло новые возможности в получении безопасных кандидатных вакцинных препаратов [10–13].

Важным направлением практической реализации этих принципов является создание вакцинных препаратов с использованием самореплицирующихся частиц, несущих на своей поверхности в качестве целевого пептида антигенную детерминанту (эпитоп) патогена или иной функционально активный полипептид. Так, были созданы химерные формы геномов тобамо- и потексвирусов, продуцирующие вирусные или вирусоподобные частицы, несущие эпитопы патогенов [2, 14, 15]. Химерный ВТМ, созданный на основе слияния субъединиц

БО с эпитопом M2e вируса гриппа А человека, в опытах на лабораторных животных обладал протекторной активностью, т.е. являлся кандидатной вакциной [16].

Преимущества вакцин, созданных на основе включения эпитопа в ген БО, перед аттенуированными химически инактивированными вирусами и субъединичными вакцинами определяются исключением возможности реверсий и рекомбинаций патогена, а также получением высоких титров антител при иммунизации животных в отсутствие адъювантов ввиду высокой иммуногенности вирусных частиц [16].

Создание вирусов-векторов может быть достигнуто в результате замены одного или части генов (деконструкции вируса) на ген(ы) целевого белка. Удаление генов межклеточного транспорта и БО полностью блокирует транспорт вируса по растению, сохраняя способность РНК реплицироваться в форме репликона. В отсутствие традиционного межклеточного транспорта доставка вирусов-векторов в клетки растения и массовое накопление целевого белка достигается с помощью агробактериальной инфильтрации вируса вектора [17]. Наработка целевых белков в растениях не требует применения дорогостоящих культуральных сред, аппаратуры и системы стерильности, в результате чего стоимость белков, получаемых в растениях, в 10–30 раз ниже стоимости аналогичных белков, получаемых в бактериальных или животных клетках [18]. Сконструированы различные варианты векторов этого типа [12].

Удобным объектом для конструирования деконструктивных векторов является вирус Х картофеля (ХВК) и другие потексвирусы. Вирусы-векторы на основе генома потексвирусов использовались для продукции в растениях целевых белков различного происхождения, включая вирус иммунодефицита человека I [19], антигены *Mycobacterium tuberculosis* [20] и миелоцитокины [21].

Известны и так называемые аффинно-конъюгированные антигенные системы. Такие системы включают в себя рекомбинантные вирусы с БО, несущим участок связывания чужеродного целевого белка. В этих случаях ген вирусного БО следует генетически модифицировать введением вставок или делеций для получения аффинных участков связывания целевых субстанций белковой природы. Например, в БО ВТМ вводили реактивный лизин в N-концевую часть для связывания вирусной частицы с биотином. В независимых опытах получали зеленый флуоресцентный белок, ковалентно связанный со стрептавидином. В результате специфического авидин-биотин взаимодействия получали частицы вируса, декорированного зеленым флуоресцентным белком медузы. Использование аффинно-конъюгированных систем обладает рядом недостатков: относительно невысокая биологическая активность, сложность и многоступенчатость процедуры приготовления. Необходимо получить

модифицированный биотином БО вируса биотин либо стрептавидин-меченный целевой белок, кроме того, необходима сложная многоступенчатая очистка комплекса “вирус-биотин-стрептавидин-целевой белок” [22].

Перспективным для использования в качестве платформы при создании высокоиммуногенных комплексов и продукции антител к целевому антигену является рекомбинантный ядерный антиген вируса гепатита В (НВсAg). Выполняя роль носителя чужеродных антигенных детерминант, НВсAg образует симметричные икосаэдрические (30 нм) частицы, придавая высокую иммуногенность встроенным чужеродным антигенным детерминантам. Метод освоен на продукции растительным вирусом-вектором рекомбинантного НВсAg-носителя со вставкой эпитопов M2e вируса гриппа А [23, 24], эпитопов гликопротеина Е1 вируса краснухи [25]. Введение чужеродных пептидных фрагментов как в N-, так и в С-концевую часть НВсAg не нарушает процесса его самосборки, и при этом пептиды оказываются экспонированными на поверхности молекулы.

Целью настоящей работы является обсуждение структуры и уникальных свойств принципиально нового типа платформ — сферических частиц, образуемых при кратковременном нагревании спиральных вирусов растений (с высвобождением РНК) и способных адсорбировать на поверхности самые разные антигенные детерминанты, образуя высокоиммуногенные вакцинные комплексы СЧ-иммуноген.

Структурная перестройка спиральных вирусов растений в сферические частицы-платформы

Лауффер и Прайс [26] доказали, что тепловая инаktivация ВТМ сопровождается денатурацией вирусного БО. Особенностью ВТМ является высокий уровень термостабильности: инфекционность вируса частично сохраняется даже после инкубации инфекционного сока в течение 10 мин при 90°C. Было показано, что инаktivация инфекционности ВТМ непосредственно связана с денатурацией вирусного БО. Около 60 лет назад было показано, что при нагревании ВТМ в течение 10 сек при 98°C палочковидные вирионы перестраиваются в округлые частицы, объем которых соответствует объему нативного вируса [27]. К сожалению, эта работа не была продолжена, и структура продуктов перестройки ВТМ не была исследована.

В последние годы детальное изучение структурной перестройки спиральных частиц ВТМ (и некоторых других спиральных вирусов) с образованием сферических частиц было проведено группой вирусологов МГУ. В частности, было показано, что размеры СЧ варьировали в широких пределах и по большей части не соответствовали по объему нативным частицам ВТМ (53 нм). СЧ нерастворимы

в воде, гетерогенны по размерам, но идентичны по форме. СЧ находятся в форме стабильных коллоидных растворов или в виде относительно стабильных суспензий (в зависимости от размеров СЧ). Размеры СЧ варьируют от наночастиц (диаметр 50–150 нм) до микрочастиц (диаметр 150–800 нм). Было показано, что размер СЧ зависит от применяемой исходной концентрации вируса, т.е. размеры частиц могут контролироваться [28].

СЧ образуются в результате термической денатурации и конформационной перестройки БО нативных частиц ВТМ. Точнее, СЧ состоят из термически денатурированных субъединиц БО, специфически собираемых в сфероид в результате двухступенчатой сборки. Электронно-микроскопический анализ позволил выявить по крайней мере две фазы сборки СЧ. На первой стадии (при 90°C) образовывались гантеливидные структуры, у которых часть палочки уже преобразована в форму, приближающуюся к сферической на обоих или на одном конце вириона (рис. 1, а). На этом этапе сборки присутствовало также значительное количество дискретных частиц неправильной формы и разных размеров (рис. 1, б), которые в дальнейшем трансформировались в СЧ при 94–98°C (рис. 1, в, г) [28].

Показано, что СЧ исключительно стабильны. Так, СЧ не изменяют форму и размеры, не сливаются и не агрегируют друг с другом при хранении и ряде обработок, включая повторное замораживание до –20°C с последующим оттаиванием, повторное нагревание до 98°C и охлаждение, осаждение центрифугированием при 10 000хg и ресуспендирование, а также хранение в течение длительного времени (более года) при 4°C и при комнатной температуре. Последнее, по-видимому, объясняется

тем, что формирование СЧ осуществляется при 98°C, т.е. в условиях стерилизации [28].

Следует заметить, что образование СЧ происходит не только с применением спиральных частиц нативного ВТМ. С равным успехом СЧ могли быть получены с применением препаратов любых агрегатных форм БО ВТМ, включая 20S двойной диск, 4S тример субъединиц и даже мономерную форму БО ВТМ. В соответствии с нашими ожиданиями СЧ формировались из реполимеризованных спиральных частиц БО, не содержащих РНК. Особенность получения СЧ с применением промежуточных агрегатов БО ВТМ, не содержащих РНК, состояла в том, что формирование СЧ в таких системах происходило при пониженной по сравнению с нативным вирусом температуре (65°C, а не 94–98°C) [28].

При термической денатурации ВТМ субъединицы белка оболочки приобретают конформацию, которая является благоприятной для образования частиц сферической формы различного размера.

Ряд структурных особенностей белка СЧ-платформ был охарактеризован с применением методов кругового дихроизма, флуоресцентной микроскопии и спектроскопии комбинационного рассеяния света [29]. Было обнаружено, что структура белка СЧ значительно отличается от структуры БО в составе нативного ВТМ. Трансформация ВТМ–СЧ сопровождается конформационной перестройкой субъединиц нативного БО ВТМ, который содержит около 50%, в то время как в составе СЧ содержание α -спиралей резко снижено при значительном увеличении содержания фракции β -структур. Показано, что белок СЧ активно реагирует с тиофлавином Т, что указывает на образование амилонидоподобных структур [29]. Термическая денатура-

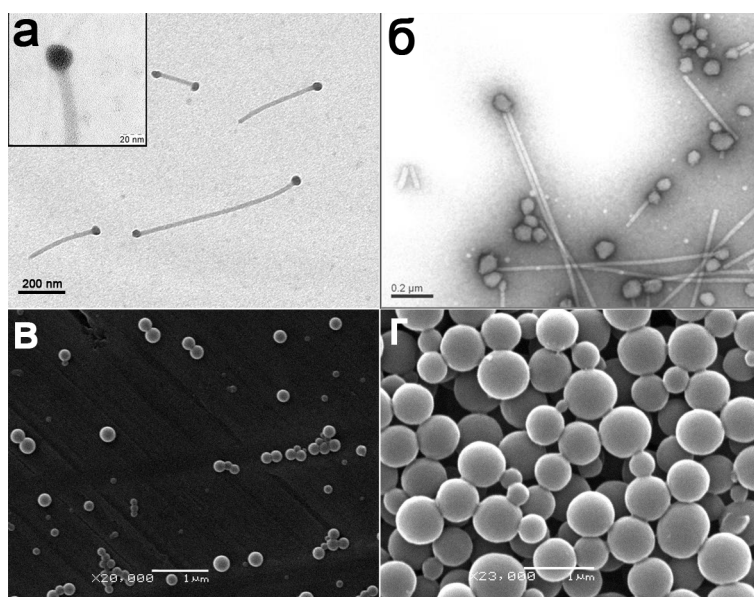


Рис. 1. Образование сферических частиц (СЧ) из вируса табачной мозаики (ВТМ) в процессе термической перестройки: (а–б) переходные формы, являющиеся предшественниками СЧ. Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2% уранил ацетатом; (в–г) сферические частицы, полученные при нагревании до 94°C препаратов нативного ВТМ с исходной концентрацией вируса 1 мг/мл; (в) 10 мг/мл (г). Сканирующая электронная микроскопия [28]

ция и изменение конформации субъединиц белка оболочки делает их нерастворимыми в воде и приводит к их ассоциации с образованием СЧ. Весьма вероятно, что денатурация БО ВТМ сопровождается увеличением степени гидрофобности поверхности СЧ [29].

Перестройка спиральных вирионов с образованием СЧ наблюдалась при термической обработке и других вирусов растений со спиральной структурой. В частности, показано, что нитевидные частицы ХВК перестраиваются в СЧ при термоденатурации вирионов [30]. По-видимому, феномен структурной реорганизации с образованием СЧ универсален для таксономически разных спиральных вирусов.

Сборка *in vitro* иммуногенных комплексов из СЧ-платформ и чужеродных антигенов

Демонстрация индукции иммунного ответа является ключевым этапом при создании вакцинного препарата. В серии опытов Карпова с соавт. [31] сформировали и охарактеризовали комплексы, состоящие из СЧ и чужеродного “целевого” компонента (белок/эпитоп), связанного с поверхностью СЧ-платформы.

Следует отметить, что в отличие от частиц нативного ВТМ СЧ-платформы оказались способны активно адсорбировать на поверхности разнообразные чужеродные белки [31]. Таким образом, состояние денатурированного БО ВТМ оказалось весьма благоприятным для неспецифической адсорбции на поверхности СЧ структурно и функционально неродственных белков. Ниже перечислены некоторые антигены, которые эффективно связываются с поверхностью СЧ-платформ, образуя иммуногенные композиции: белок оболочки ХВК, N-терминальный эпитоп М2е трансмембранного поверхностного белка М2 вируса гриппа человека А; полипептид гемагглютинаина вируса гриппа А человека; тетраэпитоп А гликопротеина Е1 вируса краснухи [31].

Эти и другие результаты показывают, что СЧ-платформа может использоваться в качестве платформы для презентации различных чужеродных антигенов на ее поверхности [31–34].

С применением методов флуоресцентной микроскопии, а также иммуоэлектронной микроскопии было установлено, что чужеродные антигены, а также ферменты и флуоресцентные белки типа зеленого флуоресцентного белка медузы связываются с поверхностью СЧ-платформ. Связанные с поверхностью СЧ чужеродные антигены активно реагируют со специфическими антителами, свидетельствуя о том, что антигенная специфичность этих белков не изменялась после их адсорбции на поверхности СЧ (рис. 2, а, б) [31].

В целом полученные результаты позволили заключить, что СЧ представляют собой универсальные частицы-платформы, адсорбирующие на поверхности различные чужеродные антигены с образованием иммуногенных комплексов. Следовательно, комплексы “СЧ–иммуноген” могут рассматриваться как кандидатные вакцины, формируемые *in vitro*.

Важно заметить, что уровни титров антител к целевым антигенам (БО ХВК) возрастали при смешивании с частицами СЧ-платформы до иммунизации. Обычно этот эффект проявлялся наиболее сильно, если чужеродный антиген был ковалентно связан с поверхностью СЧ-платформ [31]. Полученные результаты свидетельствовали о том, что СЧ-платформы способны стимулировать гуморальный иммунный ответ на введение чужеродных белков, т.е. СЧ-платформы обладают выраженной адъювантной активностью [31].

Брукман с соавт. [35] изучили некоторые биологические свойства СЧ, полученных при термической денатурации ВТМ. Авторы выяснили, что нативные вирионы ВТМ и СЧ одинаково распределяются по организму, при этом вирионы ВТМ циркулируют в организме дольше, чем СЧ. Кроме того, авторы показали, что присутствие СЧ в крови не приводит к гемолизу или свертываемости крови.

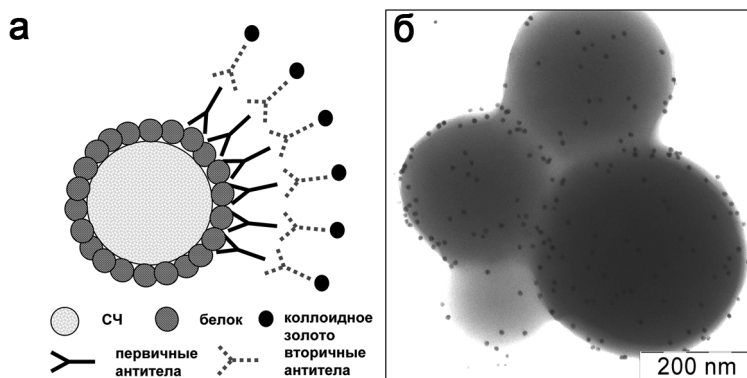


Рис. 2. Схема визуализации посадки рекомбинантных белков на сферическую частицу с помощью метода иммуоэлектронной микроскопии (а); иммуоэлектронная микроскопия композиций СЧ–БО ХВК. В качестве первичных антител были использованы иммуноглобулины к БО ХВК, в качестве вторичных антител — видоспецифичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (б) [31]

Сборка иммуногенных комплексов из СЧ-платформ и нативных изометрических вирусов

Было показано, что СЧ способны адсорбировать на своей поверхности не только молекулы белков, но и интактные вирионы изометрических вирусов размером от 30 до 50 нм, включая кауловирусы, энтеровирусы, кардиовирусы [36]. Таким образом, установлено, что интактные вирионы разной природы и размеров способны неспецифически адсорбироваться на поверхности СЧ. Архитектура таких комплексов была исследована с помощью сканирующего микроскопа высокого разрешения, было показано, что поверхность СЧ покрыта икосаэдрическими вирионами. Большая часть экспериментов была поставлена с вирусом мозаики цветной капусты (ВМЦК) с диаметром около 50 нм. Были получены два вида комплексов СЧ–ВМЦК: в одном случае икосаэдрический вирус фиксировали на поверхности формальдегидом, в другом формальдегид не добавляли. В отдельной серии экспериментов иммунохимическим методом было показано, что в комплексе СЧ–ВМЦК, стабилизированном формальдегидом, СЧ недоступны для взаимодействия со специфическими антителами, полученными к СЧ, что, по-видимому, связано с тем, что вирионы ВМЦК маскируют поверхность СЧ. В опытах на лабораторных животных было показано, что иммуногенность комплексов СЧ–ВМЦК, обработанных формальдегидом, была невысока и не отличалась от иммуногенности контроля (вирионы ВМЦК). Однако иммуногенность комплексов СЧ–ВМЦК, не фиксированных формальдегидом, была высокой. Можно предположить, что антигенные и адъювантно активные участки СЧ-платформ оказываются экранированы в составе комплексов СЧ с изометрическим вирусом, фиксированным формальдегидом. Отсутствие фиксации формальдегидом несколько дестабилизирует комплекс, частично делая доступными адъювантно активные участки СЧ-платформ и повышая иммуногенность вирусного компонента [36].

Ранее было установлено [28], что иммуногенность СЧ-платформ почти в 20 раз выше иммуногенности нативного ВТМ. Недавно Карпова с соавт. [31] сообщили, что СЧ-платформы, генерируемые при термоденатурации ВТМ, проявляют адъювантную активность при связывании чужеродных антигенов или при смешивании СЧ, или с нативными вирионами [36]. Таким образом, конформационные изменения в белке ВТМ серьезно изменяют адсорбционные свойства СЧ-платформ по сравнению с нативными вирионами.

Композиции, состоящие из СЧ-платформ, на поверхности которых адсорбированы или связаны с поверхностью ковалентно чужеродные белки-иммуногены, потенциально имеют ряд преимуществ

перед аттенуированными, химически инактивированными и субъединичными вакцинами. Этот подход исключает возможность патогенных реверсий и рекомбинаций, так как композиции СЧ-антиген собираются из генетически инертных компонентов. Вакцины, полученные на основе СЧ, будут биологически безопасны, так как человек и сельскохозяйственные животные не имеют общих патогенов с растениями. Важная особенность СЧ-платформ и композиций, полученных на их основе, — стабильность и практически полное отсутствие агрегации суспензии при хранении. Белки различного аминокислотного состава и размеров и даже целые вирионы могут быть использованы для создания комплексов благодаря уникальным адсорбционным свойствам СЧ. Иммуногенность СЧ-платформ почти в 20 раз выше иммуногенности нативного ВТМ, и они обладают высокой адъювантной активностью [28, 31, 36].

Ранее мы предположили, что уникальные свойства СЧ позволят расширить круг областей их применения в нанотехнологиях биологии и техники [37–40]. В соответствии с этим предположением Брукман с соавт. [41] сообщили, что генерируемые ВТМ СЧ, модифицируемые ионами (хелатами) гадолиния, могут применяться в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии. При этом было показано, что у сферических частиц уровень релаксационной релаксации был значительно выше, чем у нативных частиц ВТМ. Другие авторы показали возможность связывания золотых наночастиц диаметром 15 нм на поверхности СЧ [42]. Таким образом, сферические частицы, полученные при термической денатурации ВТМ, имеют большой практический потенциал в области биомедицинских исследований.

Заключение

В настоящей работе основное внимание сосредоточено на характеристике и применении в биотехнологии феномена структурной перестройки спиральных фитовирусов в сферические частицы (СЧ) — платформы нового типа. Размеры СЧ, формируемых при термической структурной перестройке, зависят от исходной концентрации нативного спирального вируса. Уникальная особенность СЧ-платформ — способность неспецифически сорбировать на своей поверхности структурно и функционально различные антигены. СЧ-платформы высоко иммуногенны и обладают выраженной адъювантной активностью. Иммуногенность антигенных детерминант в присутствии СЧ значительно возрастает как в составе комплекса, в котором СЧ ковалентно связаны с антигеном, так и при их простом смешивании. Сборка иммуногенных комплексов СЧ–антиген *in vitro* открывает перспективы недорогого и быстрого получения разнообразных вакцинных препаратов. Частицы

СЧ уникальны, не имеют структурных аналогов среди икосаэдрических вирусов и представляют собой новый тип биогенных платформ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Atabekov J.G. Using viral structures as nanotechnology instruments // *Nanotechnologies in Russia*. 2008. Vol. 3. N 1–2. P. 128–137.
2. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8+ T cells in mice // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. N 37. P. 5069–5076.
3. Acosta-Ramírez E., Pérez-Flores R., Majeau N., Pastelin-Palacios R., Gil-Cruz C., Ramírez-Saldaña M., Manjarrez-Orduño N., Cervantes-Barragán L., Santos-Argumedo L., Flores-Romo L., Becker I., Isibasi A., Leclerc D., López-Macias C. Translating innate response into long-lasting antibody response by the intrinsic antigen-adjuvant properties of papaya mosaic virus // *Immunology*. 2008. Vol. 124. N 2. P. 186–197.
4. Denis J., Acosta-Ramírez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Paré C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform // *Vaccine*. 2008. Vol. 26. N 27–28. P. 3395–3403.
5. Savard C., Guerin A., Drouin K., Bolduc M., Laliberte-Gagne M.E., Dumas M.C., Majeau N., Leclerc D. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 6. e21522.
6. Stubbs G. Tobacco mosaic virus particle structure and initiation of disassembly // *Philos. Trans. R. Soc. London B*. 1999. Vol. 354. N 1383. P. 551–557.
7. Klug A. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly // *Philos. Trans. R. Soc. London B*. 1999. Vol. 354. N 1383. P. 531–535.
8. Werner S., Marillonnet S., Hause D., Klimyuk V., Gleba Y. Immunoabsorbent nanoparticles based on a tobamovirus displaying protein A // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. N 47. P. 17678–17683.
9. Carette N., Engelkamp H., Akpa E., Pierre S.J., Cameron N.B., Christianen P.C.M., Maan J.C., Thies J.C., Weberskirch R., Rowan A.E., Nolte J.M., Michon T., Van Hest J.C.M. A virus-based biocatalyst // *Nat. Nanotechnol.* 2007. Vol. 2. N 4. P. 226.
10. Porta C., Lomonosoff G. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2002. Vol. 40. P. 45–74.
11. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection — a new platform for expression recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. Vol. 23. N 17–18. P. 2042–2048.
12. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Viral vectors for the expression of proteins in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. Vol. 18. N 2. P. 134–141.
13. Gleba Y., Tusé D., Giritch A. Plant viral vectors for delivery by Agrobacterium // *Plant Viral Vectors* / Ed. by Palmer K., Gleba Y. Berlin: Springer Verlag Berlin, 2014. P. 155–192.
14. McCormick A., Palmer K. Genetically engineered Tobacco mosaic virus as nanoparticle vaccines // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. Vol. 7. N 1. P. 33–41.
15. Lico C., Chen Q., Santi L. Viral vectors for production of recombinant proteins in plants // *J. Cell Physiol.* 2008. Vol. 216. N 2. P. 366–377.
16. Petukhova N., Gasanova T., Stepanova L., Rusova O., Potapchuk M., Korotkov A., Skurat E., Tsybalova L., Kiselev O., Ivanov P., Atabekov J. Immunogenicity and protective efficacy of candidate universal influenza A nanovaccines produced in plants by tobacco mosaic virus-based vectors // *Curr. Pharm. Design*. 2013. Vol. 19. N 31. P. 5587–5600.
17. Kapila J., DeRycke R., VanMontagu M., Angenon G. An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves // *Plant Sci*. 1997. Vol. 122. N 1. P. 101–108.
18. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter F. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals // *Nat. Biotechnol.* 2000. Vol. 18. N 11. P. 1151–1155.
19. Marusic C., Rizza P., Lattanzi L., Mancini C., Spada M., Belardelli F., Benvenuto E., Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1 // *J. Virol.* 2001. Vol. 75. N 18. P. 8434–8439.
20. Zelada A.M., Calamante G., de la Paz Santangelo V., Bigi F., Verna F., Mentaberry A., Cataldi F. Expression of tuberculosis antigen ESAT-6 in *Nicotiana tabacum* using a potato virus X-based vector // *Tuberculosis*. 2006. Vol. 86. N 3–4. P. 263–267.
21. Zvereva A.S., Petrovskaya L.E., Rodina A.V., Frolova O.Y., Ivanov P.A., Shingarova L.N., Komarova T.V., Dorokhov Y.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Atabekov J.G. Production of biologically active human myelocytokines in plants // *Biochemistry (Mosc)*. 2009. Vol. 74. N 11. P. 1187–1194.
22. Smith M., Lindbo J., Dillard-Telm S., Brosio P., Lasnik A., McCormick A., Nguyen L., Palmer K. Modified tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications // *Virology*. 2006. Vol. 348. N 2. P. 475–488.
23. Ravin N.V., Kotlyarov R.Y., Mardanov E.S., Kuprianov V.V., Migunov A.I., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Skryabin K.G. Plant-produced recombinant influenza vaccine based on virus-like HbC particles carrying an extracellular domain of M2 protein // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. Vol. 77. N 1. P. 33–40.
24. Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Tsybalova L.M., Kiselev O.I., Ravin N.V., Skryabin K.G. A molecular assembly system for presentation of antigens on the surface of HbC virus-like particles // *Virology*. 2013. Vol. 435. N 2. P. 293–300.
25. Skrastina D., Petrovskis I., Petraityte R., Sominskaya I., Ose V., Lieknina I., Bogans J., Sasnauskas K., Pumpens P. Chimeric Derivatives of Hepatitis B Virus Core Particles Carrying Major Epitopes of the Rubella Virus E1 Glycoprotein // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. Vol. 20. N 11. P. 1719–1728.
26. Lauffer M.A., Price W.C. Thermal denaturation of tobacco mosaic virus // *J. Biol. Chem.* 1940. Vol. 133. N 1. P. 1–15.
27. Hart R.G. Morphological changes accompanying thermal denaturation of Tobacco mosaic virus // *Biochim. Biophys. Acta*. 1956. Vol. 20. N 2. P. 388–389.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

28. Atabekov J., Nikitin N., Archipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *J. Gen. Virol.* 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
29. Dobrov E., Nikitin N., Trifonova E., Parshina E., Makarov V., Maksimov G., Karpova O., Atabekov J. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.
30. Trifonova E.A., Nikitin N.A., Petrova E.K., Karpova O.V., Atabekov J.G. Spherical virus-like particles generated by thermal denaturation of helical Potato virus X // *FEBS J.* 2014. Vol. 281. N 1. P. 421–423.
31. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *J. Gen. Virol.* 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
32. Nikitin N., Malinin A., Rakhnyanskaya A., Trifonova E., Karpova O., Yaroslavov A., Atabekov J. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // *Polym. Sci. Ser. A.* 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
33. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by Nanoparticle Tracking Analysis // *Microscopy and Microanalysis.* 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
34. Nikitin N., Malinin A., Trifonova E., Rakhnyanskaya A., Yaroslavov A., Karpova O., Atabekov J. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // *J. Biomat. Sci. Polym. E.* 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
35. Bruckman M., Randolph L., Meter A., Hern S., Shoffstall A., Taurog R., Steinmetz N. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice // *Virology.* 2014. Vol. 449. P. 163–173.
36. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
37. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Чирков С.Н. Новый тип частиц-носителей (платформ) для получения активных комплексов // Патент РФ 2441667 от 10.02.2012 г.
38. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Иммуногенная композиция, содержащая чужеродные антигены на поверхности сферических носителей, полученных при термической денатурации спиральных вирусов // Патент РФ 2440140 от 20.01.2012 г.
39. Атабеков И.Г., Карпова О.В., Кирпичников М.П., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Чирков С.Н., Шевелева А.А. Способ усиления иммунного ответа // Патент РФ 2442604 от 20.02.2012 г.
40. Atabekov J.G., Arkhipenko M.V., Karpova O.V., Kirpichnikov M.P., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Chirkov S.N., Sheveleva A.A. Spherical nano- and microparticles derived from plant viruses for the display of foreign proteins and epitopes // *The Patent Cooperation Treaty (PCT) WO* 2012/078069 A1.
41. Bruckman M., Hern S., Jiang K., Flask C., Yua X., Steinmetz N. Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents // *J. Mater. Chem. B.* 2013. Vol. 1. N 10. P. 1482–1490.
42. Shah S., Shah S., Heddle J. Wild-type tobacco mosaic virus (TMV) as a scaffold for gold nanoparticle fabrication // *Abstract Book of GOLD2012: The 6th International Conference on Gold Science, Technology and its Applications.* Tokyo, 2012. 2P-072.

Поступила в редакцию
08.04.14

NEW TYPE PLATFORMS FOR *IN VITRO* VACCINES ASSEMBLY

J.G. Atabekov, N.A. Nikitin, O.V. Karpova

Studying of plant virions and viral coat proteins structure, and also possibilities of their modification and structural remodeling are extremely important for development of absolutely new approaches to creation of biotechnological products, including health products. Plant viruses have clear advantage for obtaining new functional and biologically active materials, inter alia candidate vaccines, due to the fact that plant viruses are not pathogenic for mammals, including humans. The present review focuses attention on characteristic and applying in biotechnology of spherical particles (SP) — the new type platforms generated by structural remodeling of plant viruses. SPs have no structural analogs among the icosahedral viruses and represent the new type of biogenic platforms. Assembly of immunogenic complexes of SP-antigen *in vitro* opens perspectives of inexpensive and rapidly produced various vaccines.

Key words: helical viruses, spherical particles, platforms, complexes with antigen of interest, immunogenicity, adjuvant properties, review.

Сведения об авторах

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 579.2.08

ОБНАРУЖЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ СУЛЬФАТРЕДУЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ ВЕРХНИХ ВОДНЫХ ГОРИЗОНТАХ ЧЕРНОГО И БАЛТИЙСКОГО МОРЕЙ

А.Л. Брюханов, В.А. Корнеева, Н.В. Пименов*

(кафедра микробиологии; e-mail: brjuchanov@mail.ru)

Методами флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) и ПЦР был проведен анализ филогенетического состава сообществ анаэробных сульфатредуцирующих бактерий (СРБ) в кислородсодержащих верхних водных горизонтах меромиктических водоемов — Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря. На глубинах 30–70 м черноморского континентального склона были обнаружены клетки, гибридизовавшиеся с FISH-зондами на 16S рРНК СРБ родов *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* и *Desulfovibrio*. В зоне хемоклина Черного моря на глубине 150 м преобладали представители рода *Desulfomicrobium*. Помимо *Desulfotomaculum* (1-я подгруппа СРБ), *Desulfobacter* (4-я подгруппа СРБ) и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (6-я подгруппа СРБ) посредством вложенной ПЦР с праймерами на ген 16S рРНК в кислородсодержащей водной толще Черного и Балтийского морей было обнаружено также присутствие представителей 5-й подгруппы СРБ — *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*. Из водной пробы, отобранной в Черном море с глубины 70 м, выделена активная накопительная культура СРБ, основным компонентом которой является *Desulfosporosinus* sp.

Ключевые слова: сульфатредуцирующие бактерии, *Desulfosporosinus*, флуоресцентная гибридизация *in situ*, вложенная ПЦР, меромиктический водоем, Черное море, Гданьская впадина Балтийского моря.

Черное море представляет собой крупнейший в мире меромиктический водоем и резервуар растворенного сероводорода и метана. На континентальном склоне кислородсодержащие воды (~300 мкМ O_2 в подповерхностном слое) простираются до глубин 140–175 м, где концентрация кислорода падает до 2–10 мкМ. Зона хемоклина расположена обычно между 95 м (начало резкого снижения концентрации кислорода) и 157–167 м (присутствие следов сероводорода) [1, 2]. Ниже зоны хемоклина в Черном море находится бескислородная водная толща, содержащая H_2S (до 370 мкМ на глубинах свыше 1500 м). В Гданьской впадине Балтийского моря зона хемоклина начинается на глубине 80 м (содержание O_2 — 69 мкМ), а H_2S появляется в придонном слое на 102 м [3]. Таким образом, верхние водные горизонты Черного моря и впадины Балтийского моря представляют собой хорошие модели для изучения распространения микроорганизмов на одном вертикальном разрезе с различными гидрохимическими условиями.

Особый интерес представляют микробные сообщества на границе аэробных и анаэробных вод. Так, в зоне хемоклина Черного моря были обнаружены заметные активные микробные процессы (темновая фиксация углекислоты, трансформация соединений серы, продукция и окисление метана) [4].

Сульфатредуцирующие бактерии (СРБ), представляющие собой разнообразную в филогенетическом плане группу, используют водород и преимущественно низкомолекулярные органические вещества в качестве доноров электронов для восстановления сульфата, в результате чего образуется сероводород. СРБ относят к строгим анаэробам, однако многие виды обладают системами антиокислительной защиты и способны существовать в местообитаниях, подвергающихся воздействию кислорода [5]. СРБ играют важнейшую роль в накоплении H_2S в глубинных водах Черного моря. Однако с использованием меченого $^{35}S-SO_4^{2-}$ было обнаружено, что в Черном море сульфатредукция происходит не только в анаэробной водной толще, но даже и в кислородсодержащих водах [2].

Первые работы по обнаружению методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) клеток СРБ в кислородсодержащих горизонтах Черного моря были проведены лишь недавно [2]. Также путем анализа гена 16S рРНК было показано присутствие эндоспор *Desulfotomaculum* spp. в водах Балтийского моря на глубинах 1 м и 14 м [6]. К настоящему времени созданы ПЦР-праймеры, специфичные к генам 16S рРНК основных филогенетических подгрупп СРБ [7], однако их не использовали ранее для выявления СРБ в морских водах. Основной целью данной работы являлось

* Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, г. Москва.

определение филогенетической принадлежности СРБ, детектированных ранее в кислородсодержащих водных горизонтах Черного и Балтийского морей.

Материалы и методы

В Черном море водные образцы с глубин до 200 м отбирали с помощью CTD-зонда “Sea-Bird 19” (США), оснащенного 10-литровыми батометрами Нискина и погружным насосом, с борта НИС “Ашамба”. Станция отбора (N44.458°, E37.882°, глубина 1300 м) располагалась на континентальном склоне в 16 км от Голубой бухты (г. Геленджик). В Гданьском заливе Балтийского моря пробы воды с глубин до 107 м отбирали на станции 22 (N54.860°, E19.333°) с борта траулера МРТК-1073.

Водные пробы для FISH-анализа фиксировали в 4%-м растворе формальдегида в PBS (pH 7,0) и хранили при 4°C. Клетки концентрировали на мембранных фильтрах GTBP 2500 (Millipore, США). Гибридизацию осуществляли в соответствии с методикой, описанной ранее [2]. Использовали меченые цианином-3 16S рРНК-специфичные зонды на домены Bacteria и Archaea [8] и основные филогенетические подгруппы СРБ [9–11]. Общую численность микроорганизмов определяли с помощью ДНК-красителя 4',6-диамидино-2-фенилиндола (0,5 нг/мкл). Визуализацию проводили в 30 полях зрения при увеличении $\times 1000$ на эпифлуоресцентном микроскопе Axio Imager.D1 (Carl Zeiss, Германия) с цифровой камерой Axio Cam HRC и световыми фильтрами Zeiss 20/49.

Для выделения тотальной ДНК по 5 л водных проб последовательно фильтровали через стекловолоконные фильтры GF/C (Whatman, США) и мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (Millipore, США), затем их разрушали в жидком азоте и использовали набор Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). Смесь для ПЦР содержала ~25 нг ДНК-матрицы; 2,0 mM MgCl₂; 400 мкМ дНТФ; по 500 нМ праймеров и 2,5 ед. Taq ДНК-полимеразы. ПЦР проводили при режиме: 5 мин при 95°C; 35 циклов — 1 мин при 95°C; 1 мин при соответствующей температуре отжига и 1 мин при 72°C (6 мин для праймеров pA и pH'); 10 мин при 72°C. Использовали праймеры на ген 16S рРНК Bacteria (pA и pH') [12] и шести филогенетических подгрупп СРБ [7], а также на ген *dsrB* [13].

Накопительные культуры СРБ получали анаэробно на среде Видделя для морских СРБ [14]. Посевным материалом служили капроновые фильтры со сконцентрированными из 100 мл воды клетками. Рост культур СРБ при 22°C оценивали по образованию сероводорода, определяемого колориметрически (λ 670 нм) после окраски проб парафенилендиаминном [15]. Идентификацию СРБ осуществляли по следующей схеме: амплифицировали участки гена 16S рРНК Bacteria с использованием выделенной ДНК и праймеров 341F/907R [16], клонировали полученные ампликоны в векторе pGEM-T

(Promega, США) и проводили их анализ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Hae*III и последующего секвенирования.

Результаты и обсуждение

В зоне хемоклина Черного моря численность микроорганизмов была на 20% выше, чем в подповерхностных водах ($1,06 \times 10^6$ кл/мл); доля бактерий в зоне хемоклина уменьшалась с 75 до 40%, но в 4 раза возрастала численность архей. В Гданьской впадине Балтийского моря количество бактерий также снижалось с 65% в аэробных водах (30–50 м) до 28% в зоне хемоклина, а доля архей повышалась с 4 до 12% от общей численности микроорганизмов.

ПЦР с тотальной ДНК, выделенной из водных проб, и праймерами на ген *dsrB* (кодирующий β -субъединицу диссимиляционной сульфитредуктазы — ключевого фермента сульфатредукции) показала наличие генетического материала СРБ в кислородсодержащих водных слоях как Черного (от 30 до 200 м), так и Балтийского (от 10 до 107 м) морей.

Количество бактериальных клеток, дающих гибридизационный сигнал с FISH-зондами на 16S рРНК родов *Desulfotomaculum* (Dtm229), *Desulfovibrio* (DSV1292) и *Desulfobacter* (DSB129), в подповерхностных водах Черного моря на глубинах 30–70 м составляло до 2×10^5 ; $1,2 \times 10^5$ и $4,4 \times 10^4$ кл/мл соответственно (рис. 1, а). Бактерии рода *Desulfomicrobium* (DSV214) представляли доминирующую филогенетическую подгруппу сульфатредукторов у нижней границы хемоклина Черного моря на глубинах 157–167 м (1×10^5 кл/мл), а численность *Desulfovibrio* spp. на этих глубинах резко снижалась (рис. 1, а). Клетки *Desulfotomaculum* spp. не были обнаружены в зоне хемоклина Черного моря методом FISH, однако участки гена 16S рРНК данного рода детектировали на глубинах 100 и 145 м вложенной ПЦР, что свидетельствует о возможном присутствии в хемоклине неактивных минорных представителей рода *Desulfotomaculum*. В предыдущих исследованиях Черного моря с применением FISH-зонда SRB385 на СРБ, относящихся к δ -Proteobacteria [17], и при оценке количества копий гена *dsrA* с помощью ПЦР в реальном времени [18] был обнаружен пик численности сульфатредукторов в зоне хемоклина.

Необходимо отметить, что реальные численности СРБ в кислородсодержащих водах Черного моря могут быть ниже из-за неабсолютной специфичности известных FISH-зондов. Но существуют и иные объяснения возможной высокой численности СРБ в верхних водных горизонтах. Так, многие виды СРБ (в особенности представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum*) обладают эффективными ферментативными системами защиты от окислительных стрессов, а также способны к образованию клеточных агрегатов и симбиотических консорциумов с аэробными микроорганизмами [5].

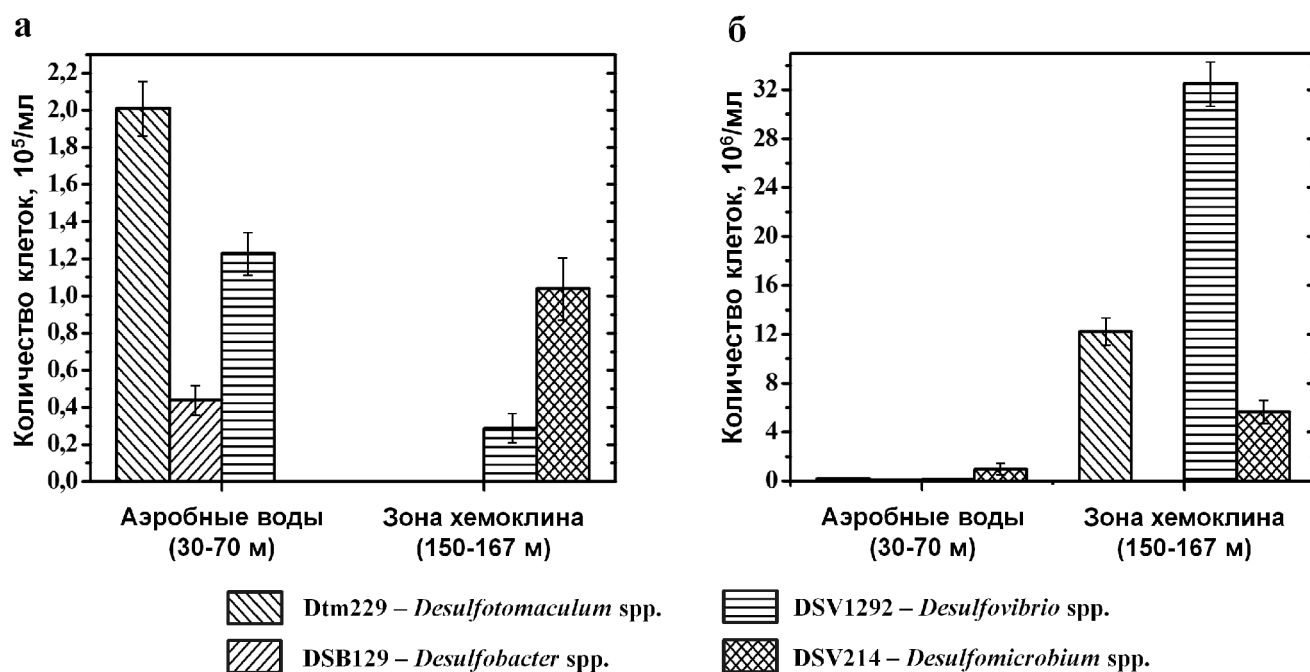


Рис. 1. Определенные методом FISH численность и филогенетический состав сообществ сульфатредуцирующих бактерий в кислородсодержащей водной толще континентального склона Черного моря (а) и в накопительных культурах, выделенных из водных проб с соответствующих глубин (б)

Более надежным методом определения по сравнению с FISH является вложенная ПЦР с предварительно амплифицированными участками гена 16S рРНК Bacteria и праймерами, специфичными к шести основным филогенетическим подгруппам СРБ. Применение вложенной ПЦР подтвердило результаты FISH-анализа, показав наличие в Черном море и в Гданьской впадине Балтийского моря на глубине 30 м помимо *Desulfotomaculum* (1-я подгруппа СРБ), *Desulfobacter* (4-я подгруппа СРБ) и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (6-я подгруппа СРБ) также ДНК представителей 5-й подгруппы СРБ (*Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*). Методом вложенной ПЦР представители 1-й, 5-й и 6-й подгрупп были также обнаружены и в зоне хемоклина. Участков гена 16S рРНК, специфичных для СРБ 2-й (*Desulfobulbus*) и 3-й (*Desulfobacterium*) подгрупп, в кислородсодержащих водных горизонтах обоих меромиктических бассейнов обнаружено не было. Полученные результаты позволяют предположить, что представители *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* и *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* являются доминантными СРБ в верхних водных горизонтах Черного и Балтийского морей до нижней границы хемоклина, поскольку считается, что микроорганизмы, ген 16S рРНК которых можно детектировать исключительно посредством вложенной ПЦР, представлены в природных образцах в меньшем количестве, чем обнаруживаемые также и менее чувствительной прямой ПЦР [7].

В подповерхностных водах и в зоне хемоклина ПЦР с использованием тотальной ДНК, выделенной из проб воды, профильтрованных только через фильтры GF/C (для оценки наличия не только

свободноживущих СРБ, но и ассоциированных с органической взвесью), детектировала присутствие участков гена 16S рРНК, специфичных для 1-й, 4-й и 6-й подгрупп в Черном море, а также 1-й, 5-й и 6-й подгрупп в Балтийском море. Интересно, что участков гена 16S рРНК черноморских представителей рода *Desulfobacter* в биомассе из нижних зон хемоклина, сконцентрированной на мелкопористых фильтрах, найдено не было. Это может свидетельствовать о том, что клетки *Desulfobacter* spp. обитают в зоне хемоклина исключительно в составе взвешенных частиц.

Из кислородсодержащих вод Черного моря (глубины 30, 70 и 157 м) и Гданьской впадины Балтийского моря (глубина 30 м) были получены активные накопительные культуры СРБ. Структура сообщества СРБ в накопительных культурах существенно отличалась от таковой в нативных водных пробах. Так, черноморские накопительные культуры из аэробной зоны содержали в основном клетки *Desulfomicrobium* spp., а в культурах, полученных из зоны хемоклина, преобладали представители родов *Desulfovibrio* и *Desulfotomaculum* (рис. 1, б).

Наиболее активный рост наблюдался в накопительной культуре из Черного моря с глубины 70 м, полученной при добавлении в основную среду Видделя $K_2Cr_2O_7$ (10 мкМ). По результатам рестрикционного анализа клонированных участков гена 16S рРНК этой культуры из 57 образцов библиотеки были отобраны две группы (рис. 2): с одним сайтом рестрикции для *Hae*III (12 клонов) и без него (45 клонов). Результаты секвенирования трех случайных образцов из обеих групп показали, что накопительная культура состоит из СРБ, наиболее

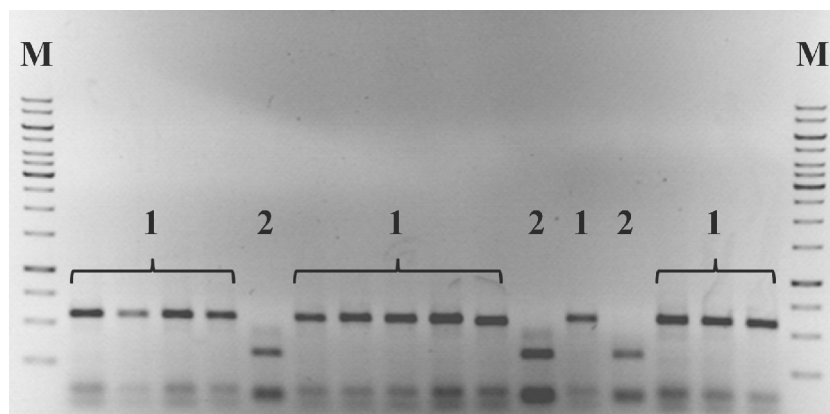


Рис. 2. Рестрикционный анализ участков гена 16S рНК из накопительной культуры черноморских СРБ, полученной из водной пробы с глубины 70 м. Дорожки: 1 — участки, не содержащие сайт рестрикции для *HaeIII* (*Desulfosporosinus* sp.); 2 — участки с одним сайтом рестрикции для *HaeIII* (*Vibrio* sp.); М — ДНК-маркер GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas, Литва)

близких по нуклеотидной гомологии (97%) к *Desulfosporosinus* sp. 159 (AF295659), а также из гетеротрофных бактерий *Vibrio* sp. B234 (FN295777). Обнаружение в Черном море клеток *Desulfosporosinus* spp. является интересным фактом в исследовании сообществ морских СРБ, поскольку к этому роду относят спорообразующие клетки, выделенные из пресноводных осадков, осадков кислых сточных водоемов горнодобывающей промышленности и различных почв.

Полученные данные по определению сульфат-редуцирующих бактерий с помощью FISH и ПЦР в сочетании с выделением из кислородсодержащих водных горизонтов активных накопительных культур свидетельствуют о том, что распространение СРБ в Черном и Балтийском морях не ограничивается глубинными анаэробными водами и донными осадками, как полагали ранее. Филогенетический состав сообществ СРБ кислородсодержащих вод континентального склона Черного моря и Гданьской впадины Балтийского моря в целом достаточно схож. В верхних аэробных водах обнаружены СРБ родов *Desulfotomaculum* и *Desulfo-*

vibrio. В зоне хемоклина были определены в основном *Desulfomicrobium* spp. и *Desulfovibrio* spp. Неоднородное распределение по глубине кислородсодержащей водной толщи Черного и Балтийского морей различных филогенетических подгрупп СРБ, вероятно, обусловлено наличием на соответствующих горизонтах взвешенных органических частиц (панцирей диатомовых водорослей, пеллетного материала и т.д.), внутри которых возможно формирование анаэробных микрозон, оптимальных для развития СРБ.

Авторы благодарят к.г.н. В.К. Часовникова и к.г.-м.н. В.В. Сивкова из ЮО и АО Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН за организацию морских экспедиций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 10-04-00220-а, 10-04-10005-к, 11-04-10005-к) и программы Carl Zeiss для молодых ученых ведущих вузов России.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murray J.W., Jannash H.W., Honjo S., Anderson R.F., Reeburgh W.S., Top Z., Friederich G.E., Codispoti L.A., Izdar E. Unexpected changes in the oxic/anoxic interface in the Black Sea // *Nature*. 1989. Vol. 338. N 6214. P. 411–413.
2. Bryukhanov A.L., Korneeva V.A., Kanapatskii T.A., Zakharova E.E., Men'ko E.V., Rusanov I.I., Pimenov N.V. Investigation of the sulfate-reducing bacterial community in the aerobic water and chemocline zone of the Black Sea by the FISH technique // *Microbiology*. 2011. Vol. 80. N 1. P. 108–116.
3. Kot-Wasik A., Zukowska B., Dąbrowska D., Dębska J., Pacyna J., Namieśnik J. Physical, chemical, and biological changes in the Gulf of Gdańsk ecosystem (southern Baltic Sea) // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2003. Vol. 179. N 1. P. 1–36.
4. Pimenov N.V., Rusanov I.I., Yusupov S.K., Fridrich J., Lein A.Yu., Wehrli B., Ivanov M.V. Microbial processes at the aerobic-anaerobic interface in the deep-water zone of the Black Sea // *Microbiology*. 2000. Vol. 69. N 4. P. 527–540.
5. Brioukhanov A., Pieulle L., Dolla A. Antioxidative defense systems of anaerobic sulfate-reducing microorganisms // *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Vol. 1. Microbiology book series / Ed. by A. Méndez-Vilas. Badajoz: Formatex Research Center, 2010. P. 148–159.
6. de Rezende J.R., Kjeldsen K.U., Hubert C.R., Finster K., Loy A., Jørgensen B.B. Dispersal of thermophilic *Desulfotomaculum* endospores into Baltic Sea sediments over thousands of years // *ISME J.* 2013. Vol. 7. N 1. P. 72–84.
7. Daly K., Sharp R.J., McCarthy A.J. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria // *Microbiology-SGM*. 2000. Vol. 146. N 7. P. 1693–1705.
8. Amann R.I., Zarda B., Stahl D.A., Schleifer K.H. Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes // *Appl. Environ. Microbiol.* 1992. Vol. 58. N 9. P. 3007–3011.

9. Devereux R., Kane M.D., Winfrey J., Stahl D.A. Genus- and group-specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria // Syst. Appl. Microbiol. 1992. Vol. 15. N 4. P. 601–609.
10. Hristova K.R., Mau M., Zheng D., Aminov R.I., Mackie R.I., Gaskins H.R., Raskin L. *Desulfotomaculum* genus- and subgenus-specific 16S rRNA hybridization probes for environmental studies // Environ. Microbiol. 2000. Vol. 2. N 2. P. 143–159.
11. Lückner S., Steger D., Kjeldsen K.U., MacGregor B.J., Wagner M., Loy A. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence *in situ* hybridization // J. Microbiol. Meth. 2007. Vol. 69. N 3. P. 523–528.
12. Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 17. N 19. P. 7843–7853.
13. Geets J., Borremans B., Diels L., Springael D., Vangronsveld J., van der Lelie D., Vanbroekhoven K. *DsrB* gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria // J. Microbiol. Meth. 2006. Vol. 66. N 2. P. 194–205.
14. Widdel F., Back F. The genus *Desulfotomaculum* // The Prokaryotes. 3rd ed. Vol. 4 / Ed. by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer, E. Stackebrandt. N.Y.: Springer, 1992. P. 787–794.
15. Trüper H.G., Schlegel H.G. Sulfur metabolism in Thiorhodaceae. I. Quantitative measurements on growing cells of *Chromatium okenii* // Antonie van Leeuwenhoek. 1964. Vol. 30. N 1. P. 225–238.
16. Muyzer G., Brinkhoff T., Nübel U., Santegoeds C., Schäfer H., Wawer C. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology // Molecular microbial ecology manual / Ed. by A.D.L. Akkermans, J.D. van Elsas, F.J. de Bruijn. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997. P. 1–23.
17. Vetriani C., Tran H.V., Kerkhof L.J. Fingerprinting microbial assemblages from the oxic/anoxic chemocline of the Black Sea // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. N 11. P. 6481–6488.
18. Neretin L.N., Abed R.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M. Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column // Environ. Microbiol. 2007. Vol. 9. N 12. P. 3019–3024.

Поступила в редакцию
28.10.14

DETECTION OF ANAEROBIC SULFATE-REDUCING BACTERIA IN OXYGEN-CONTAINING UPPER WATER LAYERS OF THE BLACK AND BALTIC SEAS

A.L. Bryukhanov, V.A. Korneeva, N.V. Pimenov

Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and PCR were used for analysis of the phylogenetic structure of anaerobic sulfate-reducing bacterial communities in oxygen-containing upper water layers of meromictic basins — the Black Sea and the Gdańsk Deep of the Baltic Sea. In the Black Sea (continental slope at depths 30–70 m), cells of sulfate-reducing bacteria (SRB) hybridizing with 16S rRNA-specific FISH-probes for *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter* and *Desulfovibrio* genera were revealed, whereas *Desulfomicrobium*-related bacteria were prevalent in the chemocline zone at 150-m depth. Besides of *Desulfotomaculum* (SRB subgroup 1), *Desulfobacter* (SRB subgroup 4) and *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* (SRB subgroup 6), nested PCR with the use of 16S rRNA gene-specific primers detected the presence of *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* (SRB subgroup 5) in oxygen-containing water column of the Black and Baltic seas. Active enrichment SRB culture which contained bacterium *Desulfosporosinus* sp. as a major component was obtained from the Black Sea water sample collected at 70-m depth.

Key words: sulfate-reducing bacteria, *Desulfosporosinus*, fluorescent *in situ* hybridization, nested PCR, meromictic basin, Black Sea, Gdańsk Deep of the Baltic Sea.

Сведения об авторах

Брюханов Андрей Леонидович — канд. биол. наук, доц., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: brjuchanov@mail.ru

Корнеева Валерия Алексеевна — науч. сотр., аспирант кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-23; e-mail: busenica@yandex.ru

Пименов Николай Викторович — докт. биол. наук, зам. дир. института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, проф. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-135-31-75; e-mail: npimenov@mail.ru

МЕТОДЫ

УДК 577.214

РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ МОНОНУКЛЕОСОМ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ТРАНСКРИПЦИИ МЕТОДОМ
МИКРОСКОПИИ ОДИНОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ**К.С. Кудряшова^{1,3}, Д.В. Никитин³, О.В. Чертков^{1,3}, Н.С. Герасимова³,
М.Е. Валиева³, В.М. Студитский^{2,3}, А.В. Феофанов^{1,3}**¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва;² Программа эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, США (Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA); ³ кафедра биоинженерии; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Флуоресцентная микроскопия одиночных молекул и комплексов становится все более востребованным методом изучения нуклеосом и функционально важных процессов с их участием. В данной работе на основе флуоресцентно-меченой матрицы ДНК разработаны строго позиционированные мононуклеосомы, которые являются новым инструментом для исследования структурных перестроек в хроматине в процессе транскрипции РНК-полимеразой (РНКП). В нетранскрибируемую цепь ДНК были введены два флуорофора — Су3 (донор) и Су5 (акцептор), которые после укладки ДНК на гистоновом октамере оказываются в средней части нуклеосомы на соседних участках ДНК на расстоянии менее 60 Å и взаимодействуют по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET). Изменение структуры нуклеосомы регистрировали по изменению эффективности FRET при изучении одиночных комплексов нуклеосом с РНКП методом флуоресцентной микроскопии. Показано, что введение меток не повлияло на способность РНКП транскрибировать нуклеосомы. Получены и охарактеризованы открытый комплекс с РНКП, а также элонгационные комплексы, остановленные в положениях –39 и –5 до границы нуклеосомы. Показано, что после завершения транскрипции более 80% нуклеосом сохраняют свою структуру, восстанавливая исходную укладку ДНК на гистоновом октамере. Разработанная экспериментальная система открывает новые возможности изучения структуры нуклеосом и модулирующего воздействия на них различных белковых шаперонов и ремоделирующих хроматин комплексов.

Ключевые слова: нуклеосома, РНК-полимераза, флуоресценция, микроскопия, эпигенетика.

Жизненно необходимый для нормального функционирования любого организма процесс транскрипции включает в себя четыре стадии: связывание с промотором, инициацию, элонгацию и терминацию. Стадия элонгации — сложный, мало изученный биологический процесс, который сопровождается множественными структурными перестройками хроматина. Изучение этих перестроек важно для понимания механизма элонгации и, как показано, может осуществляться с использованием модельной системы на основе мононуклеосом, сформированных из октамера гистонов (H2A, H2B, H3, H4) и короткой ДНК-матрицы 603 [1–6]. Для инициации транскрипции бактериальной РНК-полимеразы (РНКП) в ДНК матрицу включают промотор T7A1 и последовательность из 50 нуклеотидов между промотором и нуклеосомой, необходимую для формирования стабильного элонгационного комплекса [6].

Последние достижения в области флуоресцентной микроскопии позволяют дополнить биохимические и молекулярно-биологические подходы к изучению транскрипции нуклеосом новыми методиками флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и их комплексов на основе Фёрстеров-

ского резонансного переноса энергии (сокращенно spFRET-микроскопии) [7, 8]. Для этого в соседние сверхспиральные витки ДНК можно ввести пару флуорофоров, например донор Су3 и акцептор Су5, и по эффективности FRET, которая существенно зависит от расстояния между ними в диапазоне 3–9 нм, изучать изменения структуры нуклеосом. spFRET-микроскопия позволяет обнаруживать и характеризовать отдельно отличающиеся по структуре субпопуляции нуклеосом и их комплексов в составе гетерогенных образцов.

В настоящей статье описана разработка транскрибируемых флуоресцентно-меченых нуклеосом, которые являются новым инструментом для изучения методом spFRET-микроскопии структурных перестроек ДНК, происходящих при транскрипции центральной части ДНК нуклеосом.

Материалы и методы

В работе использовали набор для экстракции ДНК из агарозного геля фирмы “Omega Bio-Tek” (США), ферменты рестрикции, ДНК-лигазу бактериофага T4, Taq ДНК-полимеразу и соответству-

ющие буферные растворы фирмы “New England Biolabs” (США). РНКП выделяли из клеток *Escherichia coli*, следуя методике, представленной в [9]. Транскрипционный буфер (ТВ) включал в себя 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и KCl в указанных в тексте концентрациях.

Нуклеосомную ДНК получали при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием следующих флуоресцентно-меченых ДНК-праймеров: Mid_Fw 5' — AGCGACACCGGCACTGGGCCCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCGGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCT*T (где T* — нуклеотид, меченный Cy3), Mid_Rev 5' — ACCCCAGGGACTT*GAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTCAACATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGA (где T* — нуклеотид, меченный Cy5). Промоторную и (Cy3, Cy5)-меченую нуклеосомную ДНК инкубировали с ферментом TspRI в буфере NEB4 в течение 3 ч при 65°C. Полученные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически (4–6 В/см, 2 ч) в 1,5%-м агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE (44,5 мМ Tris, 44,5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) с добавкой 4 М мочевины и 0,5 мг/мл бромистого этидия. Лигирование 1–2 мкг очищенного промоторного и (Cy3, Cy5)-меченого нуклеосомного фрагментов ДНК осуществляли в молярном соотношении фрагментов 1,15:1 в буфере для ДНК-лигазы (15 ч, 16°C). Разделение продукта и не прошедших лигирования фрагментов проводили в 1,8%-м агарозном геле в 0,5-кратном буфере TBE, содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия при 4–6 В/см в течение 2 ч. Выделение ДНК на каждой стадии осуществляли с помощью набора для экстракции ДНК из геля, следуя инструкциям производителя. Концентрацию ДНК определяли по оптической плотности раствора при длине волны 260 нм.

В качестве источника гистонов для сборки нуклеосом использовали хроматин без гистона H1, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [5]. Нуклеосомы собирали на (Cy3, Cy5)-меченой ДНК-матрице в ходе диализа против уменьшающейся концентрации NaCl по протоколу, описанному в работе [5].

Для формирования открытого комплекса (ОС) 200 нг матричной ДНК в свободной форме либо в форме нуклеосом инкубировали (37°C, 10 мин) с пятикратным молярным избытком РНКП в 20 мкл буфера ТВ, содержащего 40 мМ KCl. Для формирования элонгационного комплекса ЕС-39, остановленного в положении –39 (39 пар нуклеотидов (п.н.) до границы нуклеосомы со стороны промотора), ОС инкубировали (37°C, 10 мин) с РНК-праймером ApUpC (20 мМ), АТФ (20 мМ) и ГТФ (20 мМ). Для получения элонгационного комплекса ЕС-5, остановленного в положении –5 (5 п.н. до границы нуклеосомы со стороны промотора), ЕС-39 инкубировали (37°C, 10 мин) с 5 мМ

ЦТФ, 20 мг/мл рифампицина и 0,5 мг/мл ацетилированного бычьего сывороточного альбумина.

Для завершения полного цикла транскрипции и формирования пост-транскрипционного состояния РС (post chase) к ЕС-5 добавляли полный набор нуклеотидтрифосфатов (до конечной концентрации 100 мМ), повышали концентрацию KCl до 150 мМ и инкубировали 10 мин при комнатной температуре.

Для измерений методом spFRET-микроскопии нуклеосомы и их комплексы с РНКП разбавляли до концентрации 0,2 нМ в ТВ-буфере с добавкой 150 мМ KCl и 0,1% полиэтиленгликоля (380–420 Да). Измерения выполняли с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710-Confocor3 (Zeiss, Германия) с 40-кратным водоиммерсионным объективом C-Apochromat (числовая апертура 1,2) в 8 луночных камерах на покровном стекле Lab-Tek (Thermo Scientific, США). Флуоресценцию возбуждали Ar⁺-ионным лазером (514,5 нм, 2 мВт под объективом) и регистрировали с помощью лавинных фотодиодов в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5). Диаметр конфокальной диафрагмы был равен 1 диску Эйри. Для каждого образца зависимости интенсивности флуоресценции от времени измеряли в течение 10 мин с константой интегрирования 5 мс. В анализ включали нуклеосомы с интенсивностью сигнала $I_3 = 10 \div 80$ кГц и $I_5 = 5 \div 80$ кГц, где I_3 и I_5 — это интенсивности сигналов Cy3 и Cy5. I_3 и I_5 корректировали на величину фона равную соответственно 1,0 и 0,5 кГц. Интенсивности флуоресценции Cy3 и Cy5, измеренные для каждой нуклеосомы, пересчитывали в эффективность FRET (E) согласно уравнению:

$$E = (I_5 - 0,19 \times I_3) / (I_5 + 0,81 \times I_3), \quad (1)$$

где коэффициенты 0,19 и 0,81 введены для учета частичного перекрытия спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм. Набор значений E графически представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины E и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Все измерения были повторены не менее чем в трех независимых экспериментах. Итоговый размер выборки составлял не менее 7000 частиц.

Результаты и обсуждение

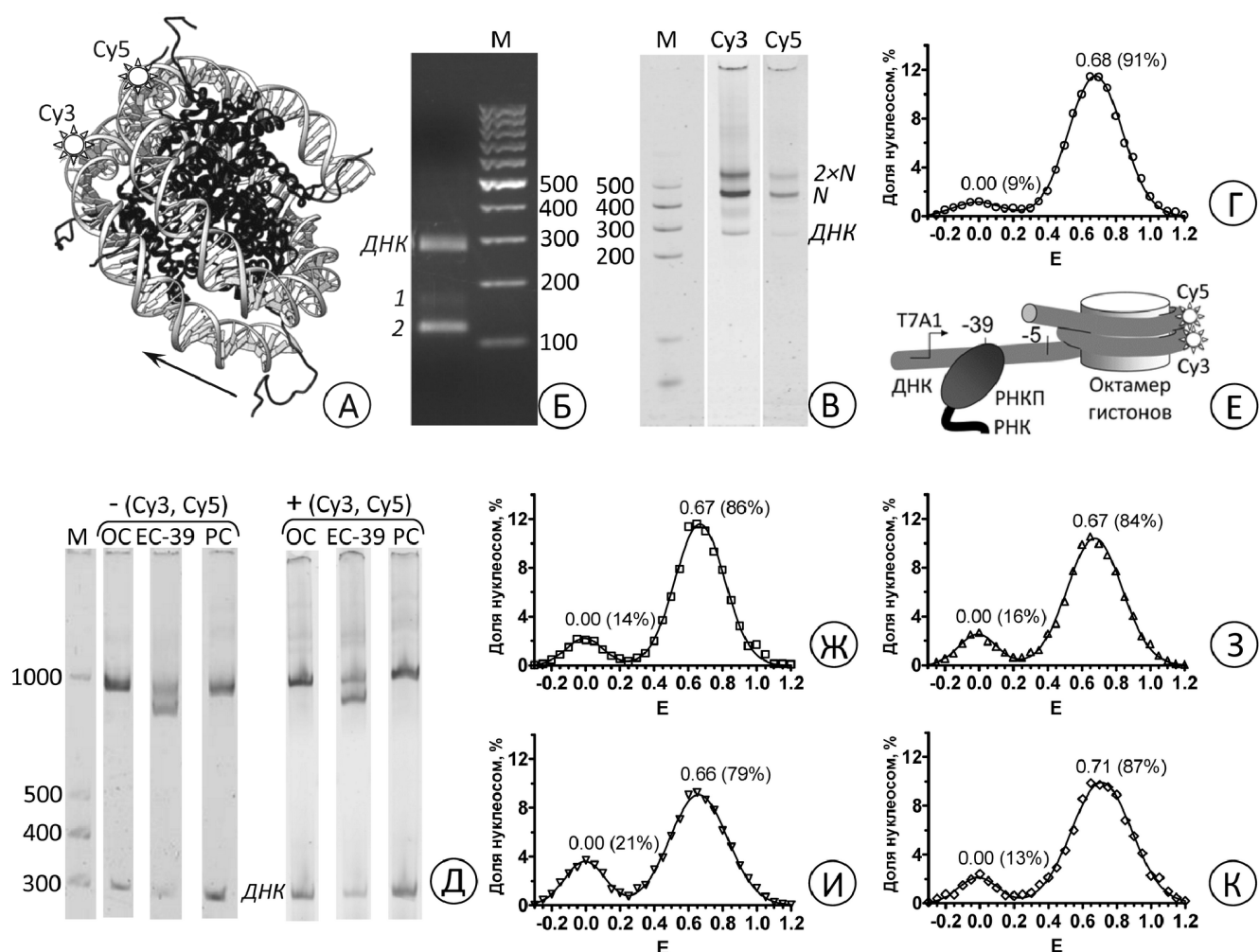
Для сборки нуклеосом использовали ДНК-матрицу 603, которая обеспечивает строгое позиционирование ДНК на гистоновом октамере. Флуоресцентные метки Cy3 и Cy5 вводили в не-транскрибируемую цепь ДНК так, чтобы обеспечить возможность изучения структурных перестроек в центральной части нуклеосомы. Используя данные о структуре нуклеосомы (pdb 1EQZ), для мечення выбрали остатки тимина в положениях +35 и +135 от ближней к промотору границы нуклеосомы, расположенные на соседних сверхспираль-

ных витках ДНК на расстоянии менее 60 Å и фосфатные группы которых ориентированы в сторону раствора (рисунок, А). Такой выбор призван исключить стерические напряжения в структуре нуклеосомы, связанные с введением меток, обеспечить конформационную подвижность Cy3 и Cy5 в растворе (важно для упрощения расчета E) и высокую эффективность FRET с участием этих флуорофоров.

Разработанная нами методика получения флуоресцентно-меченой ДНК с помощью ПЦР позволяет нарабатывать значительные количества (5–10 мкг) нуклеосомной матрицы и промоторной части в течение нескольких часов. Реакция лигирования представляет собой ключевую стадию сборки, на которой происходят основные потери

из-за образования конкатемеров и неполного прохождения реакции. Для оптимизации этой стадии мы использовали высокоактивную ДНК-лигазу фага T4 (30 ед./мкл; Fermentas, Литва), а реакцию проводили в течение 15 ч. Выход очищенной флуоресцентно-меченой матрицы после лигирования составил 20–40% (рисунок, Б).

Посадку октамера гистонов на (Cy3, Cy5)-меченую ДНК-матрицу выполняли в ходе диализа против буферов с понижающейся ионной силой (1 М, 0,75 М, 0,5 М и 10 мМ NaCl). В качестве донора гистонов использовали хроматин без гистона Н1, выделенный из эритроцитов цыплят, взятый в пятикратном весовом избытке относительно ДНК-матрицы. Эффективность сборки нуклеосом на основе (Cy3, Cy5)-меченой ДНК достигала



А — структура нуклеосомы и выбранные положения меток Cy3 и Cy5 в центральной части нуклеосомы. Стрелкой указано направление транскрипции. Гистоны показаны черным цветом. Б — результат лигирования (ДНК) нуклеосомного (1) и промоторного (2) фрагментов матрицы ДНК. Электрофорез в 1,5%-м агарозном геле. Окраска бромистым этидием. М — маркеры ДНК (п.о.). В — результат реконструкции (Cy3, Cy5)-меченых нуклеосом. Электрофорез в 4%-м нативном ПААГ. Дорожки Cy3, Cy5 — распределение флуоресценции меток в составе свободной ДНК-матрицы (ДНК), моно- (N) и ди- (2N) нуклеосом, сформированных на этой матрице. Г, Ж–К — частотные распределения нуклеосом (Г), ОС (Ж), ЕС-39 (З), ЕС-5 (И) и РС (К) по величине E и их аппроксимация суммой двух Гауссовых полос. Рядом со значениями максимумов пиков в скобках указан процент нуклеосом, соответствующий каждому пику (каждой субпопуляции нуклеосом или ДНК). Распределения нуклеосом измерены методом spFRET-микроскопии. Д — сравнительный анализ формирования комплексов ОС, ЕС-39 между РНКП и ДНК-матрицей (меченой +(Cy3, Cy5) и немеченой –(Cy3, Cy5)), а также результатов полной транскрипции ДНК (РС). Электрофорез в 4%-м нативном ПААГ. Окраска бромистым этидием

80–90%, подтверждая, что введение меток не мешает формированию нуклеосом (рисунок, В). Отметим, что из-за значительной длины ДНК-матрицы, содержащей промотор, помимо основной фракции мононуклеосом могут образовываться динуклеосомы (рисунок, В). Вторая нуклеосома собирается на участке ДНК, содержащем промотор, в результате чего динуклеосомы не формируют инициаторных комплексов с РНКП. Выделение мононуклеосом из 4,5% ПААГ позволяет получить образец, полностью отвечающий требованиям экспериментов с РНКП.

Измерения одиночных нуклеосом (и их комплексов) проводили в разбавленных растворах методом двухканальной лазерной конфокальной микроскопии. Нуклеосомы, свободно диффундируя в растворе, проходили через фокус лазерного луча, где от каждой из них измерялись интенсивности I_3 и I_5 , необходимые для расчета величины FRET. Флуоресценция нуклеосом вне фокуса луча либо не возбуждалась, либо блокировалась конфокальной схемой фильтрации сигнала. В каждый момент времени в фокусе луча находилось не более одной нуклеосомы. Основное преимущество данной методики измерений перед традиционным измерением средней величины FRET от нуклеосом в растворе — это возможность выявить субпопуляции нуклеосом, отличающихся по величине FRET (т.е. по структуре нуклеосомной ДНК), и охарактеризовать их.

Исследование сконструированных нами (Cu3, Cu5)-меченых нуклеосом выявило наличие двух субпопуляций: основной (91% нуклеосом) с $E = 0,68$ и минорной (9%) с $E = 0$ (рисунок, Г). Минорная фракция соответствует ДНК, появляющейся в результате диссоциации части нуклеосом в разбавленных растворах. Основная фракция — это нуклеосомы. Большая величина E подтверждает правильность выбора положения меток Cu3 и Cu5, а доминирование таких нуклеосом свидетельствует о высокой стабильности образца в условиях spFRET-анализа.

Согласно данным электрофореза РНКП эффективно связывается с промоторным участком (Cu3, Cu5)-меченой матрицы ДНК, образуя ОС (рисунок, Д). Добавка РНК-прайма ArUpC совместно с АТФ и ГТФ к открытому комплексу перемещает РНКП на 11 нуклеотидов и формирует элонгационный комплекс ЕС-39. Электрофоретическая подвижность ЕС-39 заметно отличается от ОС (рисунок, Д). Внесение в реакционную смесь полного набора нуклеотидов иницирует транскрип-

цию (Cu3, Cu5)-меченой ДНК, которая, как и в контроле, завершается диссоциацией РНКП с образованием свободной ДНК (состояние РС, рисунок, Д). Этот результат подтверждает, что введение меток в ДНК не препятствует транскрипции.

Исследование нуклеосом методом spFRET-микроскопии показывает, что формирование ОС и ЕС-39 не приводит к изменениям в укладке ДНК на октамере гистонов в центральной части нуклеосомы (рисунок, Ж и З). Этот результат согласуется с тем, что РНКП в ОС и ЕС-39 находится далеко от нуклеосомы и не влияет на ее структуру. Нуклеотидная последовательность ДНК-матрицы позволяет также сформировать элонгационный комплекс ЕС-5, остановленный в положении –5 нуклеотидов до входа в нуклеосому (рисунок, И). Несмотря на ожидаемые стерические контакты между РНКП и нуклеосомой в комплексе ЕС-5, структура ДНК в центральной части нуклеосомы не изменяется. Следовательно, вплоть до положения –5 РНКП не вызывает масштабной диссоциации ДНК от октамера гистонов, и эта абсолютно необходимая для транскрипции перестройка нуклеосомы происходит на более поздних этапах. Небольшое увеличение содержания свободной ДНК ($E = 0$, рисунок, Ж–И) вызвано дополнительными манипуляциями с нуклеосомами в процессе приготовления и (или) очистки комплексов с РНКП. Анализ нуклеосом в состоянии РС показывает, что после завершения транскрипции доминирующая часть нуклеосом полностью восстанавливает свою исходную структуру (рисунок, К). Таким образом, результаты spFRET-анализа однозначно подтверждают более ранние данные биохимических исследований о том, что транскрипция бактериальной РНКП происходит без потери гистонов H3/H4, связанных с центральным участком нуклеосомной ДНК [10, 11].

Применение разработанной нами экспериментальной системы на основе транскрибируемых флуоресцентно-меченых нуклеосом и современных методик spFRET-микроскопии позволит существенно дополнить данные о структурных перестройках в нуклеосоме, происходящих при транскрипции РНК-полимеразой. Данный экспериментальный подход открывает широкие возможности изучения структуры элонгационных комплексов и модулирующего воздействия на них различных белковых шаперонов и ремоделеров.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
2. Chang H.W., Kulaeva O.I., Shaytan A.K., Kibanov M., Kuznedelov K., Severinov K.V., Kirpichnikov M.P., Clark D.J.,

Studitsky V.M. Analysis of the mechanism of nucleosome survival during transcription // *Nucleic Acids Res.* 2014. Vol. 42. N 3. P. 1619–1627.

3. Chang H.W., Shaytan A.K., Hsieh F.-K., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. Structural analysis of the

key intermediate formed during transcription through a nucleosome // *Trends Cell. Mol. Biol.* 2013. Vol. 8. P. 13–23.

4. *Walter W., Studitsky V.M.* Construction, analysis, and transcription of model nucleosomal templates // *Methods*. 2004. Vol. 33. N 1. P. 18–24.

5. *Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M.* Preparation and analysis of uniquely positioned mononucleosomes // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 523. P. 109–123.

6. *Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Pestov N.A., Hsieh F.K., Studitsky V.M.* Experimental analysis of the mechanism of chromatin remodeling by RNA polymerase II // *Methods Enzymol.* 2012. Vol. 512. P. 293–314.

7. *Buning R., van Noort J.* Single-pair FRET experiments on nucleosome conformational dynamics // *Biochimie*. 2010. Vol. 92. N 12. P. 1729–1740.

8. *Choy J.S., Lee T.H.* Structural dynamics of nucleosomes at single-molecule resolution // *Trends Biochem. Sci.* 2012. Vol. 37. N 10. P. 425–435.

9. *Walter W., Kireeva M.L., Tchernajenko V., Kashlev M., Studitsky V.M.* Assay of the fate of the nucleosome during transcription by RNA polymerase II // *Methods Enzymol.* 2003. Vol. 371. P. 564–577.

10. *Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M.* Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.

11. *Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M.* Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell*. 2002. Vol. 9. N 3. P. 541–552.

Поступила в редакцию
26.03.15

DEVELOPMENT OF FLUORESCENTLY LABELLED MONONUCLEOSOMES TO STUDY TRANSCRIPTION MECHANISMS BY METHOD OF MICROSCOPY OF SINGLE COMPLEXES

K.S. Kudryashova, D.V. Nikitin, O.V. Chertkov, N.S. Gerasimova, M.E. Valieva, V.M. Studitsky, A.V. Feofanov

Fluorescence microscopy of single molecules and complexes is becoming increasingly popular method to study nucleosomes and functionally important processes with their participation. In this work we report on the development of positioned mononucleosomes on the basis of fluorescently labeled DNA matrix, which are a new tool for investigation of structural rearrangements in chromatin during transcription by RNA polymerase (RNAP). Two fluorophores, Cy3 (donor) and Cy5 (acceptor), were introduced in a non-transcribed DNA chain. After DNA packing on histone core they are positioned in the middle part of a nucleosome in the neighboring supercoils at a distance of less than 60 Å and interact by the mechanism of Förster resonance energy transfer (FRET). Changes in the nucleosome structure were monitored by changes in FRET efficiency in the study of single complexes of nucleosomes with RNAP by fluorescence microscopy. It is shown that introduction of labels did not affect the ability of RNAP to transcribe nucleosomes. Open complex with RNAP as well as elongation complexes stalled at positions –39 and –5 before the nucleosome boundary were prepared and characterized. It is shown that more than 80% of histones maintain their structure, restoring the original packing of DNA on the histone core after transcription completion. A new experimental system offers new possibilities for the study of a structure of nucleosomes and modulating effects of various protein chaperones and remodelers on them.

Key words: *nucleosome, RNA polymerase, fluorescence, microscopy, epigenetics.*

Сведения об авторах

Кудряшова Ксения Сергеевна — мл. науч. сотр. ИБХ РАН, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: rekamoskva@mail.ru

Никитин Дмитрий Валерьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: dvnikit@yandex.ru

Чертков Олег Валерьевич — вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: o_chertkov@mail.ru

Герасимова Надежда Сергеевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Валиева Мария Евгеньевна — студентка биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: durnopreyko-maria@rambler.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-926-215-05-01; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

МЕТОДЫ

УДК 578.22

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА СФЕРИЧЕСКИХ ЧАСТИЦ — НОВЫХ БИОГЕННЫХ ПЛАТФОРМ

Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, М.П. Кирпичников, О.В. Карпова, И.Г. Атабеков*(кафедра вирусологии; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru)*

Создана и отработана методика получения в препаративных количествах сферических частиц из палочковидного фитовируса — вируса табачной мозаики. Подобраны условия выделения и очистки вируса, необходимые для получения сферических частиц. Сферические частицы охарактеризованы с помощью методов электронной микроскопии, анализа траекторий наночастиц, динамического рассеяния света. Получены сведения о внутренней структуре сферических частиц. Продемонстрировано, что они обладают высокой электронной плотностью. Анализ ультратонких срезов показал, что сферические частицы не содержат внутренних полостей и являются внутри однородными.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус табачной мозаики, сферические частицы.

Вирусы растений и их вирусоподобные частицы применяют в различных областях биотехнологии: разработка вакцин и адъювантов, создание биологически активных комплексов, разработка контрастирующих агентов, адресная доставка, микроэлектроника [1–12]. Важное преимущество фитовирусов состоит в том, что они непатогенны для человека [1]. Ранее было показано, что при нагревании палочковидных вирионов вируса табачной мозаики (ВТМ) до 94°C происходит структурная перестройка вирусного белка оболочки (БО) и формируются сферические частицы (СЧ) контролируемого размера. СЧ обладают высокой стабильностью, не содержат РНК, биодegradируемы [11–12]. Продемонстрированы уникальные адсорбционные свойства СЧ, на их основе созданы комплексы как с различными белками, так и с икосаэдрическими вирионами [2–4]. Установлено, что СЧ являются эффективным адъювантом и активно стимулируют иммунный ответ на белки и вирусные частицы, адсорбированные на их поверхности [2, 4]. Для проведения термической перестройки вирионов ВТМ в СЧ ранее использовался термоциклер, позволяющий получать СЧ в аналитических количествах [11]. Для доклинических исследований медицинских препаратов на основе СЧ необходимо было масштабировать методику. Ранее была предпринята попытка получения СЧ в большом количестве с помощью проточной системы (100°C, 125 сек). Данная технология позволила увеличить количество получаемых СЧ до 60 мг/ч [13].

Материалы и методы

Для выделения ВТМ штамма U1 (коллекция кафедры вирусологии МГУ) замороженные листья (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun*) гомогенизировали в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,8, содержащем

0,02 М ЭДТА (Gerbu, Германия) и 0,1% β-меркаптоэтанола (Serva, Германия) в соотношении 2 мл буфера на 1 г листьев. Сок растений осветляли (10 000g, 20 мин, 4°C), добавляли хлороформ (Химмед, Россия) в соотношении 1:6 и встряхивали полученную смесь (10 мин), центрифугировали (15 мин, 10 000g, 4°C). Водную фазу отбирали и к ней добавляли полиэтиленгликоль (Mg 6000) (Gerbu, Германия) до концентрации 2% и NaCl (MP Biomedicals, США) до концентрации 1%, раствор инкубировали (12 ч, 4°C). Осадок вируса отделяли центрифугированием (10 000 g, 20 мин, 4°C). В течение 2–3 ч вирус экстрагировали из полученного осадка в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8 (MP Biomedicals, США) при постоянном перемешивании (4°C). Экстракт осветляли центрифугированием (20 мин, 10 000g, 4°C). Дальнейшую очистку вируса проводили с помощью двух циклов дифференциального центрифугирования. При первом цикле осветленный экстракт центрифугировали с использованием 20%-й сахарозной подушки (100 000g, 120 мин) (сахароза фирмы “Helicon”, Россия), приготовленной на 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8. Осадки растворяли в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8 (12 ч, 4°C). При втором цикле препарат центрифугировали без сахарозной подушки (100 000g, 90 мин). Вирусный осадок растворяли в 0,01 М трис-НСl буфере pH 7,8. Концентрацию вируса определяли спектрофотометрически ($E_{260nm}^{0,1\%} = 3,0$, $OD_{260}/OD_{280} = 1,2$). Вирусный препарат хранили при 4°C в течение года, для длительного хранения препараты замораживали при –70°C.

Для получения СЧ препарат ВТМ (1 мл) помещали в стандартные 1,5 мл полипропиленовые пробирки (Sarstedt, Германия), после чего пробирки переносили в нагретый до 94°C термостат Термит

(ДНК-Технология, Россия) и инкубировали в течение 3–7 мин. Количество ячеек в приборе — 40.

Приготовление образцов для электронной микроскопии (ЭМ) и ультратонких срезов проводили согласно ранее описанным методикам [11, 14]. Препараты исследовали с помощью электронных микроскопов JEM-1011 (JEOL, Япония) и LEO-912AB (LEO, Германия). Микрофотографии были проанализированы с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

Для метода динамического рассеяния света (ДРС) измерения образцов проводили на установке Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Dispersion Technology Software version 5.10.

Измерения размеров СЧ с помощью метода анализа траекторий наночастиц (АТН) проводили с использованием прибора NanoSight NS500 и программного обеспечения NanoSight NTA 2.3 (NanoSight, Великобритания) согласно стандарту [15].

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что при нагревании препарата ВТМ до 94°C происходит структурная перестройка БО палочковидных вирионов в СЧ [11]. Разработанная методика позволяла получать СЧ в достаточных количествах для проведения лабораторных исследований. Важно отметить, что при получении СЧ в термоциклере использовались тонкостенные пробирки объемом 0,5 мл (Sarstedt, Германия). Объем пробы составлял 50 мкл. В этом случае прибор обеспечивал равномерное прогревание всего препарата. Технические возможности прибора были ограничены максимальным объемом пробы и количеством ячеек в термоциклере (40). Было продемонстрировано, что из вирусного препарата с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл можно получить СЧ размером 50–160, 100–340, 250–800 нм [11]. Таким образом, за один цикл

работы можно было получить 0,2, 2 и 20 мг СЧ соответствующего размера. Для получения СЧ в препаративных количествах для доклинических испытаний вакцинного препарата, созданного на основе сферических частиц, методика была модифицирована. Термообработку препарата вируса проводили в стандартных полипропиленовых пробирках (1,5 мл) в твердотельном термостате. Объем пробы составлял 1 мл. Использование пробирок с более толстыми стенками и большего объема пробы могло привести к неравномерному прогреву вирусного препарата и неполной структурной перестройке БО ВТМ в СЧ. В данной работе были оптимизированы температурные и временные условия обработки вирусного препарата для получения СЧ, не отличающихся по морфологии от сферических частиц, образующихся в термоциклере, в препаративных количествах. Показано, что помещение вирусного препарата в прогретый до 94°C термостат с последующей инкубацией в течение 7 мин приводит к 100% переходу вирионов ВТМ в СЧ. Уменьшение времени инкубации приводит к неполной перестройке ВТМ в СЧ. Представлены электронные микрофотографии СЧ, полученных при термической обработке препарата ВТМ (94°C, 1 мл) с различной исходной концентрацией (рис. 1). Во всех случаях нативный ВТМ (рис. 1, г) полностью переходил в форму СЧ. С увеличением исходной концентрации вирусного препарата увеличивался размер получаемых СЧ, что согласуется с ранее опубликованными данными [11].

В процессе приготовления образцов для ЭМ может происходить деформация и агрегация препарата на подложке, что иногда приводит к неверной трактовке полученных результатов. В связи с этим данные ЭМ были сопоставлены с результатами методов АТН и ДРС, которые позволили изучить размеры СЧ в жидкости. Приведенные в таблице средние значения диаметра СЧ, измеренные методами ЭМ, ДРС и АТН, были сопоставимы друг с другом. Таким образом, из препаратов

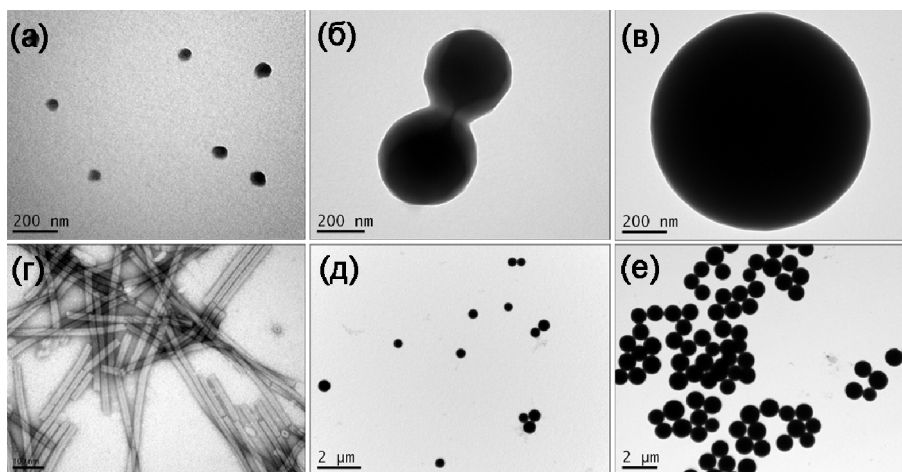


Рис. 1. Сферические частицы, полученные при нагревании в термостате (94°C) препарата вируса табачной мозаики (ВТМ) с исходной концентрацией вируса: 0,1 мг/мл (а); 1 мг/мл (б, д); 10 мг/мл (в, е). Контроль — нативный ВТМ (г). Просвечивающая электронная микроскопия, окрашивание 2%-м уранилацетатом

ВТМ объемом 1 мл с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл при термической обработке можно получить СЧ с диаметром 65–72, 399–500, 1060–1300 нм в количестве 4, 40, 400 мг за один цикл работы прибора (7 мин) соответственно. Изменение условий термической перестройки частиц ВТМ не повлияло на морфологию СЧ и зависимость их размера от исходной концентрации вируса.

Значения среднего диаметра сферических частиц, полученных при соответствующей концентрации вируса. Приведены значения среднего диаметра (нм) $\pm$ стандартное отклонение

Метод	0,1 мг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
ЭМ	65 $\pm$ 16	460 $\pm$ 34	1060 $\pm$ 160
ДРС	65 $\pm$ 7	480 $\pm$ 40	1300 $\pm$ 34
АТН	72 $\pm$ 4	399 $\pm$ 37	1256 $\pm$ 46

По данным АТН количество СЧ в 1 мг, полученных из препарата ВТМ с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл, составило $7,8 \times 10^{12}$, $4,5 \times 10^{10}$ и 5×10^9 соответственно. Эти данные могут оказаться полезными для стандартизации при получении фармацевтических препаратов.

На процесс образования СЧ и полидисперсность полученных препаратов по размерам влияет состав буфера для дифференциального центрифугирования, состав буфера хранения и агрегационное состояние вируса. Наименьшее влияние состав буфера оказывает на получение СЧ из ВТМ с концентрацией 0,1 мг/мл, так как в разбавленном растворе расстояния между отдельными вирионами больше длины индивидуальной вирусной частицы и агрегация вируса минимальна [16]. Наиболее оптимальными буферными системами для получения СЧ, в которых осуществляется очистка вирусного препарата на стадии дифференциального центрифугирования и последующее хранение ВТМ, является раствор трис-НСl pH 7,5–8 и деионизированная вода. При использовании фосфатного буфера возникают сложности с получением СЧ с размером больше 70 нм из вируса с концентрацией больше 0,1 мг/мл. При термической обработке ВТМ с концентрацией от 1 мг/мл, растворенного в фосфатном буфере, или ВТМ, при выделении которого на стадии дифференциального центрифугирования использовался фосфатный буфер,

структурная перестройка вирионов ВТМ проходила не полностью, а препараты СЧ обладали высокой полидисперсностью по размерам. Эти данные согласуются с полученными ранее сведениями о том, что в фосфатном буфере вероятность агрегации вирионов ВТМ выше [17]. По-видимому, буферные растворы на основе трис-НСl создают оптимальные условия для получения неагрегированных препаратов ВТМ. Длительное хранение препарата вируса (2–3 г.) тоже может приводить к изменению агрегационного состояния, что, безусловно, влияет на значение среднего диаметра СЧ, сдвигая его в большую сторону. Сведения об агрегационном состоянии вирусного препарата играют принципиальную роль при получении СЧ, поскольку они позволяют более точно контролировать размеры частиц с помощью изменения концентрации ВТМ.

Ранее было показано, что СЧ обладают более высокой плотностью ($1,43 \text{ г/см}^3$), чем многие спиральные вирусы растений [18–19]. В связи с этим было интересно изучить внутреннюю структуру СЧ с помощью метода ультратонких срезов и ЭМ. Проведен анализ ультратонких срезов СЧ, полученных из нативного препарата ВТМ с исходной концентрацией 0,1, 1 и 10 мг/мл. Представлены данные для СЧ, образующихся из вируса с концентрацией 1 мг/мл (рис. 2, а). Установлено, что СЧ не содержат внутренних полостей и слоев и являются внутри однородными. Далее была исследована электронная плотность частиц в отсутствие контрастирующих агентов. Показано, что как СЧ, полученные из препарата ВТМ с концентрацией 0,1 мг/мл (рис. 2, б), так и сферические частицы, полученные из препарата ВТМ с концентрацией 1 мг/мл (рис. 2, в), являются объектами с высокой электронной плотностью. Это дает возможность не обрабатывать СЧ контрастирующими агентами, что расширяет возможности их анализа различными методами.

СЧ — уникальные биогенные частицы, способные исполнять роль платформы для создания функционально активных комплексов и служить основой для получения вакцинных препаратов, адъювантов, контрастирующих агентов. В связи с этим предложенная в настоящей работе методика препаративного получения СЧ является актуальной. Разработанный подход для получения СЧ является хорошо воспроизводимым и позволяет по-

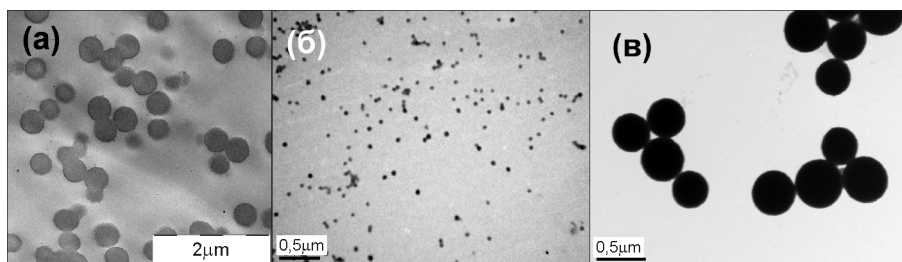


Рис. 2. Изучение структуры и электронной плотности сферических частиц (СЧ). Просвечивающая электронная микроскопия ультратонких срезов СЧ, полученных при термической перестройке препарата вируса табачной мозаики (ВТМ) с концентрацией 1 мг/мл, контрастирование 2%-м уранилацетатом (а). СЧ, полученные из препарата ВТМ с концентрацией вируса 0,1 мг/мл (б), 1 мг/мл (в), изображения получены без контрастирующих агентов

лучать частицы заданного размера в количестве, в 20 раз превышающем количество, которое можно получить по ранее описанной методике. Впервые продемонстрировано, что СЧ не содержат полостей и их внутренняя структура однородна. Показано, что СЧ можно визуализировать без контрастирующих агентов с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Bashieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice // *Vaccine*. 2009. Vol. 27. N 37. P. 5069–5076.
2. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platform and foreign antigens // *J. Gen. Virol.* 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.
3. Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. Examination of biologically active nanocomplexes by nanoparticle tracking analysis // *Microsc. Microanal.* 2013. Vol. 19. N 4. P. 808–813.
4. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 8. P. 1193–1201.
5. Nikitin N.A., Malinin A.S., Trifonova E.A., Rakhnyanskaya A.A., Yaroslavov A.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Proteins immobilization on the surface of modified plant viral particles coated with hydrophobic polycations // *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 2014. Vol. 25. N 16. P. 1743–1754.
6. Soto C.M., Ratna B.R. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2010. Vol. 21. N 4. P. 426–438.
7. Leong H.S., Steinmetz N.F., Ablack A., Destito G., Zijlstra A., Stuhlmann H., Manchester M., Lewis J.D. Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles // *Nat. Protoc.* 2010. Vol. 5. N 8. P. 1406–1417.
8. Bruckman M.A., Hern S., Jiang K., Flask C.A., Yu X., Steinmetz N.F. Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents // *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.* 2013. Vol. 1. N 10. P. 1482–1490.
9. Aljabali A.A., Shukla S., Lomonosoff G.P., Steinmetz N.F., Evans D.J. CPMV-DOX Delivers // *Mol. Pharm.* 2013. Vol. 10. N 1. P. 3–10.
10. Lebel M.E., Daudelin J.F., Chartrand K., Tarrab E., Kalinke U., Savard P., Labrecque N., Leclerc D., Lamarre A. Nanoparticle adjuvant sensing by TLR7 enhances CD8⁺T cell-mediated protection from *Listeria monocytogenes* infection // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192. N 3. P. 1071–1078.
11. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *J. Gen. Virol.* 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
12. Nikitin N.A., Malinin A.S., Rakhnyanskaya A.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Yaroslavov A.A., Atabekov J.G. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // *Polym. Sci. Ser. A*. 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
13. Bruckman M.A., VanMeter A., Stienmetz N.F. Nano-manufacturing of tobacco mosaic virus-based spherical biomaterials using a continuous flow method // *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015. Vol. 1. N 1. P. 13–18.
14. Volkova E.G., Kurchashova S.Y., Polyakov V.Y., Sheval E.V. Self-organization of cellular structures induced by the overexpression of nuclear envelope proteins: a correlative light and electron microscopy study // *J. Electron Microsc.* 2011. Vol. 60. N 1. P. 57–71.
15. ASTM Standard E2834, 2012. ASTM International. West Conshohocken. PA, 2012.
16. Loh E., Ralston E., Schumaker V.N. Quasielastic light scattering from solutions of filamentous viruses. I. Experimental // *Biopolymers*. 1979. Vol. 18. N 10. P. 2549–2567.
17. Sano Y. Translational diffusion coefficient of tobacco mosaic virus particles // *J. Gen. Virol.* 1987. Vol. 68. N 9. P. 2439–2442.
18. Dobrov E.N., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Parshina E.Y., Makarov V.V., Maksimov G.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. β -structure of the coat protein subunits in spherical particles generated by tobacco mosaic virus thermal denaturation // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2014. Vol. 32. N 5. P. 701–708.
19. Sehgal O.P., Jean J., Bhalla R.B., Soong M.M., Krause G.F. Correlation between buoyant density and ribonucleic acid content in viruses // *Phytopathology*. 1970. Vol. 60. N 12. P. 1778–1784.

Поступила в редакцию
08.04.15

OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF SPHERICAL PARTICLES — NEW BIOGENIC PLATFORMS

E.A. Trifonova, N.A. Nikitin, M.P. Kirpichnikov, O.V. Karpova, J.G. Atabekov

The technique of spherical particles obtaining from rod-like plant virus — tobacco mosaic virus in preparative scale was developed. The conditions of tobacco mosaic virus isolation for spherical particles obtaining were selected. Spherical particles were examined by methods of electron microscopy, nanoparticle tracking analysis and dynamic light scattering. Information about inner structure of spherical particles was obtained. High electron density of spherical particles was demonstrated. The analysis of ultrathin sections showed that spherical particles are homogeneous within and do not contain any cavities.

Key words: plant viruses, tobacco mosaic virus, spherical particles.

Сведения об авторах

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, академик, декан биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, академик, зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

**Указатель статей, опубликованных в журнале
“Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2015 году**

	№	Стр.
Биохимия		
Мармий Н.В., Есипов Д.С. Биологическая роль 8-оксо-2'-дезоксигуанозина	4	19
Судницына М.В., Гусев Н.Б. Малые белки теплового шока и диабет.	2	24
Ху Л.Я., Гончарова Н.Ю., Рубцов А.М. Особенности регуляции активности глюкокиназы печени крысы.	1	14
Вирусология		
Атабеков И.Г., Никитин Н.А., Карпова О.В. Новый тип платформ для сборки вакцин <i>in vitro</i>	4	29
Геронтология		
Вайсерман А.М. Эпигенетические и эндокринные детерминанты различий по длительности жизни между кастами социальных насекомых	4	8
Моргунова Г.В., Колесников А.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Ассоциированная со старением бета-галактозидаза — биомаркер старения, повреждения ДНК или ограничения клеточной пролиферации?	4	15
Хохлов А.Н., Моргунова Г.В. К вопросу о снятии кривых выживания культивируемых клеток в цитогеронтологических экспериментах: короткий комментарий с тремя иерархическими диаграммами.	2	19
Хохлов А.Н., Моргунова Г.В., Рындина Т.С., Колл Ф. Предварительные исследования потенциального геропротектора “Quinton Marine Plasma” в экспериментах на культивируемых клетках	1	9
Зоология		
Бурыкин Ю.Б. Функционирование распределительной системы у колониального гидроида <i>Dynatena pumila</i> (L., 1758)	3	44
Методы		
Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Конформационная подвижность нуклеосомы: исследование методом молекулярной динамики	3	49
Кудряшова К.С., Никитин Д.В., Чертков О.В., Герасимова Н.С., Валиева М.Е., Студитский В.М., Феофанов А.В. Разработка флуоресцентно-меченых моонуклеосом для изучения механизмов транскрипции методом микроскопии одиночных комплексов	4	41
Трифорова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц — новых биогенных платформ	4	46
Микробиология		
Бирюков М.В., Бирюкова О.Н. Исследование воздействия гуминовых кислот с помощью бактериального люминесцентного теста.	2	35
Брюханов А.Л., Корнеева В.А., Пименов Н.В. Филогенетический анализ состава анаэробных сульфатредуцирующих бактерий в кислородсодержащих верхних водных горизонтах Черного и Балтийского морей.	4	36
Тренина М.А., Енремян А.С., Стоянова Л.Г. Зависимость ростовых характеристик природных штаммов <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> от состава агаризованных питательных сред, используемых для наращивания биомассы	1	31
Микология, альгология		
Анисимова О.В. Новые виды десмидиевых (Conjugatophyceae, Charophyta) для флоры водорослей Московской области	2	31
Толпышева Т.Ю., Коннычев М.А. Вертикальное распределение лишайников на березах в окрестностях г. Петропавловск-Камчатский	1	25
Молекулярная биология		
Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Исследование ионного окружения и электрических характеристик нуклеосом методом молекулярной динамики.	4	24
Герасимова Н.С., Пестов Н.А., Кулаева О.И., Никитин Д.В., Кирпичников М.П., Студитский В.М. Репарация ДНК в составе хроматина	3	21
Лакунина В.А., Балева М.В., Левицкий С.А., Чичерин И.В., Крашенинников И.А., Самойлова Е.О., Каменский П.А. Импорт РНК в митохондрии и его применение в генной терапии	3	32
Маслакова А.А., Телков М.В., Орловский И.В., Соколова О.С. Сравнительный анализ экспрессии гена SERPINA1 в клеточных линиях опухолевого происхождения.	3	26
Разин С.В., Гаврилов А.А. Организация функциональных процессов в клеточном ядре: порядок, возникающий из беспорядка.	3	13
Фауна, флора		
Гаврилов В.В., Горецкая М.Я., Веселовская Е.О. Сезонные и суточные изменения массы тела и жировых резервов зеленой пеночки в западном Подмоскowie	1	40
Елумеева Т.Г., Онитченко В.Г., Янь У. Функциональные признаки листьев растений высокогорных пастбищ востока Цинхай-Тибетского нагорья (Сычуань, КНР)	1	46

Корзников К.А. Растительный покров молодых грязевых полей грязевого вулкана Магунтан (о. Сахалин)	2	51
Чудаев Д.А., Купреева М.Д., Гололобова М.А. Исследование видов рода <i>Navicula</i> Bory sensu strict (Diatomophyceae) реки Москвы	2	45

Физиология

Абрамочкин Д.В., Пустовит К.Б., Филатова Т.С. Действие диаденозиновых полифосфатов на калиевые токи входящего выпрямления в кардиомиоцитах крысы	4	3
Бережной Д.С., Бокиева С.Б., Стволинский С.Л., Фёдорова Т.Н., Иноземцев А.Н. Влияние карнозина на условную реакцию пассивного избегания в норме и в условиях гипоксии	3	3
Бережной Д.С., Киселёв Н.А., Новоселецкая А.В., Киселёва Н.М., Иноземцев А.Н. Влияние акустических воздействий высокой интенсивности на поведение крыс	2	3
Бушов Ю.В., Светлик М.В. Фазовые взаимодействия между ритмами ЭЭГ при восприятии коротких интервалов времени.	2	8
Грицай О.Б., Дубынин В.А. Влияние N-концевого фрагмента ноцицептина на уровень тревожности американского таракана <i>Periplaneta Americana</i> в тесте “открытое поле” при изменении освещенности	1	3
Малышев А.В., Аббасова К.Р., Аверина О.А., Соловьёва Л.Н., Гедзун В.Р., Гуляев М.В., Дубынин В.А. Экспериментальная модель аутистического расстройства: индуцированный фетальный вальпроатный синдром	3	8

Экология

Кудрявцева А.Д., Шелепчиков А.А., Бродский Е.С., Фешин Д.Б., Румак В.С. Содержание диоксинов в яйцах птиц из различных районов Вьетнама	2	39
Юзбеков А.К., Юзбеков М.А. Влияние техногенного загрязнения атмосферы на заболеваемость органов дыхания	1	19

Эмбриология

Всеволодов Э.Б., Голиченков В.А., Латыпов И.Ф., Доронин Ю.К., Мусаева А.С. Оценка событий послойной дифференцировки волосяного фолликула	2	13
--	---	----

Энтомология

Бенедиктов А.А. Виброакустические сигналы саранчового <i>Trilophidia annulata</i> (Thunb.) (Orthoptera, Acrididae, Oedipodinae)	1	37
Полилов А.А. Морфологические особенности насекомых, связанные с миниатюризацией	3	3