

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

№ 2 • 2016 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Геронтология

- Моргунова Г.В., Клебанов А.А., Хохлов А.Н. Интерпретация данных о влиянии биологически активных препаратов на жизнеспособность культивируемых клеток разного происхождения с позиций геронтологии 3

Вирусология

- Закубанский А.В., Шевелева А.А., Чирков С.Н. Молекулярно-биологические свойства новых изолятов вируса оспы сливы штамма Winopa 8
- Поротикова Е.В., Рисованная В.И., Волков Я.А., Дмитренко Ю.Д., Володин В.А., Гориславец С.М., Странишевская Е.П., Аграновский А.А., Камионская А.М., Виноградова С.В. Распространение вирусов скручивания листьев винограда 1 и 3 (Grapevine Leafroll-Associated Viruses-1 и -3) на территории Крыма. 13

Микология и альгология

- Благовещенская Е.Ю., Попкова Е.Г. Новые находки эндофитных грибов. Короткое сообщение. 17
- Подунай Ю.А., Давидович О.И., Давидович Н.А. Влияние плотности культуры на половое воспроизведение *Ardissonea crystallina* (Bacillariophyta) 19

Методы

- Алиев Т.К., Дементьева И.Г., Топорова В.А., Боков М.Н., Позднякова Л.П., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. Получение и свойства рекомбинантных белков на основе широко нейтрализующего антитела против вируса гриппа типа А 25
- Герасимова Н.С., Студитский В.М. Футпринтинг флуоресцентно-меченой ДНК с использованием гидроксильных радикалов 32
- Кудряшова К.С., Чертков О.В., Иванов Я.О., Студитский В.М., Феофанов А.В. Экспериментальная установка для изучения одиночных иммобилизованных нуклеосом с помощью флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения 37
- Лобакова Е.С., Селях И.О., Семенова Л.Р., Чивкунова О.Б., Щербаков П.Н., Соловченко А.Е. Скрининг сред с различным содержанием биогенных элементов для культивирования микроводорослей, ассоциированных с беспозвоночными Белого моря 43
- Любителей А.В., Кудряшова К.С., Михайлова М.С., Малюченко Н.В., Чертков О.В., Студитский В.М., Феофанов А.В., Кирпичников М.П. Изменение конформации линкерной ДНК при связывании гистона H1.5 с нуклеосомой: флуоресцентная микроскопия одиночных комплексов 49

CONTENTS

Gerontology

- Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view. 3

Virology

- Zakubanskiy A.V., Sheveleva A.A., Chirkov S.N. Molecular and biological characterization of novel isolates of Plum pox virus strain Winona. 8
- Porotikova E.V., Risovannaya V.I., Volkov Y.A., Dmitrenko U.D., Volodin V.A., Gorislavets S.M., Stranishevskaya E.P., Agranovsky A.A., Kamionskaya A.M., Vinogradova S.V. Occurrence of Grapevine leafroll-associated viruses-1 and -3 in Crimea 13

Micology and Algology

- Blagoveshchenskaya E.Yu., Popkova E.G. New finds of endophytic fungi. A brief note 17
- Podunay Yu.A., Davidovich O.I., Davidovich N.A. Effect of culture density on sexual reproduction of *Ardissonea crystallina* (Bacillariophyta) 19

Methods

- Aliev T.K., Dement'yeva I.G., Toporova V.A., Bokov M.N., Pozdnyakova L.P., Rybchenko V.S., Dolgikh D.A., Sveshnikov P.G., Kirpichnikov M.P. Development and properties of recombinant proteins based on the broadly neutralizing antibody to influenza A virus. 25
- Gerasimova N.S., Studitsky V.M. Hydroxyl radical footprinting of fluorescent-labeled DNA 32
- Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Ivanov Y.O., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Experimental setup for study of immobilized single nucleosomes using total internal reflection fluorescence microscopy. 37
- Lobakova E.S., Selyakh I.O., Semenova L.R., Chivkunova O.B., Scherbakov P.N., Solovchenko A.E. Screening of culture media with different nutrient content for cultivation of microalgae associated with White Sea benthic invertebrates . . 43
- Lyubitelev A.V., Kudryashova K.S., Mikhaylova M.S., Malyuchenko N.V., Chertkov O.V., Studitsky V.M., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P. Change in conformation of linker DNA upon binding of histone H1.5 to nucleosome: fluorescent microscopy of single complexes 49

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ ДАННЫХ О ВЛИЯНИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ С ПОЗИЦИЙ ГЕРОНТОЛОГИИ**Г.В. Моргунова, А.А. Клебанов, А.Н. Хохлов***

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

** e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Рассматриваются проблемы, возникающие при интерпретации данных, полученных при испытании потенциальных геропротекторов в цитогеронтологических экспериментах. Подчеркивается, что такие препараты/физические факторы должны влиять на процессы, приводящие к увеличению с возрастом вероятности смерти многоклеточных организмов (главным образом — человека, старение которого интересует геронтологов в первую очередь). При этом, по мнению авторов, соединения, активность которых направлена на лечение возрастных болезней, вряд ли можно относить к геропротекторам. Отмечается, что на модельных системах, использующих культивируемые клетки, исследователи, как правило, оценивают их жизнеспособность, критерии которой в значительной степени зависят от концепции старения, разделяемой экспериментаторами. При этом принципиально важно, на каких именно клетках проводятся такие эксперименты — нормальных или трансформированных клетках многоклеточных организмов, одноклеточных эукариотических или прокариотических организмах и др. В частности, биологически активные соединения, уменьшающие жизнеспособность культивируемых раковых клеток, могут продлевать жизнь экспериментальным животным и человеку, как и препараты, увеличивающие жизнеспособность культивируемых нормальных клеток. Анализируются различные проблемы с интерпретацией данных тестирования потенциальных геропротекторов, полученных на модели Хейфлика, модели “стационарного старения”, клеточно-кинетической модели и в экспериментах по оценке эффективности клонирования. Обсуждаемые подходы проиллюстрированы на примере результатов геронтологических исследований известного ингибитора mTOR — рапамицина. Заключается, что факторы, обеспечивающие замедление “стационарного старения” (хронологического старения) культивируемых клеток, по-видимому, являются наиболее перспективными геропротекторами, хотя конкретные механизмы их действия могут сильно различаться.

Ключевые слова: *цитогеронтология, жизнеспособность клеток, старение, репликативное старение, “стационарное старение”, возрастные болезни, геропротекторы, геропромоторы, обзор.*

В предыдущей работе [1] мы проанализировали различные подходы к определению жизнеспособности культивируемых клеток в цитогеронтологических экспериментах. При этом особый акцент был сделан на проблемах, возникающих при снятии кривых выживания [2] культивируемых клеток в используемой в лаборатории авторов модели “стационарного старения” [3–7]. Предполагалось, что решение проблем такого рода должно обеспечить успешное тестирование потенциальных геропротекторов в экспериментах на данной модели, а также на некоторых других цитогеронтологических модельных системах. Однако оставались открытыми следующие вопросы об интерпретации полученных в исследованиях такого рода данных применительно к человеку, старение которого интересует нас в первую очередь:

1) Насколько важно для интерпретации полученных результатов, разделяют ли исследователи классическое определение старения как совокупности изменений организма, приводящих к увеличению вероятности его смерти [8–11]?

2) И еще один вопрос, напрямую не связанный с цитогеронтологией, но очень важный для экспериментальной геронтологии в целом: всегда ли увеличение продолжительности жизни (ПЖ) организма под влиянием изучаемого фактора позволяет считать его геропротектором (т.е. тем, что замедляет процесс старения)?

3) Всегда ли факторы (химические или физические), улучшающие жизнеспособность культивируемых клеток, должны замедлять старение многоклеточного организма? И, соответственно, наоборот.

4) Насколько важно, какие критерии жизнеспособности клеток использованы при тестировании геропротекторов в цитогеронтологических экспериментах?

5) Как может интерпретация полученных результатов зависеть от того, на каких клетках проведены исследования?

Вопросы 1 и 2. Известно, что существуют как стареющие, так и нестареющие организмы. Первых от вторых можно отличить только по форме кривых выживания соответствующих когорт [8]. Если стареющие организмы вымирают “по Гомпертцу”, то нестареющие — “по экспоненте” (в очень редких случаях полного отсутствия гибели, как, например, в случае находящихся в определенных условиях популяций пресноводной гидры [12], кривая выживания представляет собой просто горизонтальную прямую). И именно по характеру модификации таких кривых под влиянием того или иного фактора мы делаем вывод о том, влияет ли он на процесс старения. Можно полагать, что “истинный” геропротектор должен сдвигать кривую выживания вправо без изменения ее формы, т.е. увеличивая как среднюю, так и максимальную ПЖ. И при этом кривая выживания не должна быть экспоненциальной! Впрочем, какой-нибудь гипотетический “бессмертизатор”, делающий кривую выживания горизонтальной (т.е. фактически отменяющий смерть членов когорты) мы бы тоже отнесли к геропротекторам. Хотелось бы также подчеркнуть, что, как мы полагаем, при таком подходе не очень важно, является ли старение запрограммированным процессом или оно определяется стохастическими процессами, запускаемыми после завершения программы развития [7, 10, 11, 13–15].

Факторы же, увеличивающие ПЖ нестареющих организмов, по-видимому, нельзя считать геропротекторами, так как они не влияют на процесс увеличения с возрастом вероятности смерти.

Что касается препаратов, с помощью которых борются с возрастными болезнями, то формально в этом случае мы замедляем (или откладываем) увеличение вероятности смерти, однако, что очень важно, практически никак не влияем на максимальную (видовую) ПЖ. Если считать и эти лекарства геропротекторами, то тогда к ним можно отнести практически все, что обеспечивает нормальное существование организма (вода, пища, витамины, микроэлементы и т.п.). Мы разделяем точку зрения, согласно которой возрастные болезни являются следствием старения, а не наоборот.

Вопросы 3, 4 и 5. Исследуя потенциальные геропротекторы в цитогеронтологических экспериментах (т.е. в экспериментах на клеточных культурах) мы, как правило, оцениваем их влияние на жизнеспособность клеток. Однако критерии этой жизнеспособности могут принципиально различаться в зависимости от того, какой теории старения придерживается конкретный исследователь. В течение многих лет была очень популярна кон-

цепция, согласно которой причина старения многоклеточного организма кроется в ограниченном митотическом потенциале составляющих его нормальных клеток [16, 17]. Поэтому препараты, увеличивающие пролиферативный потенциал (“лимит Хейфлика”) таких клеток *in vitro*, автоматически причислялись к геропротекторам (необходимо подчеркнуть, что речь идет именно о пролиферативном *потенциале* клеток, а не об их пролиферативной *активности*; к сожалению, эти показатели в цитогеронтологической литературе очень часто смешиваются). При этом игнорировались данные, согласно которым старение организма определяется во многом его постмитотическими или очень медленно размножающимися клетками (нейроны, кардиомиоциты, гепатоциты, яйцеклетки и др.), которые за время жизни “хозяина” никогда не успевают реализовать даже “нормальный” потенциал делений [8, 18]. Большинство клеток организма человека не делятся или делятся очень медленно не потому, что *не могут* этого делать, а потому что *не должны*. Поэтому индукция теломеразной активности в нормальных клетках, приводящая к значительному увеличению их митотического потенциала (возможно, даже делающая его неограниченным) в таких клетках не может быть реализована. Ну а для клеток организма, уже обладающих теломеразой (стволовые клетки, клетки зародышевого пути), такая индукция тем более бесполезна. Впрочем, согласно определенной точке зрения [19], некоторый “мозаицизм” по пролиферативным показателям, существующий в высокоорганизованном многоклеточном организме, все же позволяет считать укорочение теломер важным фактором для старения и долголетия.

Если же исследуемое соединение положительно влияет именно на пролиферативную *активность* клеток, что проявляется, например, в увеличении их способности к колониеобразованию, то последствия воздействия такого препарата на организм могут быть двоякими. С одной стороны, для некоторых клеток (например, тех, которые участвуют в процессах регенерации) такая стимуляция может быть полезна. С другой стороны, это воздействие может, во-первых, стимулировать к делению те клетки, которые, как уже упоминалось выше, *не должны* делиться, а во-вторых, увеличить вероятность быстрого размножения имеющихся в организме предраковых (или даже раковых) клеток. Не исключено также повышение частоты возникающих доброкачественных опухолей. Впрочем, хотелось бы подчеркнуть, что методика оценки способности клеток к образованию колоний является одной из немногих, обеспечивающих получение данных о характеристиках *отдельных* клеток, а не клеточной популяции в целом [20]. В последнем случае из-за усреднения мы теряем информацию о возможных клеточных субпопуляциях, которые могут по-разному реагировать на исследуемое вещество. Например, у некоторых клеток количество

популярного биомаркера старения 8-оксо-2'-дез-оксигуанозина в ДНК [21] под влиянием изучаемого фактора может увеличиваться, у некоторых — уменьшаться, а у некоторых — оставаться неизменным. В результате, оценивая содержание 8-оксо-2'-дез-оксигуанозина в среднем, мы можем сделать выводы об отсутствии изменений этого показателя.

Некоторые показатели, используемые для оценки жизнеспособности клеток в цитогеронтологических экспериментах, могут быть чисто “коррелятивными” [22], так что их интерпретация становится еще более сложной. Например, это касается величины насыщающей плотности клеточной культуры. Известно, что для нормальных диплоидных клеток этот показатель хорошо обратно коррелирует с возрастом донора клеток (причинно-следственные связи в этом случае остаются неясными). В нашей так называемой “клеточно-кинетической модели” [23] мы использовали именно его для оценки потенциальных геропротекторов. Предполагалось, что факторы, увеличивающие насыщающую плотность культуры и, тем самым, снижающие “биологический возраст” клеток, должны положительно влиять на жизнеспособность и старение многоклеточного организма. Однако в этом случае мы можем столкнуться с теми же проблемами интерпретации данных, которые касаются экспериментов по оценке эффективности клонирования. Совсем не очевидно, что во всех случаях улучшение способности клеток достигать высокой насыщающей плотности в культуре приведет к замедлению старения многоклеточного организма. Не исключено, что оно вообще никак не повлияет на процесс старения, а, возможно, даже ускорит его.

Очень важно, на каких именно клетках проводятся цитогеронтологические эксперименты по тестированию потенциальных геропротекторов — нормальных или трансформированных клетках многоклеточных организмов, одноклеточных эукариотических или прокариотических организмах и т.п. Как уже отмечалось выше, различия в интерпретации данных тестирования геропротекторов, полученных на нормальных и трансформированных клетках животных или человека, могут становиться совершенно очевидными при попытке перенесения таких результатов на людей, значительная часть которых умирает от онкологических заболеваний. В частности, биологически активные соединения, уменьшающие жизнеспособность культивируемых раковых клеток, могут продлевать жизнь экспериментальным животным и человеку, как и препараты, увеличивающие жизнеспособность культивируемых нормальных клеток. Использование одноклеточных организмов — бактерий [24], дрожжей [25, 26], микроводорослей [27] и микоплазм [28, 29] — позволяет оценивать влияние тех или иных препаратов на клетки, представляющие собой самостоятельные организмы. Однако бактерия, например, так сильно отличается от клетки млекопитающего, что одни и те же вещества могут убить первую, но практиче-

ски никак не повлиять на жизнеспособность второй (например, это касается антибиотиков).

Нам представляется, что модель “стационарного старения” позволяет во многих случаях избежать значительной части перечисленных проблем, ибо для любых используемых в экспериментах клеток ключевым фактором, запускающим их “старение”, является ограничение клеточной пролиферации с помощью того или иного достаточно физиологического способа. Классический пример — хронологическое старение дрожжей [25, 26], данные исследования которого часто вполне успешно используются для изучения механизмов старения людей и животных. В частности, в экспериментах на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* было продемонстрировано, что известный ингибитор mTOR, рапамицин, в небольших дозах, достаточных для замедления деления дрожжевых клеток, но не блокирующих полностью этот процесс, увеличивает ПЖ культуры в модели хронологического старения [30, 31]. Впоследствии обнаружили, что это соединение продлевает жизнь экспериментальным животным — мышам [32, 33] и дрозофилам [34]. Необходимо отметить, что, согласно представлениям некоторых исследователей [31, 35], положительный “геронтологический” эффект рапамицина может быть связан с активацией аутофагии. Не исключается также, что благоприятное действие рапамицина на ПЖ животных может определяться подавлением под его влиянием возникновения и развития злокачественных опухолей [36, 37]. Как уже отмечалось выше, в таком случае считать его геропротектором вряд ли возможно. Помимо всего прочего, интересно отметить, что со временем у животных может развиваться привыкание к рапамицину, поэтому некоторые авторы полагают целесообразным применение препарата в комбинации с другими биологически активными соединениями, например, с ресвератролом [38]. К сожалению, проблемы такого рода вряд ли могут быть “пойманы” на уровне цитогеронтологических исследований.

С учетом всего изложенного у нас складывается впечатление, что наименьшее количество проблем с интерпретацией данных, касающихся тестирования потенциальных геропротекторов в цитогеронтологических экспериментах, возникает при проведении подобных исследований на модели “стационарного старения” (основанной на концепции ограничения клеточной пролиферации как основной причины накопления с возрастом в клетках многоклеточных организмов макромолекулярных повреждений, приводящих к ухудшению функционирования тканей и органов и, как следствие, к увеличению вероятности смерти) нормальных клеток, хотя и в этом случае окончательного ответа на вопрос о том, является ли изучаемый фактор геропротектором, мы не получим. Для этого все равно потребуются как эксперименты на животных, так и клинические исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khokhlov A.N., Morgunova G.V.* On the constructing of survival curves for cultured cells in cytogerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.
2. *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.
3. *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.
4. *Khokhlov A.N.* Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 663. P. 475–476.
5. *Akimov S.S., Khokhlov A.N.* Study of “stationary phase aging” of cultured cells under various types of proliferation restriction // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 520.
6. *Khokhlov A.N.* Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1998. Vol. 854. P. 519.
7. *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.
8. *Khokhlov A.N.* From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // *Biophysics.* 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
9. *Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J.* Teaching cytogerontology in Russia and China // *Adv. Gerontol.* 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.
10. *Khokhlov A.N.* Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? // *Biogerontology.* 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
11. *Khokhlov A.N.* Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochastics? // *Russ. J. Dev. Biol.* 2013. Vol. 44. N 6. P. 336–341.
12. *Khokhlov A.N.* On the immortal hydra. Again // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.
13. *Hayflick L.* Entropy explains aging, genetic determinism explains longevity, and undefined terminology explains misunderstanding both // *PLoS Genet.* 2007. Vol. 3. N 12. e220.
14. *Khokhlov A.N.* Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // *Russ. J. Gen. Chem.* 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.
15. *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.
16. *Hayflick L.* The cell biology of aging // *J. Invest. Dermatol.* 1979. Vol. 73. N 1. P. 8–14.
17. *Hayflick L.* Aging under glass // *Mutation Research/DNAging.* 1991. Vol. 256. N 2–6. P. 69–80.
18. *Cristofalo V.J., Allen R.G., Pignolo R.J., Martin B.G., Beck J.C.* Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: A reevaluation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. Vol. 95. N 18. P. 10614–10619.
19. *Mikhelson V.M., Gamaley I.A.* Telomere shortening is a sole mechanism of aging in mammals // *Curr. Aging Sci.* 2012. Vol. 5. N 3. P. 203–208.
20. *Khokhlov A.N., Prokhorov L.Yu., Ivanov A.S., Archakov A.I.* Effects of cholesterol- or 7-ketocholesterol-containing liposomes on colony-forming ability of cultured cells // *FEBS Lett.* 1991. Vol. 290. N 1–2. P. 171–172.
21. *Есупов Д.С., Горбачева Т.А., Хайруллина Г.А., Клебанов А.А., Нгуен Тхи Нгок Ту, Хохлов А.Н.* Изучение накопления 8-оксо-2'-дезоксигуанозина в ДНК при “стационарном старении” культивируемых клеток // *Усп. геронтол.* 2008. Т. 21. № 3. С. 485–487.
22. *Khokhlov A.N.* Cytogerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // *Russ. J. Dev. Biol.* 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.
23. *Khokhlov A. N.* The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // *Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Ed. by F. Licastro and C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB,* 1992. P. 209–216.
24. *Nyström T.* Aging in bacteria // *Curr. Opin. Microbiol.* 2002. Vol. 5. N 6. P. 596–601.
25. *Aging research in yeast: Subcell. Biochem. Vol. 57 / Eds. M. Breitenbach, S.M. Jazwinski, and P. Laun. Springer Netherlands,* 2012. 368 pp.
26. *Khokhlov A.N.* Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.
27. *Ушаков В.Л., Гусев М.В., Хохлов А.Н.* Имеет ли смысл изучать механизмы старения на сине-зеленых водорослях? Критический обзор, часть 1 // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология.* 1992. № 1. С. 3–15.
28. *Хохлов А.Н., Ушаков В.Л., Капитанов А.Б., Наджарян Т.Л.* Влияние геропротектора хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на пролиферацию клеток *Acholeplasma laidlawii* // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274. № 4. С. 930–933.
29. *Kapitanov A.B., Aksenov M.Y.* Ageing of procaryotes. *Acholeplasma laidlawii* as an object for cell ageing studies: a brief note // *Mech. Ageing Dev.* 1990. Vol. 54. N 3. P. 249–258.
30. *Powers R.W. III, Kaerberlein M., Caldwell S.D., Kennedy B.K., Fields S.* Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling // *Genes Dev.* 2006. Vol. 20. N 2. P. 174–184.
31. *Alvers A.L., Wood M.S., Hu D., Kaywell A.C., Dunn W.A. Jr., Aris J.P.* Autophagy is required for extension of yeast chronological life span by rapamycin // *Autophagy.* 2009. Vol. 5. N 6. P. 847–849.
32. *Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D., Nelson J.F., Astle C.M., Flurkey K., Nadon N.L., Wilkinson J.E., Frenkel K., Carter C.S., Pahor M., Javors M.A., Fernandez E., Miller R.A.* Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice // *Nature.* 2009. Vol. 460. N 7253. P. 392–395.
33. *Miller R.A., Harrison D.E., Astle C.M. et al.* Rapamycin-mediated lifespan increase in mice is dose and sex dependent and metabolically distinct from dietary restriction // *Aging Cell.* 2014. Vol. 13. N 3. P. 468–477.
34. *Bjedov I., Toivonen J.M., Kerr F., Slack C., Jacobson J., Foley A., Partridge L.* Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Cell Metab.* 2010. Vol. 11. N 1. P. 35–46.
35. *Rubinsztein D.C., Mariño G., Kroemer G.* Autophagy and aging // *Cell.* 2011. Vol. 146. N 5. P. 682–695.
36. *Blagosklonny M.V.* Aging and immortality: quasi-programmed senescence and its pharmacologic inhibition // *Cell Cycle.* 2006. Vol. 5. N 18. P. 2087–2102.

37. Neff F., Flores-Dominguez D., Ryan D.P. et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging // J. Clin. Invest. 2013. Vol. 123. N 8. P. 3272–3291.

38. Alayev A., Berger S.M., Kramer M.Y., Schwartz N.S., Holz M.K. The combination of rapamycin and resveratrol blocks autophagy and induces apoptosis in breast cancer cells // J. Cell Biochem. 2015. Vol. 116. N 3. P. 450–457.

Поступила в редакцию
23.02.16

INTERPRETATION OF DATA ABOUT THE IMPACT OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS ON VIABILITY OF CULTURED CELLS OF VARIOUS ORIGIN FROM A GERONTOLOGICAL POINT OF VIEW

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

Evolutionary Cyto gerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

* e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Problems related to the interpretation of data obtained during testing of potential geroprotectors in cyto gerontological experiments are considered. It is emphasized that such compounds/physical factors should influence on the processes leading to the age-related increase of death probability of multicellular organisms (primarily — of man, in whose aging gerontologists are mainly interested). However, in the authors' opinion, compounds which cure age-related diseases unlikely could be classified as geroprotectors. It is noted, that, in the model systems using cultured cells, researchers, as a rule, evaluate their viability criteria of which, to a great extent, depend on the aging theory shared by the experimenters. Besides, it is very important what cells are used in the studies — normal or transformed cells of multicellular organisms, unicellular eukaryotic or prokaryotic organisms, etc. In particular, biologically active compounds which decrease the viability of cultured cancer cells may increase the life span of experimental animals and humans, as well as compounds which increase the viability of normal cultured cells. Various problems with interpretation of data obtained with the Hayflick model, the stationary phase aging model, and the cell kinetics model, as well as in experiments on evaluation of cell colony-forming efficiency are analyzed. The approaches discussed are illustrated on the example of the results from gerontological investigations of a famous mTOR inhibitor, rapamycin. It is assumed that factors retarding the stationary phase aging (chronological aging) of cultured cells are, apparently, the most promising geroprotectors although the specific mechanisms of their action may vary considerably.

Key words: cyto gerontology, cell viability, aging, senescence, replicative aging, stationary phase aging, age-related diseases, geroprotectors, geropromoters, review.

Сведения об авторах:

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

Клебанов Александр Александрович — научный сотрудник 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

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 634.22:632.3:578.864

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА
ОСПЫ СЛИВЫ ШТАММА WINONA

А.В. Закубанский, А.А. Шевелева, С.Н. Чирков*

Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* email: s-chirkov1@yandex.ru

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) является экономически наиболее значимым вирусным патогеном косточковых культур, принадлежащих к роду *Prunus*. Штамм Winona (PPV-W) — самый вариабельный из девяти известных штаммов вируса и один из самых распространенных в европейской части России. Шесть новых изолятов PPV-W были выявлены впервые в зеленых насаждениях г. Москвы (Kp2U, Avang, Pulk, Pulk-1), в Талдомском районе Московской области (Karm) и в Ковровском районе Владимирской области (Vlad-4) на дикорастущих деревьях сливы *Prunus domestica*. 3'-Терминальный сегмент генома новых изолятов отличался высоким уровнем изменчивости. Изучение их родственных связей с другими изолятами этого штамма посредством филогенетического анализа последовательности гена белка оболочки показало отсутствие кластеризации российских изолятов PPV-W по географическому принципу. Инокуляция растений *Nicotiana benthamiana* хмелевой тлей *Phorodon humuli* с деревьев сливы, зараженных изолятами Avang и Pulk, и чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* с дерева, зараженного изолятом Kp2U, приводила к системной вирусной инфекции в индикаторных растениях, что указывало на возможность распространения PPV-W обоими видами тли в природе. Передачу PPV-W через семена установить не удалось.

Ключевые слова: вирус оспы сливы, штамм Winona, филогенетический анализ, хмелевая тля *Phorodon humuli*, чертополоховая тля *Brachycaudus cardui*.

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV, род *Potyvirus*, сем. *Potyviridae*) является экономически наиболее значимым вирусным патогеном косточковых культур, принадлежащих к роду *Prunus*. Вызываемое им заболевание (“шарка”) приводит к снижению урожая и ухудшению качества плодов [1]. Вирусный геном представлен однонитевой молекулой РНК положительной полярности длиной 9,8 тыс. нуклеотидов (нт) с организацией, типичной для потивирусов. В зараженных клетках геномная РНК транслируется с образованием полипротеина, который разрезается вирус-специфическими протеазами на 10–11 функционально активных белков. От растения к растению вирус передается при вегетативном размножении, а также различными видами тли. Известно девять штаммов вируса: D, M, C, CR, W, Rec, EA, T и An. Штаммы различаются по нуклеотидной последовательности геномной РНК, антигенным и эпидемиологическим свойствам, географическому распространению, кругу хозяев и патогенности для различных видов косточковых культур [2].

Штамм W (Winona) (PPV-W) встречается преимущественно на территории бывшего СССР. Два изолята, обнаруженные в Канаде [3, 4] и США [5], имеют украинское происхождение. Других изолятов PPV-W за пределами бывшего СССР до сих пор не выявлено. Напротив, в европейской части Рос-

сии изоляты этого штамма распространены очень широко [6]. Анализ их геномов показал, что PPV-W является самым вариабельным из известных штаммов вируса, в частности, вследствие широкого распространения внутриштаммовой рекомбинации [7, 8]. Поэтому молекулярный анализ каждого нового изолята представляет большой интерес для оценки степени генетической изменчивости PPV и понимания его эволюции. Кроме того, биологические свойства PPV-W практически не изучены.

В данной работе исследовали шесть новых изолятов PPV-W, выявленных на дикорастущих деревьях сливы в Москве, а также в Московской и Владимирской областях. Посредством филогенетического анализа геномов изучены их родственные связи с другими изолятами этого штамма. Также исследована возможность передачи изолятов штамма W тлями и через семена.

Материалы и методы

Изоляты Avang, Kp2U, Pulk и Pulk-1 обнаружены на дикорастущих деревьях сливы (*P. domestica*) в зеленых насаждениях на севере г. Москвы. Изолят Karm выявлен на корневой поросли сливы в Талдомском районе Московской области, а изолят Vlad-4 — на сливе в Ковровском районе Владимирской области. Все изоляты индуцировали типичные симптомы шарки на листьях зараженных

растений. Лабораторную диагностику вируса осуществляли посредством иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора Reagent set SRA 31505 (Agdia, США) и иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с универсальными праймерами, выявляющими любые изоляты вируса [9], как описано ранее [10]. Штамм изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с набором праймеров, разработанных для идентификации различных штаммов вируса [11–15]. 3'-Терминальный сегмент генома, включающий ген белка оболочки (БО) и прилегающие последовательности гена N1b и 3'-нетранслируемого региона, амплифицировали методом ОТ-ПЦР с праймерами P3dW/4CPR1 [16]. Продукты ПЦР размером 1211 п.н. выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в обоих направлениях методом Сэнгера в фирме Евроген. Последовательности гена БО новых изолятов депонированы в базе данных GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) под номерами KU359729 (Avang), KU359730 (Karm), KU359731 (Kp2U), KU359732 (Pulk), KU359733 (Pulk-1) и KU359734 (Vlad-4). Для филогенетического анализа использовали все доступные в GenBank последовательности гена БО изолятов PPV-W: W3174 (AY912055), RD4 (HG916856), STNB1 (HG916857), STNB2 (HG916858), PD2 (HG916859), P2-1 (HG916860), P3 (HG916861), 1410-7 (HG916862), 1410-1 (HG916863), 1410 (HQ326086), LV-141pl (HQ670746), LV-145bt (HQ670748), UKR44189 (JN596110), BY (JQ970438), P1 (JQ970439), Pk (KC347608), P2-2 (LN852400). Анализ генетического разнообразия последовательностей и филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA 6.06 [17].

Для определения вида тли, колонизирующей побеги зараженных деревьев, использовали определитель насекомых [18]. Возможность переноса вируса тлей изучали, как описано ранее [19]. Тлю с деревьев сливы, зараженных изолятами Kp2U, Pulk и Avang, переносили на растения *Nicotiana benthamiana* по 25–40 особей на 1–2 листа среднего яруса. Каждый изолят инокулировали в 5–6 растений. Вирус в индикаторных растениях определяли через 2–3 нед. после инокуляции с помощью ОТ-ПЦР. Вирофорность тлей определяли методом ОТ-ПЦР, используя в качестве матрицы для обратной транскрипции тотальную РНК, выделенную из тлей при помощи наборов RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия). По 40 мг тлей, собранных с того или иного дерева, гомогенизировали в лизирующем буфере RLT, входящем в состав набора, и выделяли тотальную РНК в соответствии с протоколом фирмы. Для изучения возможности передачи PPV-W семенами собирали плоды с зараженных деревьев, отделяли косточки от мякоти, обрабатывали их раствором марганцовокислого калия и стратифицировали во влажном субстрате в течение 5–6 мес. при температуре 2–4°C до прорастания. Наличие вируса

в сеянцах сливы определяли методом ОТ-ПЦР через 5–7 нед. после их высаживания в стерильный почвенный субстрат.

Результаты и обсуждение

Методами ИФА и ОТ-ПЦР вирус был выявлен во всех исследованных образцах растений сливы с симптомами шарки. При использовании в ОТ-ПЦР праймеров, специфичных к штамму W, образовывался продукт ожидаемого размера (327 п.н.) [13] (данные не представлены). Амплификации с праймерами, специфичными к другим штаммам вируса, не наблюдали. Таким образом, анализируемые изоляты очевидно принадлежат к штамму W. Ранее PPV-W был выявлен в различных регионах Европейской России, а также в Латвии на сливе (*P. domestica*), терне (*P. spinosa*), войлочной вишне (*P. tomentosa*) и алыче (*P. cerasifera*) [6, 10, 16, 20, 21]. В Москве изоляты этого штамма были обнаружены в коллекционных насаждениях Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН на сливе канадской (*P. nigra*) и терне [10, 22]. В зеленых насаждениях г. Москвы, на севере Московской области и во Владимирской области PPV-W обнаружен впервые. Эти находки являются еще одним подтверждением повсеместного распространения изолятов штамма W в европейской части России. В среднем, с учетом новых изолятов, последовательности гена БО PPV-W различались на 5,1%, что соответствует данным о степени вариабельности полногеномных последовательностей PPV-W [8] и свидетельствует о высоком уровне генетического разнообразия внутри штамма W.

Результаты филогенетического анализа гена БО новых изолятов PPV-W представлены на рис. 1. Изоляты Avang, Pulk и Pulk-1 образуют одну группу. Деревья сливы, на которых обнаружены эти изоляты, находятся в сотнях метров одно от другого и колонизируются одним и тем же видом предполагаемого переносчика вируса — хмелевой тлей *Phorodon humuli* (Schr.). Интересно, что эти три изолята связаны общностью происхождения с изолятами 1410 и PD2 из коллекции косточковых культур Главного ботанического сада имени Н.В. Цицина РАН [10, 22]. Возможно, сравнительная близость местообитания растений-хозяев способствовала естественному распространению предка этих изолятов тлей-переносчиком. Еще один московский изолят Kp2U близкородственен изоляту RD4, обнаруженному на войлочной вишне в Раменском районе Московской области [10]. Следует отметить, что все изоляты, входящие в эту группу, выявлены в Московской области, за исключением изолята Pk, который обнаружен на дикорастущей сливе в Тверской области [16].

Хотя в ряде случаев группирование изолятов по топографическому принципу, видимо, может иметь место, в целом кластеризация российских изолятов PPV-W по географическому принципу отсутствует.

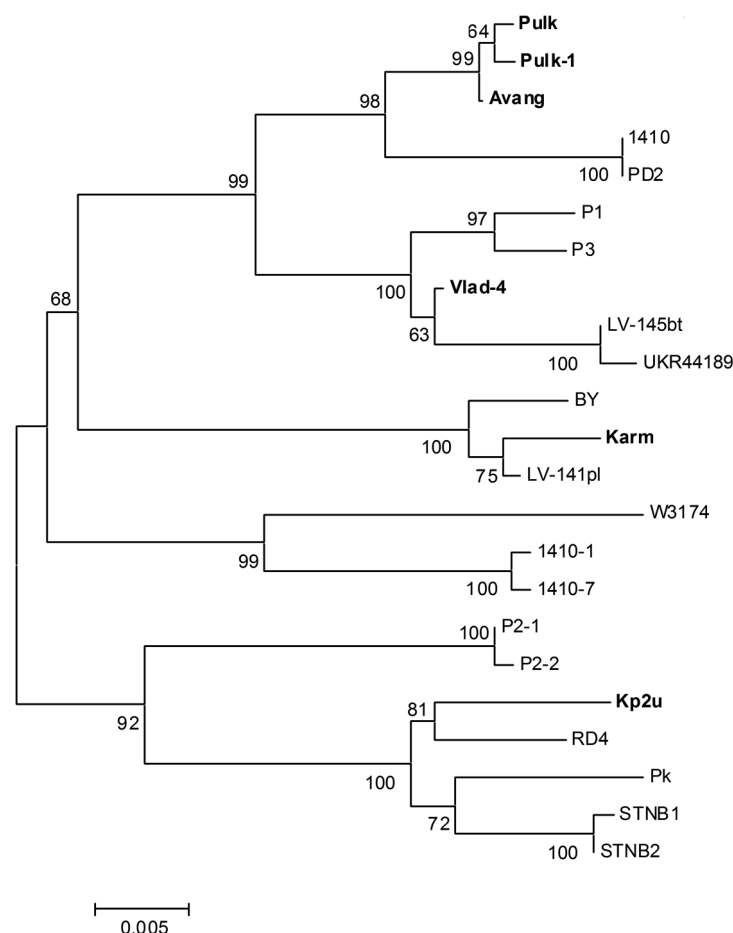


Рис. 1. Филогенетическое дерево, реконструированное методом присоединения соседей на основе последовательностей гена белка оболочки изолятов вируса оспы сливы штамма Winona. Названия изолятов указаны на концах ветвей. Наименования изолятов, изученных в данной работе, выделены жирным шрифтом. Результаты бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (в процентах) указаны рядом с узлами. Масштабная черта показывает число замен на один нуклеотид. Номера последовательностей, использованных в филогенетическом анализе, в базе данных GenBank приведены в разделе “Материалы и методы”. Филогенетический анализ выполнен с помощью программы MEGA6 (17)

Так, изолят Karm из Талдомского района Московской области кластеризуется с изолятом BY из Белгородской области и с изолятом LV-141pl из Латвии, причем латвийский изолят считается наиболее близким к предполагаемому предку этого штамма [21]. Аналогичным образом, изолят Vlad-4 из Владимирской области кластеризуется с изолятами P1 и P3 из Ставропольского края [8, 10] и с изолятами LV-145bt из Латвии и UKR44189 из Украины [5, 21].

Известно, что ген БО PPV-W может состоять из 990 или 993 нт. Это различие связано с делецией нуклеотидов Т, А, Г из соседних триплетов в 5'-проксимальном участке гена БО у ряда изолятов [8, 10, 21]. Филогенетический анализ показал, что последовательности гена БО длиной 990 нт (изоляты Pulk, Pulk-1, Avang, 1410, PD2, P1, P3, Vlad-4, LV-145bt, UKR44189) формируют отдельный кластер (рис. 1). Однако в него не входит изолят BY, ген БО которого тоже состоит из 990 нт. Возможно, входящие в этот кластер изоляты представляют собой отдельную ветвь эволюции PPV-W.

Штамм W является самым изменчивым из всех известных штаммов PPV, а последовательность гена БО, кодирующая N-терминальный домен БО, является наиболее вариабельным участком генома [2]. Поэтому филогенетический анализ гена БО, очевидно, вполне достоверно отражает родственные связи между изолятами. Об этом же свидетельствуют

высокие значения бутстрэп-анализа и близость топологии филогенетического дерева, представленного в данной статье, к дереву, реконструированному на основе полногеномных последовательностей изолятов этого штамма [8].

В природных условиях PPV распространяется от растения к растению различными видами тли неперсистентным способом [2, 19]. Деревья сливы, зараженные изолятами Avang и Pulk, были колонизированы хмелевой тлей *Ph. humuli*, а дерево, зараженное изолятом Kp2U, было колонизировано чертополоховой тлей *Brachycaudus cardui* (L.). Эти виды тли известны как переносчики PPV [19], однако возможность переноса ими изолятов штамма W не была изучена.

Методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к штамму W [13], вирус легко определялся в листьях, колонизированных тлями (рис. 2, а). В то же время, анализ тотальной РНК из тлей, собранных с зараженных побегов, выявил вирус только в *B. cardui* со сливы, зараженной изолятом Kp2U (рис. 2, б). Несмотря на это, инокуляция растений *N. benthamiana* тлями *Ph. humuli* с деревьев сливы, зараженных изолятами Avang и Pulk, и тлями *B. cardui* с дерева, зараженного изолятом Kp2U, приводила к инфицированию индикаторных растений. Методом ОТ-ПЦР вирус был обнаружен как в инокулированных, так и в неинокулированных листьях,

что указывало на возможность переноса изолятов PPV-W обоими видами тлей (рис. 2, в). Доля зараженных индикаторных растений зависела от изолята PPV-W и составила для Avang — три растения из пяти зараженных, для Pulk — четыре растения из шести, и для Кр2U — пять растений из пяти инокулированных. Возможно, высокая эффективность передачи изолята Кр2U является следствием существенно большего количества вируса в тлях *B. cardui* (рис. 2, б). Высокое содержание PPV в переносчике не характерно для непersistентного способа передачи вируса и нуждается в дальнейшем изучении. Следует отметить, что при векторной передаче вируса инфекция PPV-W в *N. benthamiana* оказалась полностью бессимптомна, как и при механическом заражении растений этого вида [22].

Некоторые потивирусы могут распространяться семенами [23]. Изоляты PPV штаммов D и M семенами не передаются [24], но штамм W в этом отношении не был изучен. Методом ОТ-ПЦР были проанализированы 47 растений сливы, выращенных из семян с зараженных деревьев. Ни в одном из сеянцев вирус выявить не удалось. Типичные симптомы вирусной инфекции не развивались. По-видимому, изоляты PPV штамма W семенами не передаются.

Находки новых изолятов PPV-W в географически отдаленных регионах еще раз свидетельствуют о повсеместном распространении штамма W в европейской части России в результате обмена

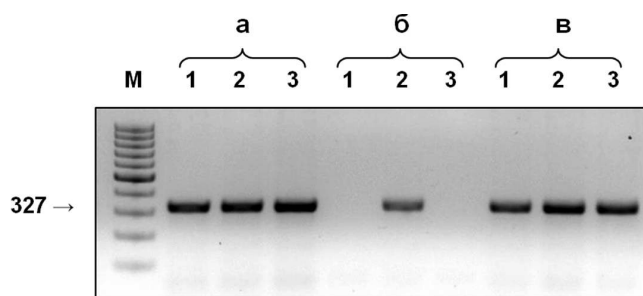


Рис. 2. Определение вируса оспы сливы в листьях сливы, колонизированных тлей (а), в тле (б) и в системных листьях *Nicotiana benthamiana* через 3 нед. после инокуляции тлей (в) методом ОТ-ПЦР. Изоляты: Avang (1), Кр2U (2), Pulk (3). Электрофорез в 2%-ном геле агарозы. Окрашивание бромистым этидием. Стрелка указывает положение специфического продукта ОТ-ПЦР размером 327 п.н. М — маркеры GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

зараженным материалом косточковых культур и наличия эффективных переносчиков вируса. Широкое распространение этого штамма, его отсутствие за пределами бывшего СССР и высокая вариабельность генома могут указывать на происхождение штамма W в России или сопредельных странах, что согласуется с предположениями о восточно-европейском происхождении PPV-W [4, 6].

Авторы благодарны д-ру Аскару Ахатову за определение видов тли. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease // EPPO Bull. 2006. Vol. 36. N 2. P. 202–204.
2. Garcia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease // Mol. Plant Pathol. 2014. Vol. 15. N 3. P. 226–241.
3. James D., Varga A., Thompson D., Hayes S. Detection of a new and unusual isolate of Plum pox virus in plum (*Prunus domestica*) // Plant Dis. 2003. Vol. 87. N 9. P. 1119–1124.
4. James D., Varga A. Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain // Virus Res. 2005. Vol. 110. N 1–2. P. 143–150.
5. Mavrodieva V., James D., Williams K., Negi S., Varga A., Mock R., Levy L. Molecular analysis of a Plum pox virus isolate in plum germplasm hand carried into the USA from the Ukraine shows a close relationship to a Latvian isolate // Plant Dis. 2013. Vol. 97. N 1. P. 44–52.
6. Чирков С.Н., Приходько Ю.Н. Генетическое разнообразие и структура популяции вируса оспы (шарки) сливы в России // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50. № 5. С. 529–539.
7. Sheveleva A., Ivanov P., Chirkov S., Prihodko Y., Varga A., James D. Plum pox virus W appears to be the most variable strain of the seven recognized strains of the virus // Petria. 2012. Vol. 22. N 3. P. 226–232.
8. James D., Sanderson D., Varga A., Sheveleva A., Chirkov S. Analysis of the complete genome sequences of new isolates of the genetically diverse Winona strain of Plum pox virus (PPV W) and the first definitive evidence of intra-strain recombination events // Phytopathology. 2016. Vol. 106. N 4. P. 407–416.
9. Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelonandro M., Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for Plum pox virus detection // J. Virol. Meth. 1992. Vol. 39. N 1–2. P. 27–37.
10. Sheveleva A., Ivanov P., Prihodko Y., James D., Chirkov S. Occurrence and genetic diversity of Winona-like Plum pox virus isolates in Russia // Plant Dis. 2012. Vol. 96. N 8. P. 1135–1142.
11. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of Plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // J. Virol. Meth. 1997. Vol. 68. N 2. P. 127–137.
12. Nemchinov L., Hadidi A. Specific oligonucleotide primers for the direct detection of plum pox potyvirus-cherry subgroup // J. Virol. Meth. 1998. Vol. 70. N 2. P. 231–234.
13. James D., Varga A. Preliminary molecular characterization of Plum pox virus isolate W3174: evidence of a new strain // Acta Hort. 2004. Vol. 657. P. 177–182.
14. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // Acta Virologica. 2004. Vol. 48. N 3. P. 173–176.
15. Glasa M., Prihodko Y., Predajna L., Nagyova A., Shneyder Y., Zhivaeva T., Šubr Z., Cambra M., Candresse T. Characterization of sour cherry isolates of Plum pox virus from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus // Phytopathology. 2013. Vol. 103. N 9. P. 972–979.

16. Sheveleva A., Kudryavtseva A., Speranskaya A., Belenikin M., Melnikova N., Chirkov S. Complete genome sequence of a novel Plum pox virus strain W isolate determined by 454 pyrosequencing // *Virus Genes*. 2013. Vol. 47. N 2. P. 385–388.

17. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* 2011. Vol. 28. N 10. P. 2731–2739.

18. Определитель насекомых Европейской части СССР. В 5 т. / Под ред. Г.Я. Бей-Биенко. Т. 1. М.; Л.: Наука, 1964. 936 с.

19. Labonne G., Yvon M., Quiot J.B., Avinent L., Llacer G. Aphids as potential vector of plum pox virus: comparison of methods of testing and epidemiological sequences // *Acta Hort.* 1995. Vol. 386. P. 207–216.

20. Приходько Ю.Н., Мазурин Е.С., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А., Соколова Е.Е. Изучение штаммов вируса

шарки сливы // *Защита и карантин растений*. 2011. № 11. С. 29–32.

21. Glasa M., Malinowski T., Predajna L., Pupola N., Dekena D., Michalczyk L., Candresse T. Sequence variability, recombination analysis and specific detection of the W strain of Plum pox virus // *Phytopathology*. 2011. Vol. 101. N 8. P. 980–985.

22. Sheveleva A., Chirkov S., Nemova E. Detection of a new Winona-like Plum pox virus isolate in naturally infected Canadian plum (*Prunus nigra*) in Russia // *Acta Hort.* 2011. Vol. 899. P. 49–56.

23. Simmons H.E., Munkvold G.P. Seed transmission in the Potyviridae // *Global perspectives of the health of seeds and plant propagation material* / Eds. M.L. Gullino and G.P. Munkvold. Dordrecht: Springer, 2014. P. 3–15.

24. Pasquini G., Simeone A.M., Conte L., Barba M. RT-PCR evidence of the non-transmission through seed of Plum pox virus strains D and M // *J. Plant Pathol.* 2000. Vol. 82. N 3. P. 221–226.

Поступила в редакцию
30.12.15

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NOVEL ISOLATES OF PLUM POX VIRUS STRAIN WINONA

A.V. Zakubanskiy, A.A. Sheveleva, S.N. Chirkov*

Department of Virology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

*email: s-chirkov1@yandex.ru

Plum pox virus (PPV, genus *Potyvirus*, family Potyviridae) is considered to be the most detrimental viral pathogen of stone fruit crops (*Prunus* spp.). The strain Winona (PPV-W) is the most variable strain of the nine recognized strains of the virus and is one of the most common in European Russia. Six new PPV-W isolates were first found in decorative green plantings of the city of Moscow (Kp2U, Avang, Pulk, Pulk-1), also in the Taldom district of the Moscow region (Karm) and in the Kovrov district of the Vladimir region (Vlad-4) on wild plums *Prunus domestica*. Analysis of the 3'-terminal genome segment of the novel isolates confirmed the high level of the PPV-W intra-strain diversity. Study of their relationship with other PPV-W isolates using the phylogenetic analysis of the coat protein gene's sequences revealed no geographical clustering of the Russian PPV-W isolates. The aphid and seed transmission of the PPV-W was also investigated. Inoculation of *Nicotiana benthamiana* plants by the hop aphid *Phorodon humuli* from the plums, infected with the isolates Avang and Pulk, and by the thistle aphid *Brachycaudus cardui* from the plum, infected with the isolate Kp2U, was shown to result in the systemic infection of tobacco plants thus indicating the possibility of the natural PPV-W transmission by both aphid species. No evidence of the PPV-W seed transmission has been obtained.

Key words: plum pox virus, strain Winona, phylogenetic analysis, hop aphid *Phorodon humuli*, thistle aphid *Brachycaudus cardui*.

Сведения об авторах:

Закубанский Александр Владимирович — аспирант кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: zakubanskiy93@mail.ru

Шевелева Анна Александровна — мл. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: annnsh@yandex.ru

Чирков Сергей Николаевич — докт. биол. наук., вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 632.3

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ВИРУСОВ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ВИНОГРАДА 1 И 3
(GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUSES-1 И -3) НА ТЕРРИТОРИИ КРЫМА

Е.В. Поротикова¹, В.И. Рисованная², Я.А. Волков², Ю.Д. Дмитренко¹,
В.А. Володин², С.М. Гориславец², Е.П. Странишевская², А.А. Аграновский³,
А.М. Камионская¹, С.В. Виноградова^{1,*}

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”, РАН;
Россия, 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2;

² Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия “МАГАРАЧ”, РАН;
Россия, 298600, Республика Крым, г. Ялта, ул. Кирова, д. 31;

³ кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: coatprotein@bk.ru

Скручивание листьев винограда, вызываемое комплексом вирусов, является одним из самых распространенных и вредоносных вирусных заболеваний этой культуры. Для изучения распространенности вирусов скручивания листьев винограда 1 и 3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 — GLRaV-1 и grapevine leafroll-associated viruses-3 — GLRaV-3) было проведено обследование виноградных насаждений в шести районах Крыма в осенний и весенний период 2015 г. Отобрано 689 образцов с симптомами вирусной инфекции. Диагностику проводили методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции, продукты реакции секвенировали. GLRaV-1 и GLRaV-3 были обнаружены в 34 (4,9%) и 37 (5,4%) образцах соответственно. В обследованных хозяйствах Севастопольского и Бахчисарайского района GLRaV-1 и GLRaV-3 обнаружены не были.

Ключевые слова: *Vitis vinifera*, виноград, вирусные заболевания винограда, вирус скручивания листьев винограда 1, вирус скручивания листьев винограда 3, виноградники Крыма.

Виноград (*Vitis vinifera* L.) — одна из наиболее значимых культур южных областей России, высокая урожайность которой зависит от качественного посадочного материала и фитосанитарного состояния насаждений. Вирусные патогены являются серьезной проблемой для возделывания виноградников во всем мире.

В настоящее время обнаружено около 70 вирусов, поражающих виноград [1]. Скручивание его листьев является одним из наиболее вредоносных и широко распространенных вирусных заболеваний виноградной лозы, которое приводит к снижению урожайности на 15–40% [1]. На инфицированных растениях формируются мелкие, плохо вызревающие ягоды. Содержание простых углеводов в соке ягод снижается на 5–26%, ухудшаются окраска и внешний вид гроздей.

Скручивание листьев виноградной лозы вызывается несколькими вирусами семейства *Closteroviridae*, часто совместно поражающими растения [4]. Характерным симптомом заболевания является скручивание листьев краями вниз. Наиболее сильно симптомы выражены на темноягодных сортах винограда, у которых также наблюдается раннее покраснение листовых пластинок вдоль жилок листа. У светлаягодных сортов заболевание проявляется в виде слабого хлороза [2, 4–7]. Симптомы

значительно варьируют в зависимости от вида и изолята вируса, сорта винограда, погодных условий. Кроме того, инфекция может быть бессимптомной [5].

Основные возбудители болезни скручивания листьев — вирусы скручивания листьев винограда-1 и -3 (grapevine leafroll-associated viruses-1 — GLRaV-1 и grapevine leafroll-associated viruses-3 — GLRaV-3) рода *Ampelovirus*. Симптомы поражения GLRaV-1 и GLRaV-3 незначительно различаются между собой, однако для GLRaV-3 характерно более сильное изменение окраски листьев, особенно для сортов с окрашенными ягодами [4, 8, 9]. GLRaV-1 и GLRaV-3 распространяются при прививках винограда и переносятся полуперсистентно мучнистыми червецами семейства *Pseudococcidae* и ложнощитовками семейства *Coccidae* [10].

Присутствие GLRaV-1 и GLRaV-3 было отмечено во всех основных винодельческих регионах Европы, Северной и Южной Америки, Африки, Азии и Океании [12]. Данные по распространению скручивания листьев винограда в винодельческих зонах России практически отсутствуют. В литературе встречаются лишь единичные упоминания обследования двух районов Крыма [12]. Целью данной работы было изучить распространение GLRaV-1 и GLRaV-3 на виноградниках Крыма.

Материалы и методы

Обследования виноградников и отбор образцов растений с симптомами вирусных заболеваний проводили в осенний и весенний период 2015 г. В зависимости от размера участка и частоты встречаемости симптомов обследовали от 25% до 33% растений винограда (осматривали каждый четвертый и каждый третий ряды, соответственно). На массивах виноградников одного сорта и года посадки площадью свыше 10 га — обследовали до 5–10% растений. Осмотр растений проводили по диагонали виноградника, при этом исследовали все кусты в рядах с обеих сторон по всей длине маршрута, а также растения в крайних рядах. Пораженные растения выявляли визуально.

Из отобранных образцов выделяли суммарную РНК по методике, описанной Ротт и Йелкман [13]. Качество выделения контролировали методом электрофоретического анализа. РНК использовали для синтеза кДНК обратной транскриптазой RevertAid H Minus (Thermo Scientific™, каталожный номер EP0451) по протоколу производителя. Полученную кДНК добавляли в качестве матрицы для полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами. ПЦР проводили с использованием реактивов Thermo Scientific™ (каталожный номер EP0405) на амплификаторе Gene Amp 9700 PCR System, Applied Biosystems. Условия амплификации были следующими: 95°C — 2 мин, 95°C — 30 с, 56°C (или 61°C) — 45 с, 72°C — 60 с, 72°C — 2 мин. Для анализа наличия GLRaV-1 использовали праймеры CPV 5'-ATGGCTAGCGTTATATCTCAAA-3' и CPC 5'-CCGGTTGGTAATACTACCGAAA-3', температура отжига праймеров 61°C [14]. Для анализа наличия GLRaV-3 использовали специфические праймеры 547F 5'-ATTAACCTTGACGGATGGCACGC-3' и H229 5'-ATAAGCATTCGGGATGGACC-3', температура отжига праймеров 56°C [15]. Каждый образец суммарной РНК анализировали индивидуально. Продукты обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) разделяли в 1%-ном агарозном геле. Продукты амплификации выделяли из агарозного геля с использованием набора Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», каталожный номер BC022) по протоколу производителя. ДНК секвенировали

с использованием реактивов Big Dye Terminator v3.1 chemistry на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 согласно инструкциям производителя.

Результаты и обсуждение

Обследование виноградников на наличие вирусов скручивания проводили в одиннадцати хозяйствах шести виноградарских зон Крыма: Алуштинского, Ялтинского, Севастопольского, Бахчисарайского, Судакского и Симферопольского районов.

В 2015 г. наблюдались оптимальные погодные условия для распространения GLRaV-1 и GLRaV-3 переносчиками, мучнистыми червецами и ложнощитовками, наличие которых было отмечено на виноградниках обследованных территорий.

На виноградных насаждениях Крыма в первой половине лета 2015 г. обнаруживали растения со слабо деформированными и гофрированными листовыми пластинками. Слабое скручивание листьев и покраснение в этот период проявлялись на нижних листьях единичных растений. Характерные симптомы скручивания листьев винограда наблюдали во второй половине лета 2015 г., при этом окраска и размер ягод визуально не отличались от таковых у бессимптомных растений. Угнетение роста кустов, как правило, не наблюдали. К концу вегетации было отмечено увеличение покраснения листьев. В молодых насаждениях растения с симптомами вирусной инфекции были распределены по всей территории участка. В насаждениях старше 10 лет пораженные растения встречались одиночно или группами по 2–6 лоз, при этом на старых побегах и на участках виноградников, испытывавших недостаток воды, симптомы скручивания проявлялись наиболее интенсивно.

По результатам проведенных обследований было отобрано 689 образцов винограда с симптомами вирусных заболеваний. Каждый образец анализировали на наличие GLRaV-1 и GLRaV-3. Фрагмент электрофореграммы представлен на рис. 1. В результате секвенирования продуктов ПЦР и сравнения с последовательностями, имеющимися в GenBank [16], было подтверждено наличие GLRaV-1 и GLRaV-3 в исследуемых образцах.

GLRaV-1 выявлен в 34 образцах, что составило 4,9% от общего количества растений с симптомами

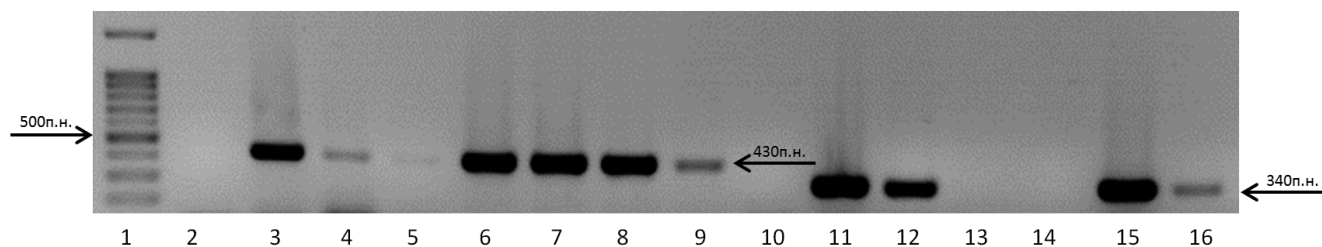


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, специфичных к GLRaV-1 (дорожки 2–10) и GLRaV-3 (дорожки 11–16): 1 — маркер молекулярной массы (100 bp DNA Ladder Mix, Евроген); 2, 13 — ОТ-ПЦР в отсутствие ДНК-матрицы (отрицательный контроль); 10, 14 — ОТ-ПЦР с суммарной РНК, выделенной из здоровых растений; 3–9, 11, 12, 15, 16 — ОТ-ПЦР с суммарной РНК, выделенной из образцов листьев винограда с симптомами вирусного заболевания

вирусной инфекции. Присутствие GLRaV-3 было подтверждено в 37 образцах (5,4%). Смешанной инфекции GLRaV-1 и GLRaV-3 в индивидуальных образцах обнаружено не было. Распространение вирусов скручивания по отдельным хозяйствам представлено на рис. 2.

GLRaV-1 был обнаружен в хозяйствах Судакского, Алуштинского и Ялтинского районов, при этом максимальное распространение было отмечено в хозяйствах Ялтинского района (9,6% от общего количества отобранных образцов). В хозяйствах Севастопольского, Симферопольского и Бахчисарайского районов GLRaV-1 не выявлен.

GLRaV-3 был обнаружен в хозяйствах Судакского, Алуштинского, Ялтинского и Симферопольского районов, наибольшее распространение вируса отмечено в хозяйствах Ялтинского района (9,6%). В обследованных хозяйствах Севастопольского и Бахчисарайского районов GLRaV-3 не обнаружен.

Полученные нами данные подтверждают опубликованную ранее предварительную информацию о присутствии GLRaV-1 и GLRaV-3 в хозяйствах Крыма [12]. На основании результатов полевых обследований и лабораторной идентификации можно рекомендовать фитосанитарные меры (выбраковка растений с симптомами заболевания скручивания листьев) и методы биологического контроля (применение инсектицидов против насекомых-векторов) для снижения заболеваемости растений винограда в хозяйствах Крыма. Дальнейшие исследования

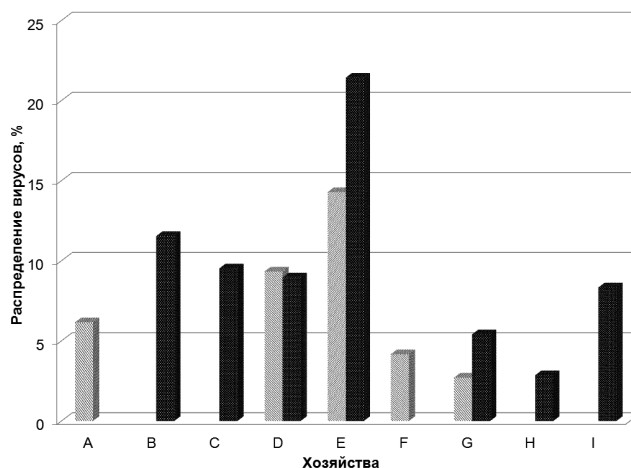


Рис. 2. Распространение GLRaV-1 (светлые столбцы) и GLRaV-3 (темные столбцы) в виноградарских хозяйствах Крыма в 2015 г.: хозяйства А, В, С - Алуштинский район; хозяйства D, Е - Ялтинский район; хозяйства F, G, H - Судакский район; хозяйство I - Симферопольский район

будут направлены на идентификацию других потенциальных возбудителей заболевания скручивания листьев винограда в Крыму (таких, как GLRaV-2, -4, -5, -6 и -7).

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (субсидия № 14.604.21.0145), уникальный идентификатор прикладных научных исследований RFMEFI60414X0145.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Martelli G. P. Grapevine-infecting viruses // Eur. J. Plant Pathol. 2014. Vol. 96. N 1. Suppl. P. 7–8.
2. Jooste A., Molenaar N., Maree H. J., Bester R., Morey L., De Koker W. C., Burger J. T. Identification and distribution of multiple virus infections in grapevine leafroll diseased vineyards // Eur. J. Plant Pathol. 2015. Vol. 142. N 2. P. 127–144.
3. Ghanem-Sabanadzovic N., Sabanadzovic S., Gugerli P., Rowhani A. Genome organization, serology and phylogeny of grapevine-leafroll associated viruses 4 and 6: Taxonomic implications // Virus Res. 2010. Vol. 163. N 1. P. 120–128.
4. Martelli G.P. Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis. Rome: FAO, 1993. 263 p.
5. Rowhani A., Uyemoto J., Deborah A. Golino D. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll-associated viruses // Plant Dis. 1997. Vol. 81. N 7. P. 799–801.
6. Krake L.R. Characterization of grapevine leafroll disease by symptomatology // Australian and New Zealand Wine Industry Journal. 1993. Vol. 8. N 1. P. 40–44.
7. Hu J.S., Gonsalves D., Teliz D. Characterization of closterovirus-like particles associated with grapevine leafroll disease // J. Phytopathol. 1990. Vol. 128. N 1. P. 1–14.
8. Volpe M.L., Talquenca S.G., Engel E.A., Gracia O. Incidence of grapevine leafroll associated viruses -1, -2, and -3 in mendoza vineyards // Trop. Plant Pathol. 2010. Vol. 35. N 6. P. 377–380.
9. Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. Control of viruses infecting grapevine // Adv. Virus Res. 2015. Vol. 91. P. 175–227.
10. Haidar M.M., Diglaro M., Khoury W., Savino V. Viruses and virus diseases of grapevine in Lebanon // EPPO Bull. 1996. Vol. 26. N 1. P. 147–153.
11. Maree H. J., Almeida R.P. Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolia V.V., Fuchs M.F., Golino D.A., Jooste A.E., Martelli G.P., Naidu R.A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J.T. Grapevine leafroll-associated virus 3 // Front Microbiol. 2013. Vol. 4. N 82. P. 1–21.
12. Zhun'ko I.D., Limanska N.V., Milkus B.N. The spread of grapevine viruses on the south Ukraine // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Біологія. 2008. № 51. P. 56–57.
13. Rott M.E., Jelkmann W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry, adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol // Eur. J. Plant Pathol. 2001. Vol. 107. N 4. P. 411–420.
14. Жунько И.Д. Вирусы-возбудители болезней винограда на Юге Украины (диагностика и распространение): Автореф. дис. ... канд. наук. Одесса, 2006. 161 с.
15. Minafra A., Hadidi A. Sensitive detection of grapevine viruses A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification // J. Virol. Methods. 1994. Vol. 47. N 1–2. P. 175–188.
16. Официальный сайт Национального центра биотехнологической информации США [Электронный ресурс]. 2016. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 18.03.2016).

OCCURRENCE OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUSES-1 AND -3 IN CRIMEA

E.V. Porotikova¹, V.I. Risovannaya², Y.A. Volkov², U.D. Dmitrenko¹, V.A. Volodin², S.M. Gorislavets², E.P. Stranishvskaya², A.A. Agranovsky³, A.M. Kamionskaya¹, S.V. Vinogradova^{1,}*

¹ Research Center of Biotechnology, RAS, 33-2 Leninsky Prospect, Moscow, 119071, Russia;

² All-Russian National Research Institute for Viticulture and Wine-making "Magarach",
31 Kirov Ul., Yalta, Republic of the Crimea, 298600, Russia;

³ Department of Virology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1-12 Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: coatprotein@bk.ru

Grapevine leafroll is one of the most widespread and harmful diseases of grapevine. To investigate the occurrence of grapevine leafroll-associated viruses-1 and 3, the survey of vineyards has been conducted in 2015 in six regions of Crimea. Total of 689 leaf samples with virus symptoms were collected. GLRaV-1 and GLRaV-3 were analysed by RT-PCR with the specific primers, followed by sequencing of the PCR products. GLRaV-1 and GLRaV-3 were detected in 34 (4.9%) and 37 (5.4%) of the samples, respectively. Vineyards in Simferopol, Bahchisaray and Sevastopol regions were found to be free of GLRaV-1 and GLRaV-3.

Key words: *Vitis vinifera*, grapevine, grapevine virus pathogens, grapevine leafroll-associated viruses-1, grapevine leafroll-associated viruses-3, Crimea vineyards.

Сведения об авторах:

Поротикова Елена Владимировна — мл. науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: plantvirus@mail.ru.

Рисованная Валентина Ивановна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. группы молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-018-74-62; e-mail: vrisovan@rambler.ru.

Волков Яков Александрович — к.с.-х.н., науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-039-26-65; e-mail: biohappy@ya.ru.

Дмитренко Юлиана Дмитриевна — лаб. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: dmitrenko_uliana@mail.ru.

Володин Виталий Александрович — аспирант, мл. науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-798-82-54; e-mail: vldinvitalja@rambler.ru.

Гориславец Светлана Михайловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований, Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-923-11-94; e-mail: goricvet_2@rambler.ru.

Странишевская Елена Павловна — д.с.-х.н., нач. отдела биологически чистой продукции и молекулярно-генетических исследований Всероссийского национального научно-исследовательского института виноградарства и виноделия "Магарач" РАН. Тел.: 8-978-768-63-28; e-mail: stellar1@rambler.ru.

Аграновский Алексей Анатольевич — докт. биол. наук, зав. лаб. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-63; e-mail: aaa@genebee.msu.su.

Камионская Анастасия Михайловна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: akatio@biengi.ac.ru.

Виноградова Светлана Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории системной биологии растений Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии" РАН. Тел.: 8-495-308-99-96; e-mail: coatprotein@bk.ru.

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.282:581.95

НОВЫЕ НАХОДКИ ЭНДОФИТНЫХ ГРИБОВ. КОРОТКОЕ СООБЩЕНИЕ

Е.Ю. Благовещенская*, Е.Г. Попкова

Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

* e-mail: kathryn@yandex.ru

На территории Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского, расположенной в Московской области, обнаружено присутствие эндофитных грибов в природных популяциях овсяницы гигантской (*Festuca gigantea* (L.) Vill.) и пырейника собачьего (*Elymus caninus* (L.) L.). Проведено выделение чистых культур эндофитов из инфицированных семян. Все полученные изоляты отнесены к виду *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel.

Ключевые слова: эндофиты злаков, симбиоз, *Epichloë*, *Neotyphodium*, *Festuca*, *Elymus*.

Эндофиты злаков — это довольно известная группа эндосимбиотических грибов из трибы *Valansiae* (Clavicipitaceae, Hypocreales, Sordariomycetes, Pezizomycotina, Ascomycota). Они бессимптомно присутствуют во многих культурных и дикорастущих злаках преимущественно трибы *Poeae* как в Старом, так и в Новом Свете. Многие эндофиты синтезируют алкалоиды, токсичные для крупного рогатого скота и для насекомых-фитофагов [1, 2]. Поскольку эти грибы являются специализированными биотрофами, отличаются сложностью выделения в чистую культуру, крайне медленным ростом на питательных средах и, как правило, не проявляются ни на какой из стадий своего жизненного цикла, распространяясь через семена растения-хозяина, то их обнаружение в природе крайне затруднено, особенно это касается дикорастущих злаков. Для России ранее было показано присутствие эндофитов вида *Neotyphodium uncinatum* (W. Gams, Petrini et D. Schmidt) Glenn, C.W. Bacon et Hanlin в дикорастущих растениях овсяницы луговой (*Festuca pratensis* Huds) на территории Московской и Брянской областей, а так же в некоторых российских сортах этого же вида (сорта ВИК 5 и Краснопоименская) [3], в целом же данная группа организмов в нашей стране остается мало изученной.

Материалы и методы

На территории Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского биологического факультета МГУ (ЗБС МГУ) летом 2014 г. были обследованы природные популяции злаков в вегетирующем состоянии, а также собраны семена для последующей работы. Присутствие эндофитов в семенах проверяли цитологическим методом. Эндофиты в чистую культуру выделили путем инкубации поверхностно стерилизованных семян на картофельно-глюкозном агаре в течение 60 сут [3]. Получен-

ные изоляты микроскопировали на Leica DM500. Спороносящие культуры были исследованы с помощью сканирующего аналитического электронного микроскопа JSM-6380LA с рентгеноспектральным анализатором JED-2300 в лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Результаты и обсуждение

На территории ЗБС МГУ были обнаружены эндофитные грибы в растениях овсяницы гигантской (*Festuca gigantea* (L.) Vill.; триба *Poeae*) и пырейника собачьего (*Elymus caninus* (L.) L., триба *Triticeae*). Ранее зараженные эндофитами образцы овсяницы гигантской отмечены на территории Новой Зеландии [1], Швейцарии [4] и Франции [5], но выделение чистых культур грибов и идентификация видов в этих работах не проводились. Что касается пырейника, то единственное упоминание этого растения-хозяина тоже относится к территории России — группой исследователей недавно была проведена масштабная проверка молекулярными методами образцов семян злаков именно данной трибы из разных регионов, в том числе часть проверяемых образцов была получена из Российской Федерации (семена, собранные на территории Сибири) [6]. Получение чистых культур эндофитных грибов в данной работе также не проводили.

Нам удалось получить изоляты эндофитных грибов из инфицированных семян обоих видов растений. Основная часть изолятов была стерильной, но некоторые (3 из 18 изолятов овсяницы, и 7 из 12 для изолятов пырейника), формировали конидиальное спороношение (рисунок). По строению конидиеносцев и конидий полученные культуры были идентифицированы как *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel.

Таким образом, систематическое обследование дикорастущих трав, по-видимому, позволит обна-



Рисунок. Фиалида *Epichloë festucae*, штамм Ely002

ружить новых хозяев эндосимбиотических грибов и получить новые изоляты.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegel M.R., Latch G.C.M., Bush L.P., Fannin F.F., Rowan D.D., Tapper B.A., Bacon C.W., Johnson M.C. Fungal endophyte-infected grasses: alkaloid accumulation and aphid response // J. Chem. Ecol. 1990. Vol. 16. N 12. P. 3301–3315.
2. Clay K., Schardl C.L. Evolutionary origin and ecological consequences of endophyte symbioses with grasses // Amer. Nat. 2002. Vol. 160. N S4. P. S99–S127.
3. Благовещенская Е.Ю. Эндوفитные грибы злаков. Дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2006. 138 с.
4. Leuchtmann A., Schmidt D., Bush L.P. Different levels of protective alkaloids in grasses with stroma forming and seed-

transmitted *Epichloë/Neotyphodium* endophytes // J. Chem. Ecol. 2000. Vol. 26. N 4. P. 1025–1036.

5. Leyronas C., Raynal G. Presence of *Neotyphodium*-like endophytes in European grasses // Ann. Appl. Biol. 2001. Vol. 139. N 1. P. 119–127.

6. Card S.D., Faville M.J., Simpson W.R., Johnson R.D., Voisey C.R., de Bonth A.C.M., Hume D.E. Mutualistic fungal endophytes in the Triticeae — survey and description // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. Vol. 88. N 1. P. 94–106.

Поступила в редакцию
04.03.16

NEW FINDS OF ENDOPHYTIC FUNGI. A BRIEF NOTE

E.Yu. Blagoveshchenskaya*, E.G. Popkova

Department of mycology and algology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University; 1-12 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;

* e-mail: kathryn@yandex.ru

Endophytic fungi are found in natural populations of giant fescue (*Festuca gigantea* (L.) Vill.) and bearded wheatgrass (*Elymus caninus* (L.) L.) on the territory of S.N. Skadovsky Zvenigorod Biological Station (Moscow Region). Endophytes were isolated from infected seeds of both grass species. All isolates were identified as *Epichloë festucae* Leuchtm., Schardl & M.R. Siegel.

Key words: grass endophytes, symbiosis, *Epichloë*, *Neotyphodium*, *Festuca*, *Elymus*.

Сведения об авторах:

Благовещенская Екатерина Юрьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kathryn@yandex.ru

Попкова Екатерина Геннадиевна — аспирантка кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-54-82; e-mail: kattyworld@yandex.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 581.162+582.26

ВЛИЯНИЕ ПЛОТНОСТИ КУЛЬТУРЫ НА ПОЛОВОЕ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ
ARDISSONEA CRYSTALLINA (BACILLARIOPHYTA)

Ю.А. Подунай*, О.И. Давидович, Н.А. Давидович

*Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН;
Россия, 298188, г. Феодосия, п. Курортное, ул. Науки, д. 24*** e-mail: grab-ua@yandex.ru*

Наблюдения показывают, что одним из ключевых факторов, влияющих на половое воспроизведение диатомовых водорослей, является характерная для каждого вида концентрация клеток, используемых в скрещенных посевах. От плотности культуры может зависеть концентрация феромонов, инициирующих гаметогенез у клеток противоположного пола. Изучено влияние плотности и характера посева клеток в смешанной культуре на репродукцию интересного в таксономическом смысле вида диатомовых водорослей *Ardissonaea crystallina* (С. Agardh) Grunow, клетки которого были выделены из проб, отобранных в акватории г. Севастополя (Черное море). Исследована зависимость интенсивности полового процесса от начальной концентрации клеток. Показано, что уменьшение плотности посева также может увеличивать время, необходимое для начала гетероталлического полового воспроизведения. Рассчитан оптимум концентрации клеток в объеме среды, наиболее благоприятный для воспроизведения вида. При увеличении объема среды, в которую засеваются репродуктивно совместимые клоны, оптимум концентрации клеток сдвигается к большим значениям. Если же начальная концентрация клеток оказывается выше оптимальной плотности, то чаще всего воспроизведение не наступает, т.к. на культуру, по всей видимости, начинает оказывать влияние перенасыщение среды продуктами метаболизма клеток.

Ключевые слова: *Ardissonaea crystallina*, половое воспроизведение, инициальные клетки, феромоны, концентрация клеток.

Диатомовые водоросли имеют особенности, отличающие их от остальных одноклеточных водорослей. Вегетативное деление клетки приводит к образованию двух дочерних клеток, одна из которых имеет размер, меньший, чем родительская [1]. Поэтому при делении размер клеток диатомовых постепенно уменьшается, и в определенный момент жизненного цикла должно произойти событие, позволяющее вернуться к исходным размерам. У диатомовых восстановление размеров обычно связано с половым воспроизведением, в результате которого происходит формирование особых клеток, получивших название ауксоспоры [2, 3]. Ауксоспоры способны быстро увеличиваться до максимального видоспецифического размера. Изучение полового воспроизведения диатомовых водорослей началось с XVIII века, вскоре после того, как стали доступны микроскопические методы исследования. К настоящему времени накоплены данные о жизненном цикле нескольких сотен диатомовых водорослей, однако это количество выглядит небольшим, если сравнить его с предполагаемыми в природе 100 тысячами видов [4]. На половое воспроизведение диатомовых водорослей в первую очередь оказывает влияние длина родительских клеток, которые должны уменьшиться до определенного размера, так называемой кардинальной точки [1, 2, 5, 6]. Кроме

этого, на интенсивность полового процесса у диатомей влияние также могут оказывать факторы окружающей среды, в частности, условия освещения (интенсивность и фотопериод) [7–9], соленость среды [10], движение воды [6]. Также имеются единичные данные о влиянии на половое воспроизведение диатомовых водорослей фактора начальной плотности посева, т.е. концентрации клеток в смеси родительских клонов при гетероталлическом воспроизведении [11]. Плотность культуры может выступать одним из лимитирующих факторов при проведении экспериментов по изучению полового воспроизведения. Она может быть напрямую связана с выделением клетками родительских клонов феромонов — особой группы веществ, которые инициируют гаметогенез у противоположного пола [12, 13].

Ardissonaea crystallina (С. Agardh) Grunow интересна для исследования своей таксономической позицией. В рамках классической таксономии [14] вид относили к классу Fragilariophyceae, тогда как по результатам молекулярных исследований была показана принадлежность вида к биполярным центрическим диатомовым, или классу Mediophyceae [15, 16]. Для выяснения таксономической позиции этого рода необходимым представляется изучение полового воспроизведения и установление типа полового процесса, который, как известно,

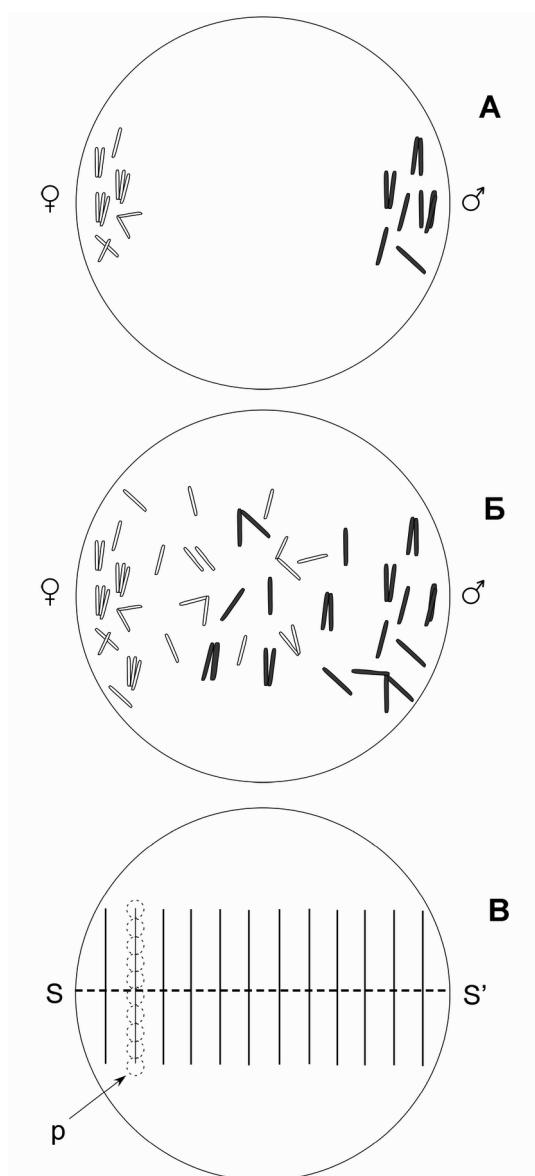


Рис. 1. Схема эксперимента для проверки возможности взаимодействия клеток — половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга: **А** — клетки мужского и женского пола посеяны напротив друг друга без возможности их смешивания; **Б** — через 5–6 сут вегетативно размножившиеся клетки обоих полов пришли в соприкосновение друг с другом; **В** — схема подсчета клеток: S–S' — диаметральная транссекта, вдоль которой происходил подсчет вегетативных и генеративных клеток в 10 полях зрения (Р) на поперечных отрезках (на рисунке поля показаны только для одного из отрезков)

принципиально различен у центрических и пеннатных диатомовых [1]. Детальное описание типа полового процесса и анализ таксономического положения рода будут представлены в отдельной статье. Настоящая работа сфокусирована на эколого-физиологических факторах, определяющих успешность полового процесса. Одним из них является плотность посева, при которой воспроизведение возможно. Важно знать также оптимальную плотность, при которой интенсивность полового процесса будет максимальной.

Материалы и методы

Пробы отобраны в бухте Казачья (г. Севастополь, Черное море) в период с 2011 по 2013 г., в двух метрах от берега на глубине около 40 см. Одиночные клетки *Ardissonea crystallina* выделены при помощи микропипетки в клоновые культуры, которые содержались на искусственной морской воде (20‰), приготовленной по рецепту ESAW [17] с небольшими модификациями [18]. Культивирование проводили в стеклянных чашках Петри диаметром 9 см и высотой 1,4 см при наполнении средой 15–20 мл. Чашки находились в изолированной комнате с постоянной температурой $20 \pm 2^\circ\text{C}$ на полках у окон, обращенных на север, — таким образом обеспечивалось естественное освещение. Для скрещивания использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, которую поддерживали еженедельным пересевом в свежую питательную среду. В экспериментах по скрещиванию использованы клоны, средняя длина клеток в которых очевидно различалась, что позволяло при наблюдении в смеси установить принадлежность клетки к конкретному клону.

Для экспериментов по плотности посева репродуктивно совместимые клоны *A. crystallina* 3.0726-D и 3.0711-C скрещивали в начальной концентрации от 150 до 4500 клеток на cm^2 дна чашки. В каждом эксперименте применили 6 различных концентраций посева (максимальная от минимальной отличалась в 32 раза). Также при одинаковой плотности начального посева использовали чашки Петри разного диаметра — 50 и 60 мм, в которые добавляли 10 и 15 мл среды соответственно. Посевы осуществляли утром, исходную концентрацию клеток на площади дна определяли вечером в день посева.

Было проверено взаимодействие клеток — половых партнеров, посеянных на удалении друг от друга. Для этого в чашки диаметром 7 см клоны противоположного пола помещали диаметрально противоположно (рис. 1, А) так, чтобы нараставшие клетки через несколько дней пришли в соприкосновение на середине чашки (рис. 1, Б). Подсчет относительного количества генеративных клеток проводили по диаметральной транссекте чашки с шагом в 5 мм (рис. 1, В). На каждом шаге на отрезке 30 мм поперек транссекты просчитывали клетки в 10–15 полях зрения.

Для определения активности полового воспроизведения оценивали отношение количества половых клеток к общему количеству клеток в поле зрения. К половым или генеративным клеткам относили гаметы, зиготы, ауксоспоры, инициальные клетки. Результат выражали в процентах. Данные получены на основании трех повторных экспериментов.

Для наблюдения использовали микроскоп Biolag PI (PZO, Польша), настроенный по методу дифференциально-интерференционного контраста и освещении по Кёлеру [19].

Результаты

A. crystallina — это морская диатомовая водоросль, обитающая в прибрежной зоне на дне чаще всего как эпифит на различных макрофитах. Встречаются как одиночные клетки, так и группы клеток (от двух до нескольких десятков клеток). Одним из концов клетки крепятся к субстрату с помощью выделяемой слизи. Образованная слизистая подушка может занимать сравнительно большую площадь, ее размер зависит как от количества клеток в группе, так и от размера самих клеток. Клетки *A. crystallina* довольно крупные (в жизненном цикле их размер меняется в диапазоне 65–680 мкм), имеют вытянутую форму и содержат множество хлоропластов, равномерно распределенных по всей длине клетки.

По результатам экспериментов видно (рис. 2, А), что при гетероталлическом воспроизведении *A. crystallina* оптимальная начальная концентрация составила 800–1200 клеток/см² в изученном диапазоне плотности посева от 120 до 4100 клеток/см² (при объеме среды 1,57 мл на каждый см² дна чашки). Воспроизведение в смешанных посевах начиналось на 4–6-е сут. При концентрации клеток меньше 130 на см² воспроизведение на 6–7-е сут не наблюдали. При увеличении начальной концентрации клеток в чашке свыше 1500 клеток/см² происходило постепенное уменьшение интенсивности полового процесса, которое выражалось в уменьшении количества образовавшихся гамет и ауксоспор.

В чашках с меньшей начальной плотностью посева (от 100 до 3000 клеток/см² воспроизведение начиналось позже, на 9–10-е сут (рис. 2, Б). Следует обратить внимание на то, что ко времени подсчета генеративных клеток общее количество клеток в смеси существенно возрастало за счет вегетативного размножения, поэтому максимум интенсивности воспроизведения, приходящийся на меньшую начальную плотность, соответствовал в данном случае относительно высокой конечной плотности.

В одном из экспериментов смешанный посев сделан в чашках Петри с увеличенным объемом добавляемой среды (1,88 мл на см²). При большем объеме среды, приходящемся на единицу площади дна, интенсивность воспроизведения не уменьшалась даже при начальной плотности посева достигающей 4200 клеток/см² (рис. 2, В).

Также был проведен эксперимент, в котором в чашку Петри с диаметром 80 мм репродуктивно совместимые клоны засеяли с двух сторон чашки так, чтобы вначале они не контактировали друг с другом (см. Материалы и методы, рис. 1). В этом эксперименте участвовали две пары клонов. Одна пара клонов 3.0726-Д и 3.0711-С, как было ранее установлено, воспроизводилась гетероталлическим путем, клон 3.0711-С давал мужские гаметы, клон 3.0726-Д — женские; во второй паре клон 3.0722-Е с большим размером клеток сам гамет не продуцировал, однако стимулировал гаметогенез и гомоталлическое воспроизведение у клона 3.0722-А



Рис. 2. Количество генеративных клеток в смеси репродуктивно совместимых клонов 3.0726-Д и 3.0711-С *Ardissonea crystallina*. А — на 6-е сут эксперимента при различной начальной плотности посева; Б — на 10-е сут эксперимента при различной начальной концентрации родительских клеток; В — на 6-е сут эксперимента при различной начальной плотности посева в увеличенном объеме среды, приходящемся на единицу площади дна

с меньшим размером клеток. В паре клонов 3.0726-Д и 3.0711-С воспроизведение началось на 4–5-е сут после посева. На половине чашки, занятой женским клоном 3.0726-Д с меньшим размером кле-

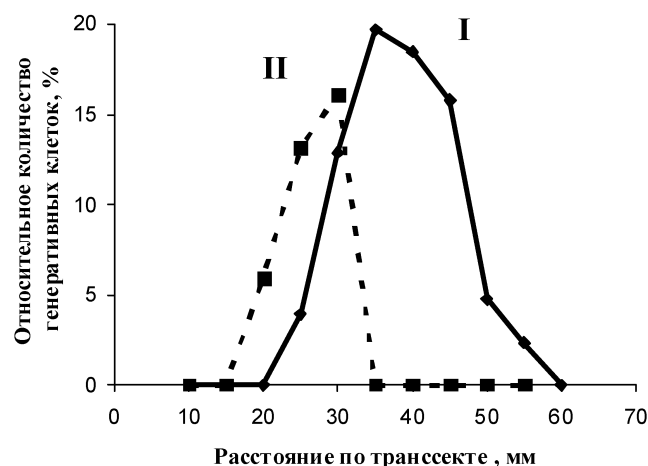


Рис. 3. Количество генеративных клеток в смеси репродуктивно совместимых клонов *Ardissonaea crystallina* на 6-е сут в двух экспериментах при пространственном разделении мужского и женского клона в чашке: I — распределение интенсивности полового процесса при гетероталлическом воспроизведении клонов 3.0726-D и 3.0711-C; II — распределение интенсивности полового процесса при гомоталлическом воспроизведении женского клона 3.0722-A в присутствии мужского клона 3.0722-E

ток можно было видеть гаметы, зиготы и растущие ауксоспоры, на второй половине с длинными мужскими клетками присутствовали только гаметы, никаких зигот и ауксоспор не наблюдалось. На границе клонов — максимальное по интенсивности воспроизведение. Возле стенок на двух противоположных сторонах чашки половых клеток не обнаружено (рис. 3, I).

Во второй паре наблюдалось смещение области максимума интенсивности воспроизведения от середины чашки в сторону гомоталлически воспроизводящегося клона (рис. 3, II).

Обсуждение

Клетки диатомовых водорослей способны перейти от вегетативного деления к половому размножению лишь при достижении ими определенных размеров [1, 2, 5, 20] и при сочетании необходимых внешних факторов [1]. Как показывают проведенные эксперименты, существенное влияние на возникновение и интенсивность полового воспроизведения оказывают начальная концентрация посева родительских клеток и взаимное пространственное расположение последних. При концентрации клеток ниже оптимальной вероятность встречи клеток после осуществления посева слишком мала для интенсивного полового воспроизведения в смеси. Поэтому при начальной плотности посева ниже определенного уровня, для *A. crystallina* — это около 130 клеток/см², половое воспроизведение начиналось гораздо позже — на 9–10-е сут вместо обычных 5–6-х сут, либо не возникало совсем. Объяснение этому, вероятно, следует искать, исходя из представлений о химическом взаимодействии клеток в процессе воспроизведения, которое осуще-

ствляется с помощью особой категории веществ — феромонов, как это было установлено на примере двух видов пеннатных диатомовых водорослей [12, 13, 21]. Показано, что феромоны выделяются клетками как мужских, так и женских клонов в определенной последовательности: выделение феромонов клетками женских клонов инициирует гаметогенез и ответное выделение феромонов у мужских клонов, которое в свою очередь вызывает гаметогенез у женских клонов [12]. В нашем случае задержка воспроизведения могла наблюдаться в связи с тем, что в первые дни плотность культуры не достигла величины, необходимой для адекватного взаимодействия клеток-половых партнеров. По этой же причине, очевидно, положение оптимума интенсивности полового процесса сдвигалось в сторону больших начальных концентраций клеток на единицу площади, если посеы осуществлялись в чашках Петри с большим объемом среды, приходящимся на единицу площади дна (рис. 2, В). Увеличение объема среды “разбавляло” феромоны.

При этом если начальная концентрация клеток оказывалась достаточно большой, но воспроизведение не наступало на 5–6-е сут, на культуру, по всей видимости, начинал оказывать влияние другой фактор — перенасыщение среды продуктами метаболизма клеток. При слишком плотном посеве в среде могут очень быстро накапливаться продукты метаболизма в такой концентрации, что тормозится не только воспроизведение клеток, но и их вегетативное размножение. Происходит нечто вроде “самоотравления”. Внешне это проявляется в переходе культуры в стационарную фазу роста, в то время как известно, что для реализации полового воспроизведения культуры должны находиться в стадии экспоненциального роста [22]. Таким образом, для достижения наибольшей интенсивности полового воспроизведения должно быть подобрано оптимальное сочетание плотности посева и объема среды. При значительном отклонении от оптимальных концентраций половое воспроизведение может не наступить совсем, при том, что будет наблюдаться быстрый рост численности клеток за счет вегетативного размножения.

Гипотезу о влиянии феромонов на половую активность клеток подтверждают результаты экспериментов, в которых клетки клонов различного пола были высажены с разных сторон чашки Петри. При межклоновом воспроизведении *A. crystallina* максимальное количество половых клеток, обнаруженное на границе встречи двух клонов, обусловлено не только увеличившейся вероятностью встречи родительских клеток, но и, очевидно, большей доступностью выделяемых феромонов. Следует упомянуть, что у *A. crystallina* доставка гамет к месту сингамии не может осуществляться за счет родительских клеток в силу их малоподвижности [23]. Чем дальше от границы соприкосновения клонов расположены клетки, тем интенсивность полового процесса оказывается меньшей. В связи с этим

очень показательно внутриклоновое воспроизведение женского клона при пространственно разделенном посеве (рис. 3, II). Если бы внутриклоновое воспроизведение происходило без воздействия феромонов мужского клона, то его интенсивность была бы равномерной по всей площади распространения женского клона. Мы же наблюдаем картину, когда максимальное количество половых клеток отмечено вблизи границы встречи двух клонов. На стороне женского клона у стенки чашки половых клеток не было совсем. Единственной причиной этого могут быть выделяемые клетками мужского клона феромоны, концентрация которых уменьшается с удалением от границы расположения мужского клона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Drebes. G.* Sexuality // *The Biology of Diatoms. Botanical Monographs* / Ed. by D. Werner. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. P. 250–283.
2. *Geitler L.* Der Formwechsel der pennaten Diatomeen (Kieselalgen) // *Archiv für Protistenkunde*. 1932. N. 78. P. 1–226.
3. *Рощин А.М.* Жизненные циклы диатомовых водорослей. Киев: Наукова думка, 1994. 171 с.
4. *Mann D.G., Vanormelingen P.* An inordinate fondness? The number, distributions and origins of diatom species // *J. Eukaryot. Microbiol.* 2013. Vol. 60. N 4. P. 414–420.
5. *Geitler L.* Reproduction and life history in diatoms // *Bot. Rev.* 1935. Vol. 1. N. 5. P. 149–161.
6. *Bates S.S., Davidovich N.A.* Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia* spp. // *LIFENAB: Life histories of microalgal species causing harmful blooms* (October 24–27). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2002. P. 31–36.
7. *Давидович Н.А.* Фоторегуляция полового воспроизведения у Bacillariophyta (Обзор) // *Альгология*. 2002. Т. 12. № 2. С. 259–272.
8. *Давидович Н.А., Чепурнов В.А.* Интенсивность аукоспорообразования у двух видов Bacillariophyta в зависимости от освещенности и продолжительности фотопериода // *Альгология*. 1993. Т. 3. № 3. С. 34–41.
9. *Mouget J.-L., Gastineau R., Davidovich O., Gaudin P., Davidovich N.A.* Light is a key factor in triggering sexual reproduction in the pennate diatom *Haslea ostrearia* // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009. Vol. 69. N 2. P. 194–201.
10. *Давидович Н.А., Давидович О.И.* Влияние солености на размножение и воспроизведение некоторых видов диатомовых водорослей // *Летопись природы: Том XXIII. 2006 год* / Под ред. А.Л. Морозовой. Симферополь: Н. Оріанда, 2008. С. 344–352.
11. *Gastineau R.* Biodiversité, reproduction et phylogénie des diatomées bleues du genre *Haslea* et valorisation de leurs pigments de type marennine. Le Mans: de l'Université du Maine, 2010. 328 pp.
12. *Sato S., Beakes G., Idei M., Nagumo T., Mann D.G.* Novel sex cells and evidence for sex pheromones in diatoms // *PLoS One*. 2011. Vol. 6. N 10. e26923
13. *Gillard J., Frenkel J., Devos V., Sabbe K., Paul C., Rempt M., Inzé D., Pohnert G., Vuylsteke M., Vyverman W.* Metabolomics enables the structure elucidation of a diatom sex pheromone // *Angew. Chem. Int. Edit.* 2013. Vol. 52. N 3. P. 854–857.
14. *Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G.* The Diatoms. Biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. 747 pp.
15. *Medlin L.K., Kaczmarek I.* Evolution of the diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision // *Phycologia*. 2004. Vol. 43. N 3. P. 245–270.
16. *Medlin L.K., Sato S., Mann D.G., Kooistra W.* Molecular evidence confirms sister relationship of *Ardissonea*, *Climacospheonia*, and *Toxarium* within the bipolar centric diatoms (Bacillariophyta, Mediophyceae), and cladistic analyses confirm that extremely elongated shape has arisen twice in the diatoms // *J. Phycol.* 2008. Vol. 44. N 5. P. 1340–1348.
17. *Andersen R.A., Berges J.A., Harrison P.J., Watanabe M.M.* Recipes for freshwater and seawater media // *Algal culturing techniques* / Eds. Andersen R.A. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. P. 429–538.
18. *Давидович Н.А., Давидович О.И.* Использование среды ESAW в опытах по изучению полового воспроизведения диатомовых водорослей. — Карадаг — 2009 // Сборник трудов, посвященный 95-летию Карадагской научной станции и 30-летию Карадагского природного заповедника Национальной академии наук Украины / Под ред. А.В.Гаевской и А.Л.Морозовой. Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика, 2009. С. 538–544.
19. *Федин Л.А., Барский И.Я.* Микрофотография. Л.: Наука, 1971. 220 с.
20. *Davidovich N.A.* Species specific sizes and size range of sexual reproduction in diatoms // 16th International Diatom Symposium (25 Aug.–1 Sept. 2000). Athens: University of Athens, 2001. P. 191–196.
21. *Dusenbery D.B., Snell T.W.* A critical body size for use of pheromones in mate location // *J. Chem. Ecol.* 1995. Vol. 21. N 4. P. 427–438.
22. *Чепурнов В.А., Mann D.G., Sabbe K., Vyverman W.* Experimental studies on sexual reproduction in diatoms // *Int. Rev. Cytol.* 2004. Vol. 237. P. 91–154.
23. *Pickett-Heaps J.D., Hill D. R. A., Blaze K. L.* Active gliding motility in an araphid marine diatom, *Ardissonea* (formerly *Synedra*) *crystallina* // *J. Phycol.* 1991. Vol. 27. N 6. P. 718–725.

**EFFECT OF CULTURE DENSITY ON SEXUAL REPRODUCTION
OF *ARDISSONEA CRYSTALLINA* (BACILLARIOPHYTA)**

Yu.A. Podunay, O.I. Davidovich, N.A. Davidovich*

*T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station — Nature Reserve of the RAS,
Nauki ul. 24, Kurortnoe, Feodosia, 298188, Russia*

** e-mail: grab-ua@yandex.ru*

It is well-known that one of the key factors which affect the sexual reproduction of diatoms is the cell concentration in cross-cultures. The concentration of pheromones which probably initiate gametogenesis in the mixture of cells of opposite sexes, depends on the culture density. The influence of the cell concentration on the sexual reproduction has been studied in the experiments with taxonomically important marine diatom *Ardissonea crystallina* (C. Agardh) Grunow. Several clones have been isolated from samples taken near Sevastopol (the Black Sea). The cell concentration which is most favorable for the species reproduction has been estimated. Low initial density may also increase the time required to start heterothallic sexual reproduction. The optimum cell concentration which is most favorable for the species reproduction has been calculated. Bigger volume of the medium allowed reproduction at higher cell concentration. If the initial concentration of cells was greater than optimal density, the reproduction often did not occur, probably due to cell metabolism products accumulated in the culture.

Keywords: *Ardissonea crystallina*, sexual reproduction, initial cells, pheromones, cell concentration.

Сведения об авторах:

Подунай Юлия Александровна — мл. науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: grab-ua@yandex.ru

Давидович Ольга Ивановна — науч. сотр. лаборатории водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: olivdav@mail.ru

Давидович Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. лабораторией водорослей и микробиоты ФГБУН “Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского — природный заповедник РАН”. Тел.: 8-36562-26-212; e-mail: karadag-algae@yandex.ru

МЕТОДЫ

УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ОСНОВЕ ШИРОКО НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕГО АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА ТИПА А

Т.К. Алиев^{1,*}, И.Г. Дементьева², В.А. Топорова³, М.Н. Боков², Л.П. Позднякова², В.С. Рыбченко⁴, Д.А. Долгих⁵, П.Г. Свешников², М.П. Кирпичников⁵¹ Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3;

² Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения;

Россия, 117638, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8;

³ Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН;

Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

⁴ кафедра биохимии и ⁵кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;

Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: ta12345@list.ru

Для исследования возможности создания на основе широко нейтрализующего антитела против вируса гриппа А различных белковых конструкций для диагностики было проведено конструирование двух рекомбинантных белков — Fab-фрагмента антитела и белка Fab-mCherry, представляющего собой гибрид Fab-фрагмента и флуоресцентного белка mCherry. Оба белка были экспрессированы в клетках *Escherichia coli* и выделены в функционально активном состоянии из культуральной жидкости. Показано, что Fab-фрагмент антитела взаимодействует со всеми одиннадцатью протестированными штаммами подтипов H1N1 и H3N2 вируса гриппа А. При этом наибольшая сила связывания наблюдается в отношении штаммов подтипа H1N1, что соответствует иммунохимическому профилю “родительского антитела”. Сравнение констант диссоциации комплексов Fab-фрагмента антитела и белка Fab-mCherry с вирусными частицами штамма A(H1N1)/Solomon Islands/03/06 показало, что присоединение белка mCherry не влияет на антиген-связывающие свойства Fab-фрагмента антитела.

Ключевые слова: вирус гриппа А, широко нейтрализующие антитела, белок mCherry, Fab-фрагмент, экспрессия рекомбинантных белков, *Escherichia coli*.

Ежегодно от 5 до 15% населения Земли заболевает гриппом, для 250–500 тыс. человек данная инфекция оказывается смертельной [1]. Из трех типов вируса гриппа наиболее вирулентным является тип А, способный поражать человека и животных. Ряд подтипов данного типа явились причиной возникновения эпидемий и пандемий. Причиной такой высокой вирулентности вируса гриппа А (ВГА) является изменчивость поверхностных антигенов вирусного капсида — гемагглютиниона и нейраминидазы.

Получение иммунной сыворотки, обладающей широкой специфичностью в отношении различных подтипов ВГА, в течение многих лет является одной из наиболее приоритетных задач современной фармакологии. При этом в ряде случаев были описаны успешные примеры получения антител, гетероспецифичных в отношении некоторых из известных на тот момент 16 подтипов [2], однако до недавнего времени не удавалось получить антитело, обладающее специфичностью в отношении всех подтипов ВГА. Значительный прорыв в данной области был достигнут в результате предпринятого

масштабного скрининга более 100 тыс. отдельных культивированных антителопродуцирующих В-клеток нескольких доноров, у которых наблюдали значительную гетеротипичность иммунного ответа в отношении ряда подтипов ВГА [3]. В результате было найдено уникальное нейтрализующее антитело FI6, обладающее способностью связывать рекомбинантные и природные гемагглютинины подгрупп 1 и 2 со значениями параметра EC₅₀ от 10 до 270 нг/мл. На мышах и хорьках, инфицированных штаммами ВГА H1N1 и H5N1 в летальной дозе, было показано, что полная защита достигается при введении данного антитела в дозах от 2 до 20 мг/кг веса.

Обнаружение антитела FI6 открывает новые возможности для создания вакцин, терапевтических препаратов, а также средств диагностики ВГА различных подтипов. При этом в качестве терапевтических или диагностических агентов также могут использоваться различные белковые молекулы, созданные с применением биоинженерных подходов и содержащие антиген-связывающие области искомого антитела. Разработано и описано достаточное большое число различных молекуляр-

ных форматов производных иммуноглобулинов для использования в диагностике и фармакологии [4]. Многие из таких конструкций основаны на использовании одноцепочечных антител и Fab-фрагментов. Данные белковые модули сохраняют антиген-связывающие свойства вариабельных доменов исходного антитела и, в отличие от полноразмерных антител, хорошо экспрессируются в различных клетках, в частности, дрожжах и клетках *Escherichia coli*.

Цель настоящей работы заключалась в получении и исследовании рекомбинантного Fab-фрагмента широкоспецифичного антитела FI6, а также белка Fab-mCherry, представляющего собой гибрид Fab-фрагмента и флуоресцентного белка mCherry [5]. В задачи исследования входило выяснение возможности экспрессии данных рекомбинантных белков в активном виде в клетках *E. coli* и их способности к высокоаффинному взаимодействию с ВГА различных подтипов.

Материалы и методы

Конструирование нуклеотидных последовательностей вариабельных доменов антитела FI6 осуществляли методом химико-ферментативного синтеза с использованием метода полимеразной цепной реакции и набора олигонуклеотидных праймеров с попарно перекрывающимися концевыми частями. Сборку бицистронной экспрессионной плазмиды для получения Fab-фрагмента антитела FI6 в клетках *E. coli*, биосинтез и очистку белка осуществляли по схеме, описанной ранее [6, 7]. Полученные нуклеотидные последовательности вариабельных доменов объединяли с константными доменами иммуноглобулина G человека (IgG1, каппа). Последовательность ДНК, кодирующую легкую цепь Fab-фрагмента, встраивали в вектор pTrc99A, содержащий предварительно клонированный ген лидерного пептида stII термостабильного энтеротоксина II *E. coli*. Последовательность ДНК, кодирующую тяжелую цепь Fab-фрагмента, встраивали во вспомогательный вектор pBluescript SK(+), содержащий последовательность лидерного пептида stII, последовательность Шайна-Дальгарно и додекагистидиновый таг. На следующем этапе экспрессионную кассету, содержащую тяжелую цепь Fab-фрагмента и перечисленные выше компоненты вспомогательного вектора, встраивали в вектор pTrc99A, содержащий легкую цепь. В результате получали бицистронный экспрессионный вектор pTrcLHFI6, в котором транскрипция легкой и тяжелой цепей Fab-фрагмента осуществлялась с единственного trc-промотора, а инициация трансляции каждой из цепей происходила независимо на участках, расположенных перед каждой кодирующей последовательностью в бицистроне.

Ген флуоресцентного белка mCherry для создания гибридного белка с FabFI6 получали мето-

дом ПЦР с использованием в качестве матрицы плазмиды pmCherry-C1 (Clontech, США) и специфических олигонуклеотидных праймеров, содержащих сайты рестрикции XhoI и SalI. Полученный фрагмент, не содержащий N-концевой аминокислотный остаток метионина, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции XhoI и SalI и встраивали по сайту XhoI во вспомогательный вектор, содержащий додекагистидиновый таг. Полученную плазмиду обрабатывали рестриктазами XhoI и HindIII, фрагмент длиной 757 п.н., содержащий ген белка pCherry с додекагистидиновым тагом, лигировали с фрагментом длиной 5583 п.н., полученным в результате обработки плазмиды pTrcLHFI6 той же парой рестриктаз. В результате получали вектор pTrcLHFI6-Ch, в котором белок Cherry располагался непосредственно на C-конце константного C_H1 домена тяжелой цепи антитела FI6.

Для продукции рекомбинантных Fab-фрагментов антитела FI6 и гибридного белка FabFI6-mCherry в клетках *E. coli* штамма BL-21 (DE-3) использовали метод автоиндукции [8], согласно которому клетки выращивали в питательной среде 2ZY, содержащей 2 мМ MgSO₄, 25 мМ Na₂HPO₄, 25 мМ KH₂PO₄, 50 мМ NH₄Cl, 5 мМ Na₂SO₄, 0,5% глицерина, 0,05% глюкозы, 0,2% моногидрата α-лактозы и ампициллин, на качалке в течение 48 ч при 32°C и 220 об/мин. По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием, рекомбинантные белки выделяли из среды культивирования методом металл-аффинной хроматографии на носителе Co²⁺-иминодиацетат-сефароза (GE Healthcare, США), как описано ранее [7].

Для иммунохимической характеристики Fab-фрагмента FI6 использовали набор высокоочищенных реликтовых и актуальных штаммов ВГА (табл. 1) производства компании Hytest Ltd. (Турку, Финляндия) и НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), полученных из зараженных куриных эмбрионов методом последовательных ультрацентрифугирований с использованием градиента плотности сахарозы с последующим инактивированием мертиолатом в течение 24 ч. Инактивацию вирусов подтверждали на культуре клеток MDCK. Для проведения непрямого иммуноферментного анализа использовали мышинные моноклональные антитела (MoAt) F8 против нуклеопротеина и C102 против гемагглютинина H1 ВГА (оба антитела получены ранее во Всероссийском научном центре молекулярной диагностики и лечения). Для подтверждения специфичности рекомбинантных белков использовали метод иммуноблоттинга. Для этого на первом этапе проводили электрофоретическое разделение антигенов различных штаммов ВГА подтипов H1N1 и H3N2 в 12%-ном полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Перенесенные белки выявляли с антивидовым пероксидазным конъюгатом антител козы

Таблица 1

Сведения о вирусных препаратах, использованных для иммунохимической характеристики рекомбинантных белков, полученных в данной работе

Поставщик	Подтип	Штамм/год выделения
Hytest Ltd 8IN73	Influenza A (H1N1)	A/Taiwan/1/86
Hytest Ltd 8IN73-2	Influenza A (H1N1)	A/Beijing/262/95
Hytest Ltd 8IN73-3	Influenza A (H1N1)	A/New Caledonia/20/99
Hytest Ltd 8IN73-4	Influenza A (H1N1)	A/Solomon Islands/03/06
НИИ гриппа РАМН	Influenza A (H1N1)	A/California/07/09
Hytest Ltd 8IN74	Influenza A (H3N2)	A/Samara/222/99=A/Shangdong/9/93
Hytest Ltd 8IN74-1	Influenza A (H3N2)	A/Panama/2007/99
Hytest Ltd 8IN74-2	Influenza A (H3N2)	A/Kiev/301/94
Hytest Ltd 8IN74-3	Influenza A (H3N2)	A/Wisconsin/67/05
Hytest Ltd 8IN74-4	Influenza A (H3N2)	A/Brisbane/10/07
НИИ гриппа РАМН	Influenza A (H3N2)	A/Sydney/5/97

против IgG мыши (для антител F8 и C102) и пероксидазным конъюгатом MoAt 4G7 против капза цепи человека (для Fab-фрагмента FI6) в течение 1 ч при 37°C.

Для определения аффинности Fab-фрагмента и гибридного белка FabFI6-Cherry использовали метод непрямого иммуоферментного анализа (ИФА), который позволяет определять концентрацию свободных антител в смеси антиген-антитело после достижения равновесия при комнатной температуре [9]. В качестве антигена использовали штамм A(H1N1)/Solomon Islands/03/06. Константу диссоциации рассчитывали по уравнению Клотца [10].

Результаты и обсуждение

Для синтеза генов переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела FI6, широкоспецифичного в отношении известных подтипов ВГА, нами были взяты аминокислотные последовательности FI6VHv3 для тяжелой цепи и FI6VKv2 для легкой цепи [3]. Данные последовательности представляют собой модифицированную версию исходного антитела FI6, приближенную к последовательности переменных доменов зародышевых линий иммуноглобулинов человека. На основании аминокислотной последовательности с учетом частоты встречаемости кодонов в генах *E. coli* были составлены нуклеотидные последовательности переменных доменов легких и тяжелых цепей и осуществлен химико-ферментативный синтез соответствующих фрагментов ДНК.

Для экспрессии рекомбинантного Fab-фрагмента антитела FI6 была сконструирована бицистронная плазмида pTrcLHFI6. Присутствие лидерного пептида stII термостабильного энтеротоксина *E. coli* на N-концевой части транслируемых легкой

и тяжелой цепей позволяло осуществлять транспорт зрелого Fab-фрагмента антитела непосредственно в среду культивирования.

Для того, чтобы оценить, может ли Fab-фрагмент антитела FI6 быть использован в качестве основного компонента рекомбинантных конструкций без значительного изменения его антиген-связывающих свойств, мы предложили осуществить получение и исследовать аффинность гибридного белка FabFI6-mCherry. Белок mCherry представляет собой мутантную форму флуоресцентного белка DsRed из *Discosoma sp.* [5].

На основе нуклеотидной последовательности, кодирующей mCherry, была получена экспрессионная плазмида pTrcLHFI6-Ch, обеспечивающая биосинтез гибридного белка FabFI6-mCherry в клетках *E. coli*.

Рекомбинантные белки FabFI6 и FabFI6-mCherry экспрессировали методом автоиндукции клеток *E. coli* штамма BL-21 (DE-3) трансформированными плазмидами pTrcLHFI6 и pTrcLHFI6-Ch. Белки выделяли из концентрированной среды культивирования методом металл-аффинной хроматографии. Результаты гель-электрофоретического анализа очищенных белков в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях приведены на рис. 1.

Оказалось, что в невосстанавливающих условиях подвижность белка FabFI6 соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе 49,2 кДа, а в присутствии β -меркаптоэтанола происходит диссоциация межцепочечной дисульфидной связи с образованием тяжелой и легкой цепей Fab-фрагмента. Молекулярная масса белка FabFI6-mCherry составляет 77,9 кДа. Молекулярная масса его гибридной тяжелой цепи, содержащей на C-конце белок mCherry, составляет ~54 кДа. Анализ белка

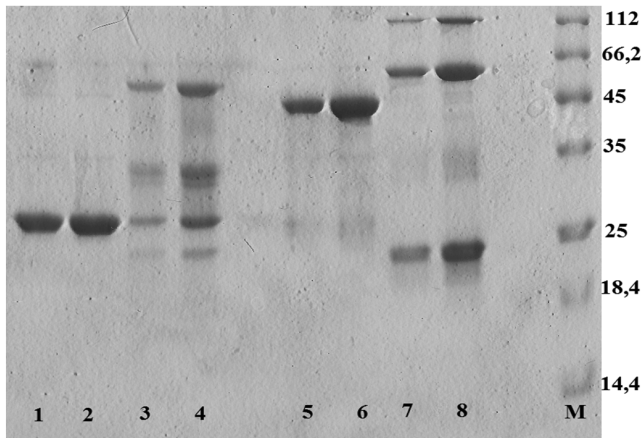


Рис. 1. Гель-электрофоретический анализ (12%-ный полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия) полученных после металл-аффинной хроматографии белков FabFI6 (дорожки 1, 2, 5, 6) и FabFI6-mCherry (дорожки 3, 4, 7, 8). М — белковые маркеры молекулярных масс. Образцы на дорожках 1–4 подвергались восстановлению с помощью β-меркаптоэтанола. Количество белка в образцах: дорожки 1 и 5 — 2 мкг белка; дорожки 2 и 6 — 1 мкг белка; дорожки 4 и 8 — 2,5 мкг белка; дорожки 3 и 7 — 1,25 мкг белка

FabFI6-mCherry после электрофореза в восстанавливающих и в невосстанавливающих условиях свидетельствует о наличии полосы ~23 кДа, отличающейся по своей электрофоретической подвижности от легкой цепи. Появление данного фраг-

мента описано в работе Гросса [11], в которой показано, что при кипячении электрофоретических образцов происходит гидролиз лабильной ацилиминной связи в хромофоре белка DsRed между остатками Phe 65 и Gln 66.

Была исследована антигенная специфичность рекомбинантного белка FabFI6 в отношении ряда штаммов подтипов H1N1 и H3N2, относящихся к разным подгруппам ВГА (табл. 1).

Необходимо отметить, что ранее [3] проводилось исследование взаимодействия ряда указанных штаммов с полноразмерным антителом FI6. Нами для иммунохимического анализа FabFI6 также были дополнительно использованы другие штаммы H1N1 и H3N2 (выделены жирным шрифтом в табл. 2), не использованные в работе Корти [3].

Из результатов непрямого ИФА FabFI6 с различными штаммами ВГА (табл. 2), следует, что рекомбинантный Fab-фрагмент антитела FI6 сохраняет свойство “родительского антитела” проявлять специфичность в отношении штаммов подтипов подгрупп 1 и 2 гемагглютининов. Так же, как и полноразмерное антитело человека, FabFI6 обладает большей аффинностью к штаммам подтипа H1N1, чем к H3N2.

На рис. 2 представлены результаты сравнения кросс-реактивности рекомбинантного FabFI6 с МоАт F8 и C102. Результаты непрямого ИФА по-

Таблица 2

Результаты титрования FabFI6 в прямом ИФА (оптическая плотность при длине волны 450 нм) с использованием для иммобилизации четырех штаммов ВГА/H1N1 и пяти штаммов ВГА/H3N2; штамм В/Tokyo/53/99 вируса гриппа В использован в качестве отрицательного контроля

Антиген FabFI6, мкг/мл	A(H1N1)/				A(H3N2)/					В/Tokyo/53/99
	Taiwan/1/86	Beijing/262/95	New Caledonia/20/99	Solomon Islands/03/06	Samara/222/99	Panama/2007/99	Kiev/301/94	Wisconsin/67/05	Brisbane/10/07	
1	*	*	*	*	0,776	2,264	0,887	1,123	1,185	0,394
0,3	*	*	*	*	0,331	1,419	0,213	0,261	0,316	0,176
0,1	*	*	*	*	0,297	1,340	0,117	0,122	0,116	0,109
0,03	2,638	2,669	2,444	2,953	0,163	1,004	0,086	0,084	0,068	0,092
0,01	1,359	1,140	0,767	1,567	0,109	0,572	0,050	0,074	0,044	0,097
0,003	0,625	0,319	0,255	0,422	0,055	0,247	0,036	0,060	0,034	0,138
0,001	0,337	0,120	0,163	0,170	0,030	0,123	0,026	0,050	0,031	0,178

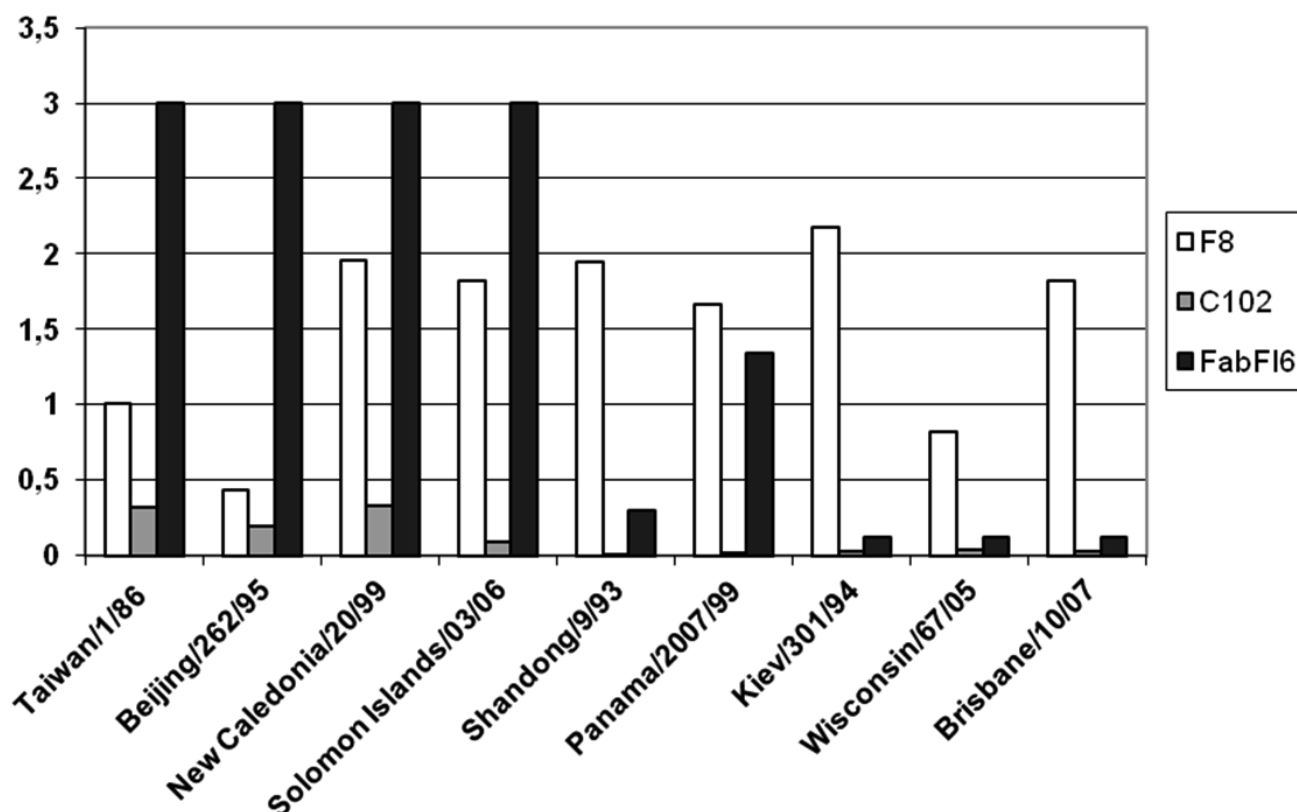


Рис. 2. Диаграмма кросс-реактивности MoAtF8, C102 и FabF16 по данным непрямого ИФА с иммобилизованными четырьмя штаммами ВГА/Н1N1 и пятью штаммами ВГА/Н3N2 при концентрации антител 100 нг/мл. По оси у — оптическая плотность при длине волны 450 нм при концентрации MoAt 0,1 мкг/мл

казывают, что MoAt F8, направленное против консервативного эпитопа ВГА, взаимодействует со всеми исследованными штаммами подтипов Н1N1 и Н3N2. MoAt C102 узнает молекулы гемагглютинина только подтипа Н1N1. FabF16 связывается с гемагглютинином всех штаммов, причем подтип Н1N1 узнается лучше, чем подтип Н3N2.

Специфичность FabF16 к гемагглютинином ВГА различных штаммов подтверждали методом иммуноблоттинга (рис. 3). Из результатов иммуноблоттинга следует, что FabF16 взаимодействует как с цельными гемагглютинами HA0 всех использованных штаммов, так и преимущественно с фрагментами гемагглютининов HA1 и HA2, которые образуются при проведении электрофореза антигенов ВГА в восстанавливающих условиях. Гидролиз цельных гемагглютининов при проведении гель-электрофореза в восстанавливающих условиях наблюдали при анализе рекомбинантных гемагглютининов [12]. Способность FabF16 взаимодействовать с HA1 и HA2 объясняется тем, что MoAt F16 направлено против F-субдомена гемагглютинина, который находится на стыке доменов Н1 и Н2 [3]. При этом тяжелая цепь антитела взаимодействует с доменом Н1, а легкая цепь — с альфа-спиралью из домена Н2.

В совокупности данные ИФА и иммуноблоттинга свидетельствуют о том, что экспрессируемый в клетках *E.coli* Fab-фрагмент антитела F16

является функционально-активным и проявляет специфичность по отношению ко всем исследованным штаммам ВГА.

Для оценки влияния присоединения белка mCherry к С-концевой части тяжелой цепи FabF16 на антиген-связывающую активность антитела нами были определены константы диссоциации (K_d) комплекса антиген-антитело для FabF16 и FabF16-mCherry. Усредненные значения K_d составили $3,8 \times 10^{-9}$ М для FabF16 и $3,1 \times 10^{-9}$ М для FabF16-mCherry. Данный результат свидетельствует о том, что антиген-связывающая активность гибридного белка не уменьшается по сравнению с этим показателем для исходного Fab-фрагмента.

Проведенные исследования показали, что рекомбинантный белок FabF16, сконструированный на основе переменных доменов антитела F16, широко специфичного к гемагглютинином ВГА, экспрессируется в клетках *E. coli* в функциональном состоянии. По данным иммунохимического анализа с использованием одиннадцати штаммов ВГА подтипов Н1N1 и Н3N2 FabF16 демонстрирует кросс-специфичность, сопоставимую с данным параметром родительского антитела [3]. Сравнение аффинности белков FabF16 и FabF16-mCherry показало, что рекомбинантный белок FabF16 может быть успешно использован в качестве базового модуля для получения на его основе рекомбинантных конструкций без изменения антиген-связывающих свойств.

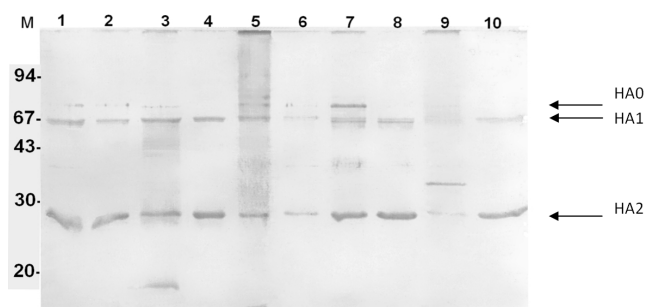


Рис. 3. Иммуноблот антигенов ВГА разных штаммов с FabF16 в восстанавливающих условиях после разделения в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Дорожки с 1 по 5 — ВГА/H1N1, дорожки с 6 по 10 — ВГА/H3N2, дорожка М — стандарты молекулярной массы, кДа; дорожка 1 — A/Taiwan/1/86, дорожка 2 — A/Beijing/262/95, дорожка 3 — A/New Caledonia/20/99, дорожка 4 — A/Solomon Islands/03/06, дорожка 5 — A/California/07/09, дорожка 6 — A/Samara/222/99, дорожка 7 — A/Panama/2007/99, дорожка 8 — A/Kiev/301/94, дорожка 9 — A/Wisconsin/67/05, дорожка 10 — A/Brisbane/10/07

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (Соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и

разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Graham-Rowe D.* Epidemiology: Racing against the flu // *Nature*. 2011. Vol. 480. N 7376. P. S2–S3.
2. *Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M. et al.* Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection // *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208. N 1. P. 181–193 (Erratum in: *J. Exp. Med.* 2011. Vol. 208. N 2. P. 411).
3. *Corti D., Voss J., Gamblin S.J. et al.* A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins // *Science*. 2011. Vol. 333. N 6044. P. 850–856.
4. *Деев С.М., Лебеденко Е.Н.* Современные технологии создания природных антител для клинического применения // *Acta Naturae*. 2009. Т. 1. № 1. С. 32–50.
5. *Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22. N 12. P. 1567–1572.
6. *Kalinichenko A.A., Toporova V.A., Panina A.A., Aliev T.K., Kryukova E.A., Shemchukova O.B., Solopova O.N., Pozdnyakova L.P., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* Development and characterization of antibodies against aflatoxins // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. Vol. 36. N 1. P. 122–132.
7. *Larina M.V., Aliev T.K., Solopova O.N., Pozdnyakova L.P., Korobova S.V., Yakimov S.A., Sveshnikov P.G., Dolgikh D.A.,*

Kirpichnikov M.P. Neutralizing monoclonal and chimeric antibodies to human interferon- γ // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. Vol. 41. N 3. P. 316–326.

8. *Studier F. W.* Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures // *Protein Expr. Purif.* 2005. Vol. 41. N 1. P. 207–234.

9. *Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E.* Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay // *J. Immunol. Methods*. 1985. Vol. 77. N 2. P. 305–319.

10. *Klotz I.M.* // *The Proteins*. Vol. 1. / Eds. I.M. Klotz, H. Neurath, and K. Bailey. N.Y.: Academic Press, 1953. 727 p.

11. *Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y.* The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. Vol. 97. N 22. P. 11990–11995.

12. *Feshchenko E., Rhodes D.G., Felberbaum R., McPherson C., Rininger J.A., Post P., and Cox M.M.J.* Pandemic influenza vaccine: characterization of A/California/07/2009 (H1N1) recombinant hemagglutinin protein and insights into H1N1 antigen stability // *BMC Biotechnology*. 2012. Vol. 2012. DOI: 10.1186/1472-6750-12-77.

Поступила в редакцию
12.11.2015

DEVELOPMENT AND PROPERTIES OF RECOMBINANT PROTEINS BASED ON THE BROADLY NEUTRALIZING ANTIBODY TO INFLUENZA A VIRUS

T.K. Aliev^{1,}, I.G. Dement'yeva², V.A. Toporova³, M.N. Bokov², L.P. Pozdnyakova², V.S. Rybchenko⁴, D.A. Dolgikh⁵, P.G. Sveshnikov², M.P. Kirpichnikov⁵*

¹ Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;

² Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy, Simferopol Bulvar 8, Moscow, 117638, Russia;

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia;

⁴ Department of Biochemistry and ⁵Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

* e-mail: ta12345@list.ru

We studied the possibility of using a broadly neutralizing anti-influenza A antibody as a module for the development of different protein constructs for diagnostics. For this purpose we constructed two recombinant proteins — an antibody Fab-fragment and Fab-mCherry, which is

a hybrid of the Fab-fragment and a fluorescent protein mCherry. Both proteins were expressed in *Escherichia coli* cells and purified in a functionally active state from cultivation medium. The antibody Fab-fragment was shown to bind all eleven tested strains of the influenza A H1N1 and H3N2 subtypes. The stronger binding was observed for the group I hemagglutinins that correlates with the immunochemical profile of the parental antibody. Comparison of the dissociation constants of complexes of the antibody Fab-fragment and Fab-mCherry with A(H1N1)/Solomon Islands/03/06 virus particles demonstrated that the attachment of mCherry protein did not interfere with the antigen-binding properties of the antibody Fab-fragment.

Key words: *influenza A virus, broadly neutralizing antibodies, mCherry protein, Fab-fragment, expression of recombinant proteins, Escherichia coli.*

Сведения об авторах:

Алиев Теймур Кантамирович — науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: ta12345@list.ru

Дементьева Ирина Григорьевна — ст. науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: irina.dementieva@mail.ru

Топорова Виктория Александровна — мл. науч. сотр. Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: rhuta@rambler.ru

Боков Максим Николаевич — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: schpundic@gmail.com

Позднякова Любовь Петровна — науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: plp1810@inbox.ru

Рыбченко Владислав Сергеевич — студент биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: vladislavrusia@yandex.ru

Долгих Дмитрий Александрович — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru

Свешников Петр Георгиевич — докт. биол. наук, проф., генеральный директор Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: petersveshnikov@list.ru

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

МЕТОДЫ

УДК 577.212.3

**ФУТПРИНТИНГ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОЙ ДНК
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИДРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ****Н.С. Герасимова¹, В.М. Студитский^{1,2,*}**

¹ *Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*

² *лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333*

**e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

Футпринтинг является одним из наиболее простых и точных методов исследования укладки и взаимодействия биополимеров. Он основан на том, что места внутри- и межмолекулярных контактов оказываются недоступными для внешнего разрушающего воздействия. При проведении эксперимента на один из концов полимера вносится метка, затем проба инкубируется с повреждающим реактивом. По распределению длины продуктов расщепления делаются выводы о доступности его участков в тех или иных условиях. При футпринтинге ДНК применяются различные ферментативные и химические разрезающие агенты. На сегодняшний день наиболее высокое временное и пространственное разрешение без выраженной специфичности по отношению к последовательности нуклеотидов можно получить при использовании гидроксильных радикалов. В работе предлагается новый вариант этого экспериментального подхода с применением флуоресцентного мечения исследуемой ДНК и современных методов последующего количественного анализа, который позволит заметно расширить его возможности.

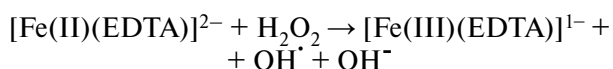
Ключевые слова: ДНК, футпринтинг, гидроксильные радикалы, нуклеосома, флуоресцентное мечение, ДНК-белковые взаимодействия.

В клетке ДНК функционирует совместно с многочисленными белками. Для изучения ДНК-белковых взаимодействий разработаны различные биохимические подходы. При футпринтинге на 5'- или 3'-конец одной из цепей вносят метку. ДНК инкубируют с белком, затем добавляют разрезающий агент. Связанные белки защищают участки дуплекса от эндонуклеаз и химических реагентов, поэтому вероятность внесения разрывов в сахарофосфатный остов в местах взаимодействия оказывается ниже, чем в свободных участках. Длину образующихся продуктов определяют методом разделения электрофорезом (ЭФ) в денатурирующих условиях с точностью до одного нуклеотидного остатка. По распределению длины восстанавливают пространственную картину укладки и взаимодействия ДНК [1].

Для получения достоверных данных необходимо, чтобы в среднем в каждую молекулу полимера вносилось не более одного разрыва. Ранее было показано, что в таких условиях 60–70% молекул остаются неповрежденными [2]. Поэтому при выборе разрезающего агента важно учитывать, чтобы реакцию можно было быстро остановить. Так, широкое распространение получил футпринтинг с помощью ДНКазы I, которую можно ингибировать добавлением ЭДТА. Этот фермент позволяет проводить хорошо воспроизводимые эксперименты с высоким разрешением, однако он имеет относи-

тельно большой размер и выраженную специфичность по отношению к разным структурам ДНК и последовательностям нуклеотидов, что затрудняет интерпретацию получаемых данных.

Химические агенты меньшего размера (перманганат-ион, диметилсульфат, активные формы кислорода и др.) в ряде случаев позволяют получить данные с менее выраженной специфичностью по отношению к нуклеотидной последовательности и большим разрешением. На сегодняшний день наилучшие результаты достигаются при использовании перекисного окисления гидроксильными радикалами [1]. Для получения радикалов в системах футпринтинга ДНК, РНК и белков применяют различные химические реакции, например, разложение пероксинитрита, фотолиз и радиолиз воды [3]. Один из наиболее точно контролируемых методов гидроксильного футпринтинга основан на реакции Фентона-Габера-Вейса [4–6]:



Цепь химических реакций, возникающих при локальном взаимодействии ДНК с образующимся гидроксильным радикалом, приводит к разрушению сахарофосфатного остова.

Чаще всего в качестве метки для ДНК применяют радиоактивные изотопы фосфора. Современ-

ные методы детекции очень чувствительны и позволяют проводить исследования с использованием очень малых количеств ДНК (десятки аттомолей макромолекул в полосе, соответствующей фрагменту одной длины на ЭФ-дорожке) [7]. Тем не менее, работа с открытыми источниками ионизирующего излучения требует специальных предосторожностей, а из-за постоянного распада метки приготовленную пробу ДНК можно использовать лишь ограниченное время. Более удобными являются флуоресцентные метки, хотя их использование и приводит к уменьшению чувствительности метода. Так, при использовании автоматических секвенаторов с системой капиллярного ЭФ чувствительность детекции может достигать 0,1 фемтомоля молекул в полосе, что на порядок ниже возможностей подхода с использованием радиоактивного фосфора [8]. В данной работе мы оптимизировали условия футпринтинга с применением флуоресцентных меток при использовании более распространенного и технически простого метода анализа продуктов реакции — ЭФ в денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ).

В исследовании были использованы фрагменты, которые в ходе полимеразной цепной реакции метили по одному из 5'-концов с помощью флуоресцеина (FAM). На дуплексах были собраны нуклеосомы — мономеры структурной организации хроматина — комплексы, состоящие из октамера белков-гистонов и уложенного на его поверхности участка ДНК длиной 145–148 п.н. [9]. Нуклеосомная ДНК в значительной степени недоступна для

нуклеаз и других повреждающих агентов [10–12]. За счет спиральной структуры дуплекса и его плотных контактов с гистоновыми белками при футпринтинге нуклеосомной ДНК с использованием гидроксильных радикалов наблюдается характерная картина с перемежающимися участками чувствительности длиной около 5 п.н. [12].

Материалы и методы

Работу проводили на полученной в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК с позиционирующей нуклеосому последовательностью нуклеотидов 603, характеризующейся высокой афинностью к гистоновым белкам [13]. Фрагменты содержали два дополнительных участка ДНК: первый, длиной 123 п.н. с введенной на 5'-конец флуоресцентной меткой FAM (схема приведена на рисунке), — с одной стороны; второй, 13 п.н., — с другой стороны:

5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAAATTTA
TCAAAAAGAGTATTGACTTAAAGTCTAACCTAT
AGGATACTTACAGCCATCGAGAGGGACACGG
CGAAAGGCCAACCCAAGCGACACCGGCACTG
GGGCCAGTTCGCGCGCGCCACCTACCGTGTG
AAGTCGTCACCTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAG
CGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCA
CCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGCCCTCCGT
CCTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATC
CGACG)-3' (позиционирующая нуклеосому
последовательность подчеркнута).

Фрагменты ДНК получали на указанной синтетической матрице с использованием меченого

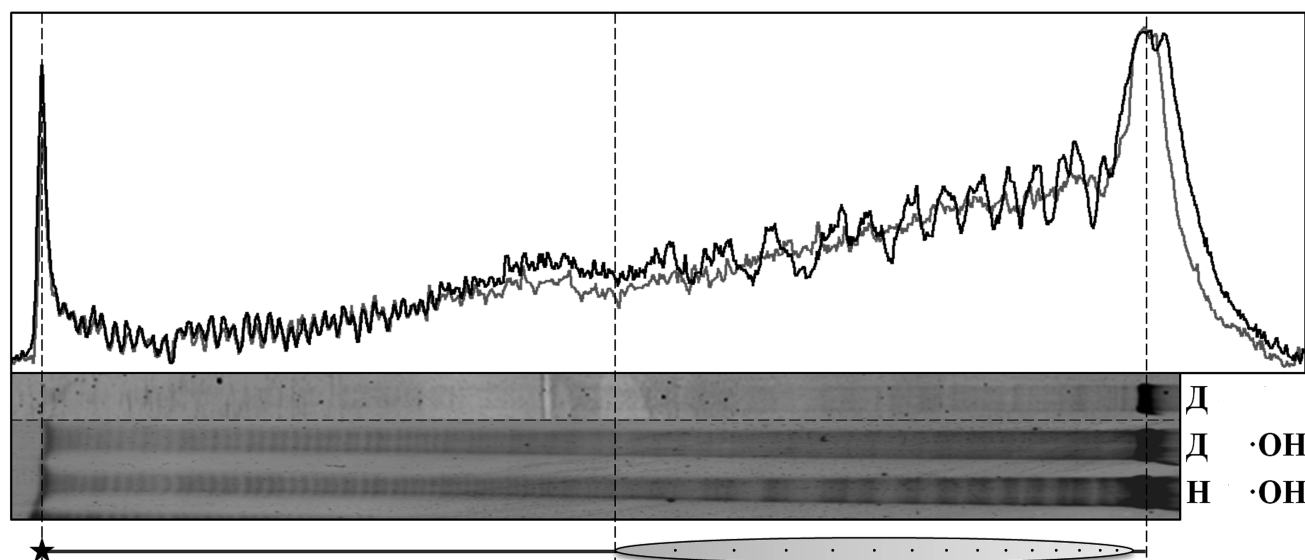


Рисунок. Профили футпринтинга флуоресцентно-меченой нуклеосомной и свободной от белков ДНК с использованием гидроксильных радикалов. В нижней части рисунка представлен снимок флуоресцентного сигнала ДНК и продуктов ее деградации, разделенных методом ЭФ в денатурирующем 8%-ном ПААГ (Д — ДНК, Н — нуклеосома; ·ОН — воздействие гидроксильными радикалами). Звездочкой указано расположение флуоресцентной метки FAM в исследуемой ДНК. В верхней части рисунка приведены графики распределения сигнала в ЭФ-дорожках с ДНК-фрагментами (серая линия) и нуклеосомами (черная линия), подвергнутыми воздействию гидроксильных радикалов. Графики получены с помощью компьютерной программы OptiQuant. Схематически показано положение нуклеосомы (серый овал; черными точками показана периодичность ДНК-гистоновых контактов, соответствующая одному витку спирали дуплекса длиной около 10 п.н.).

олигонуклеотида FAM-282Forwhst (5'-FAM-d(CCGGGATCCAGATCCCGAAAATTTA)-3') и немеченого олигонуклеотида 282Revwhst (5'-d(CGTCGGATCCGTACCCAGGGACTT)-3') (0,5 мкМ каждый; Синтол, Россия). Реакцию проводили в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США) в 1-кратном буферном растворе для Taq-ДНК-полимеразы (Евроген, Россия), содержащем 3 мМ $MgCl_2$, все дезоксирибонуклеотиды (каждый в концентрации 0,2 мМ) и Taq-ДНК-полимеразу (Евроген, Россия; 0,05 ед. акт./мкл). Первичную денатурацию матричной ДНК проводили в течение 3 мин при 95°C. 30 циклов ПЦР состояли из последовательных этапов инкубации при разной температуре (10 с при 93°C, 20 с при 63°C; 20 с при 72°C). Реакцию завершали 7-минутным прогреванием при 72°C. Продукты амплификации ожидаемой длины (282 п.н.) очищали от компонентов реакции с помощью ЭФ в 1%-ном агарозном геле в 0,5-кратном трис-боратном электродном буфере (tris/borate/EDTA, TBE) в камере для горизонтального ЭФ Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Laboratories, США). Для экстракции ДНК из геля использовали коммерческий набор реагентов QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США).

Сборку нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК проводили методом ступенчатого диализа против буферных растворов с уменьшающейся ионной силой, описанным в работе [14]. В качестве источника октамеров гистонов использовали хроматин без линкерных гистонов, который выделяли из эритроцитов цыплят, как описано ранее [14]. Анализ продуктов сборки проводили методом ЭФ-разделения в 4,5%-ном ПААГ в 0,5-кратном буфере TBE в камере для вертикального ЭФ Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США).

Анализ положения октамера гистонов на флуоресцентно-меченой ДНК проводили методом гидроксильного футпринтинга по схеме, предложенной в работе [6]. Реакционная смесь общим объемом 30 мкл содержала 20 мМ трис-HCl (pH 8,0), 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 150 мМ KCl, хроматин без линкерных гистонов в концентрации 30 нг/мкл, 1 мМ аскорбиновую кислоту, 0,1 мМ $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, 0,1 мМ ЭДТА (pH 8,0), 3% H_2O_2 и 100 нг исследуемой ДНК. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 15 с, реакцию останавливали добавлением глицерина до концентрации 2%. Реакционную смесь обрабатывали взбалтыванием с фенолом, насыщенным буфером трис-ЭДТА (Phenol solution P4557, Sigma-Aldrich, США). После центрифугирования пробы в течение 10 мин при 13200 об/мин в настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) водную фазу отбирали, добавляли 1/10 объема 3М ацетата натрия (pH 5,2), гликоген (Thermo Fisher Scientific, США)

до концентрации 0,2 мг/мл. К полученному раствору приливали три объема 96%-ного этилового спирта. После 18-часовой инкубации проб при -20°C ДНК осаждали центрифугированием при +4°C в течение 20 мин при 13200 об/мин в настольной центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия).

Продукты деградации ДНК анализировали методом ЭФ-разделения в 8%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8М в 0,5-кратном буфере TBE в камере для вертикального ЭФ Sequi-Gen GT Sequencing Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции флуоресценции Typhoon Trio (General Electric, Англия). Для возбуждения флуоресценции использовали лазер с длиной волны 532 нм, сигнал считывали через фильтр, пропускающий световые волны длиной более 526 нм. Результаты обрабатывали с помощью компьютерной программы OptiQuant (Packard Instruments Company, США).

Результаты и обсуждение

Результаты футпринтинга флуоресцентно-меченых проб с использованием гидроксильных радикалов представлены на рисунке. В свободных от гистонов участках ДНК под действием гидроксильных радикалов образуются разрывы сахарофосфатного остова равновероятно после каждого нуклеотидного остатка. Для нуклеосомных фрагментов наблюдается характерная картина с периодическими пиками чувствительности на расстоянии около 10 п.н., которая не наблюдается на свободной ДНК с такой же последовательностью нуклеотидов (для случая радиоактивного мечения см. [12]).

Под действием гидроксильных радикалов может происходить разрушение не только исследуемого полимера, но и флуоресцирующего соединения, использованного для мечения ДНК. Тем не менее, в подобранных условиях при стандартных настройках детектора флуоресценции чувствительность метода составила менее одного фемтомоля FAM-меченых цепей ДНК в ЭФ-полосе, а линейное возрастание детектируемого сигнала наблюдалось при увеличении количества метки вплоть до 1 пикомоля. Достижимая чувствительность оказалась сравнимой с получаемой на автоматических секвенаторах. Разработанная методика позволяет проводить опыты с использованием установок для изучения кинетики реакций методом остановленной струи (например, с использованием прибора KinTek, США) и получать данные об исследуемых процессах с миллисекундным разрешением. При подходящих условиях — в буфере с ЭДТА (для инактивации нуклеаз) в замороженном состоянии (для уменьшения частоты спонтанного гидролиза) и с минимальным доступом света (для замедления разрушения флуоресцентного соединения) — ме-

ченная ДНК может храниться по крайней мере в течение нескольких лет без заметной потери интенсивности сигнала.

Введение флуорофоров с неперекрывающимися спектрами излучаемых длин волн в каждую из цепей ДНК позволяет анализировать роль обеих цепей ДНК в исследуемом взаимодействии с белками в одном эксперименте. Использование таких же меток в разных молекулах ДНК может быть использовано для изучения конкурентного связывания различных фрагментов методом футпринтинга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sclavi B.* Time-resolved footprinting for the study of the structural dynamics of DNA-protein interactions // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. Vol. 36. N 4. P. 745–748.
2. *Brenowitz M., Senear D.F., Shea M.A., Ackers G.K.* Quantitative DNase footprint titration: a method for studying protein-DNA interactions // *Meth. Enzymol.* 1986. Vol. 130. P. 132–181.
3. *Shcherbakova I., Mitra S., Beer R.H., Brenowitz M.* Fast Fenton footprinting: a laboratory-based method for the time-resolved analysis of DNA, RNA and proteins // *Nucleic Acids Res.* 2006. Vol. 34. N 6. e48.
4. *Fenton H.J.H.* Oxidation of tartaric acid in the presence of iron // *J. Chem. Soc.* 1894. Vol. 65. P. 899–910.
5. *Haber F., Weiss J.* The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts // *Proc. R. Soc. Lond. A.* 1934. Vol. 147. N 861. P. 332–351.
6. *Tullius T.D., Dombroski B.A.* Hydroxyl radical “footprinting”: high-resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and Cro protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. Vol. 83. N 15. P. 5469–5473.
7. *Jain S.S., Tullius T.D.* Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. N 6. P. 1092–1100.
8. *Woger J.W., Koraimann G.* Hydroxyl radical footprinting using PCR-generated fluorescent-labelled DNA fragments and the ALFexpress DNA sequencer // *Tech. Tips Online.* 1997. Vol. 2. N 1. P. 167–168.
9. *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.
10. *Noll M.* Internal structure of the chromatin subunit // *Nucleic Acids Res.* 1974. Vol. 1. N 11. P. 1573–1578.
11. *Wigler M.H., Axel R.* Nucleosomes in metaphase chromosomes // *Nucleic Acids Res.* 1976. Vol. 3. N 6. P. 1463–1471.
12. *Hayes J.J., Tullius T.D., Wolffe A.P.* The structure of DNA in a nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. N 19. P. 7405–7409.
13. *Lowary P.T., Widom J.* New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* 1998. Vol. 276. N 1. P. 19–42.
14. *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.
15. *Armeev G.A., Gorkovets T.K., Efimova D.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* Modeling of protein – DNA complexes geometry utilising FRET and footprinting data // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 71. N 1. P. 29–33.

Поступила в редакцию

16.09.15

HYDROXYL RADICAL FOOTPRINTING OF FLUORESCENT-LABELLED DNA

N.S. Gerasimova¹, V.M. Studitsky^{1,2,}*

¹ *Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

² *Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

*e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Footprinting is one of the simplest and most accurate approaches to investigate structure and interaction of biopolymers. It is based on the accessibility of intra- and intermolecular contacts for external damaging agents. In the method, one end of the polymer is labeled, and then the sample is incubated in cutting medium. Length distribution of the products allows to reveal the accessibility of different regions of polymer in the corresponding conditions. In DNA footprinting various enzymes and chemical reagents can be used. The highest temporal and spatial resolution without sequence specificity can be obtained with hydroxyl radicals. In this paper we present a new modification of the experimental approach using fluorescent-labeled DNA fragments and up-to-date methods of quantitative analysis, which can considerably increase its applicability.

Key words: *DNA, footprinting, hydroxyl radicals, nucleosome, fluorescent labeling, DNA-protein interactions.*

Сведения об авторах:

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

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

МЕТОДЫ

УДК 577.214

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОДИНОЧНЫХ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НУКЛЕОСОМ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ**К.С. Кудряшова^{1,2}, О.В. Чертков^{1,2}, Я.О.Иванов¹, В.М. Студитский^{1,3}, А.В. Феофанов^{1,2*}**

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; Россия, 117997, г. Москва, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10;

³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

*e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Создана экспериментальная установка для изучения иммобилизованных молекул и их комплексов *in vitro* методом флуоресцентной микроскопии с чувствительностью на уровне одиночных флуорофоров. Установка регистрирует флуоресцентные изображения иммобилизованных молекул одновременно в двух спектральных диапазонах, обеспечивая анализ на основе эффекта Фёрстеровского резонансного переноса энергии. Возбуждение флуоресценции поверхностной световой волной, сформированной методом полного внутреннего отражения, и регистрация сигнала с помощью высокочувствительной системы детекции позволяют проводить измерения с временным разрешением около 100 мс. Разработан протокол модификации поверхности стекол для иммобилизации нуклеосом через высокоаффинные стрептавидин-биотиновые взаимодействия. Чтобы обеспечить иммобилизацию, один из концов ДНК флуоресцентно-меченых моонуклеосом был биотинилирован. Разработан алгоритм обработки изображений для анализа структурных перестроек в одиночных нуклеосомах. Флуоресцентная микроскопия одиночных иммобилизованных молекул и их комплексов расширяет возможности изучения структурной динамики нуклеосом при транскрипции и взаимодействии с различными ядерными белками.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, иммобилизация, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула.

Арсенал традиционных физико-химических и биохимических методов изучения структуры биополимеров и супрамолекулярных комплексов с недавнего времени пополнился методами флуоресцентной микроскопии одиночных молекул [1–2]. Новые методы доказали свою эффективность при изучении нуклеосом, а также комплексов и процессов с их участием [3–8] и требуют дальнейшего развития. Ранее нами на основе флуоресцентно-меченых промотор-содержащих матриц ДНК были получены точно позиционированные моонуклеосомы [6–8], содержащие в нетранскрибируемой цепи ДНК флуорофоры циановый 3 (Cy3) и циановый 5 (Cy5). Было предложено два варианта мечения, при которых после укладки ДНК на октамере гистонов метки оказываются в положениях +35 и +113 [8] или +56 и +135 [6, 7] пар нуклеотидов от входа в нуклеосому на соседних участках ДНК (рис. 1, В), где между ними с эффективностью 50–90% реализуется Фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer, FRET). Показано, что изменение структуры нуклеосомы сопровождается изменением эффективности FRET, по величине которого можно судить

о масштабе перестроек в помеченной области нуклеосомы. При этом введение меток не повлияло на способность РНК-полимеразы транскрибировать нуклеосому [6, 8]. С применением меченых нуклеосом и флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов нами начато изучение структурных изменений в хроматине, происходящих в процессе транскрипции [6–8]. Методика флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов была реализована на основе анализа свободно диффундирующих в растворе нуклеосом, по одной пересекающих фокальный объем, из которого измеряются интенсивности сигналов донора (Cy3) и акцептора (Cy5). Такие измерения удобны для исследования равновесных состояний и комплексов или очень медленных (минуты и десятки минут) процессов. Ограничением этой методики является невозможность следить за изменениями, происходящими с индивидуальными нуклеосомами во времени. Данное ограничение можно преодолеть, если иммобилизовать нуклеосомы на поверхности и обеспечить быстрое измерение их флуоресцентных изображений с разделением сигналов донора и акцептора. В настоящей работе приводится инфор-

мация о разработке специальных вариантов нуклеосом, протоколов их иммобилизации, а также экспериментальной установки и методик для изучения одиночных иммобилизованных нуклеосом методом флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения (ПВО).

Материалы и методы

Экспериментальная установка. В состав разработанной экспериментальной установки (рис. 1, А) входит Ar^+ -лазер (LASOS 500 мВт, Lasertechnik GmbH, Германия) с прерывателем луча Uniblitz (VA Inc., США), инвертированный микроскоп AxioObserver (Zeiss, Германия) с оптическим модулем для микроскопии ПВО и объективом α Plan-Apochromat ($\times 100$, числовая апертура 1,46), модуль OptoSplit II (Cairn Research, Англия) и EMCCD-камера iXon Ultra 897 (512 $\times$ 512 пикселей, Andor, Англия) с программой iQ для регистрации изобра-

жений. Обработка изображений и представление данных реализованы с использованием программ Image J (National Institute of Health, США) и Prism (GraphPad, США). При исследовании нуклеосом, меченных Cy3 и Cy5, использовали длину волны возбуждения 514,5 нм (240 мкВт на образце), а спектральную фильтрацию и разделение сигналов флуорофоров осуществляли с помощью дихроичных зеркал Di01-R532 (DZ_1), FF635-Di01 (DZ_2), полосового фильтра FF01-571/72 (Φ_3) фирмы SemRock (США), длинноволнового барьерного фильтра ET525LP (Φ_2) фирмы Chroma Technology (США) и узкополосного фильтра BP514/10 (Φ_1) фирмы Zeiss.

Приготовление моноклеосом. Для приготовления моноклеосом использовали реагенты и специальные наборы реактивов, состав и происхождение которых описаны ранее [6, 8]. Флуоресцентно-меченую ДНК и моноклеосомы на основе донорного хроматина из эритроцитов цыплят получали, как изложено в предыдущих работах [6, 8].

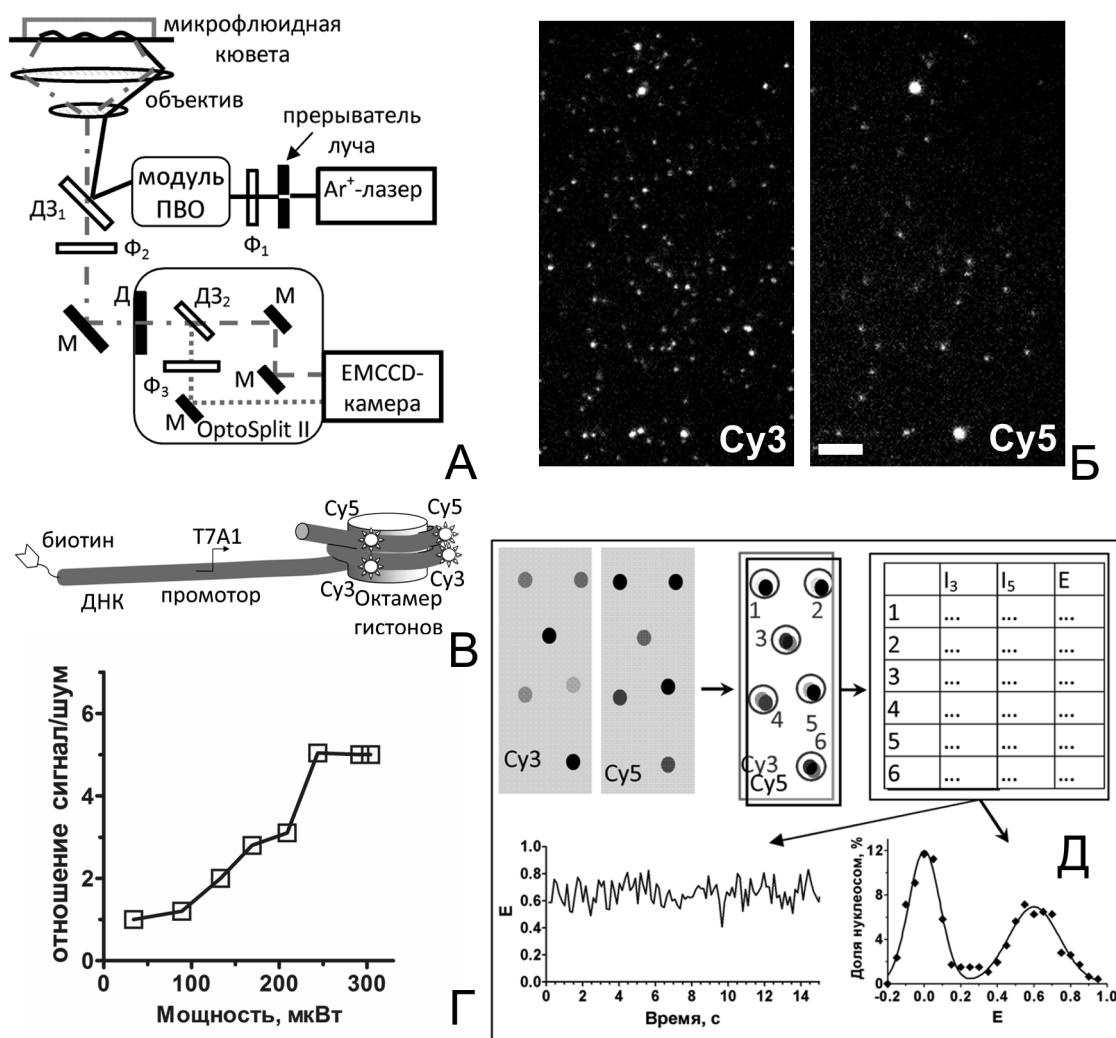


Рис. 1. А — принципиальная схема установки для флуоресцентной микроскопии иммобилизованных одиночных нуклеосом на основе эффекта ПВО. Д — апертурная диафрагма, DZ_1 , DZ_2 — дихроичные зеркала, М — зеркало, Φ_1 , Φ_2 , Φ_3 — фильтры. Б — типичные изображения иммобилизованных одиночных нуклеосом с разделением флуоресценции Cy3 и Cy5. Метка масштаба — 3 мкм. В — структура биотинилированной флуоресцентно меченой моноклеосомы. Показаны два возможных положения меток Cy3 и Cy5 в соседних участках ДНК: +35 и +113 или +56 и +135 пар нуклеотидов от входа в нуклеосому. Г — зависимость отношения сигнал/шум в изображениях иммобилизованных одиночных молекул Cy3-авидина от мощности лазера на образце. Д — схема этапов обработки изображений и представления данных (детали описаны в тексте статьи)

Для целей иммобилизации нуклеосомы дополнительно лигировали с биотинилированным по 5'-концевому цитозину фрагментом ДНК длиной 178 п.н. (рис. 1, В). Лигирование проводили по сайту рестрикции TSPRI. Нуклеосомы и биотинилированный фрагмент смешивали в эквимольном соотношении в растворе, содержащем ДНК-лигазный буфер фага T4, 5% полиэтиленгликоля (4 кДа), 100 мМ бычьего сывороточного альбумина и ДНК-лигазу фага T4 в количестве, определяемом инструкцией производителя (все компоненты фирмы Fermentas). Реакции проводили в течение 12 ч при 16°C. Эффективность лигирования контролировали с помощью нативного электрофореза в 4%-ном полиакриламидном геле по изменению подвижности полосы нуклеосом и дополнительно впоследствии по способности продукта реакции к иммобилизации.

Модификация стекол и сборка микрофлюидной кюветы. Покровные (25×50 мм, толщина 175±15 мкм) и предметные стекла (Menzel-Glaser, Германия) очищали хромпиком, многократно промывали дистиллированной водой, выдерживали в 1М растворе КОН в течение 1 ч, промывали дистиллированной водой и высушивали при 50°C. На стекла наносили по 50 мкл 2%-ного раствора смеси (100:1 по весу) полиэтиленгликоль-силана (ПЭГ-силан, 2 кДа) и биотин-ПЭГ-силана (2 или 5 кДа, Nanocs, США) в 97%-ном этаноле и инкубировали их 25 мин при 20°C. Затем стекла промывали этанолом и водой, высушивали при 50°C. Из покровного и предметного стекол, ориентированных модифицированными поверхностями друг к другу, формировали микрофлюидную кювету с размером канала 20×25×0,1 мм. Собранные кюветы хранили при –20°C.

Иммобилизация нуклеосом. Для иммобилизации нуклеосом в кювету вводили 30 мкл водного раствора стрептавидина (1 мг/л, Sigma), инкубировали ее 5 мин при комнатной температуре, промывали буфером TB150 (20 мМ Tris–HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и 150 мМ KCl), вводили 30 мкл раствора нуклеосом (10^{–4} нг/мкл по ДНК) в TB150, снова инкубировали 5 мин при комнатной температуре и промывали TB150 от несвязавшихся нуклеосом. Для иммобилизации меченного Cy3 авидина (Cy3-авидин, Sigma) в кювету вводили 30 мкл его водного раствора (10 мкг/л), инкубировали смесь 5 мин при комнатной температуре и отмывали водой от несвязавшегося белка.

Результаты и их обсуждение

В созданной экспериментальной установке (рис. 1, А) модуль ПВО используется для направления лазерного луча через объектив в микрофлюидную кювету под углом ПВО и создания поверхностной световой волны в слое толщиной ~100 нм на границе воды и стекла с иммобилизованными нуклеосомами. Узкополосный фильтр Φ_1 подавляет неиспользуемые лазерные линии Ar⁺-лазера. Дихроичное зеркало ДЗ₁ отражает в объектив излучение

лазера и пропускает флуоресценцию к системе детекции. Световая волна возбуждает флуоресценцию всех иммобилизованных нуклеосом, находящихся в поле зрения. За пределами 100-нанометрового поверхностного слоя флуоресценция не возбуждается. Собранный объективом, флуоресценция нуклеосом проходит через ДЗ₁, фильтруется дополнительно от упруго рассеянного света длинноволновым барьерным фильтром Φ_2 с границей 525 нм и делится дихроичным зеркалом ДЗ₂ на два пучка с длинами волн короче и длиннее 635 нм. Дополнительный фильтр Φ_3 выделяет из коротковолнового пучка флуоресценцию с длинами волн 535–607 нм. Для установки подобраны специальные фильтры и дихроичные зеркала с высоким (>94%) пропусканием света в заданных областях и повышенным (10⁶) коэффициентом подавления света на длине волны 514,5 нм (фильтры Φ_2 , Φ_3). С помощью системы зеркал модуля OptoSplit II коротковолновая (Cy3) и длинноволновая (Cy5) флуоресценции проецируются каждая на свою половину сенсора высокочувствительной EMCCD-камеры, что обеспечивает одновременное измерение пространственного распределения сигналов донора и акцептора (рис. 1, Б).

Разработанный протокол модификации поверхности стекла смесью ПЭГ-силана и биотин-ПЭГ-силана обеспечивает формирование однородного монослоя ПЭГ с равномерным и плотным распределением биотинилированных молекул (данные не представлены). Установлено, что модифицированные стекла сохраняют свои свойства в течение 4–6 мес. Необходимая для регистрации одиночных молекул плотность распределения (<1 молекулы на 1 мкм²) достигнута путем оптимизации времени инкубации и концентрации иммобилизуемых молекул (рис. 1, Б). С использованием одиночных иммобилизованных молекул Cy3-авидина установлено, что максимальные интенсивность сигнала и отношение сигнал/шум достигаются при мощности лазера на образце больше 240 мВт (рис. 1, Д). Эта мощность обеспечивает близкую к 100% вероятность возбуждения Cy3, как только флуорофор возвращается в основное электронное состояние после испускания флуоресценции.

Разработанная процедура обработки данных включает в себя (рис. 1, Д) разделение изображения, полученного с EMCCD-камеры, на изображения распределения сигналов Cy3 и Cy5, измерение интенсивности фона в обоих изображениях и вычитание его, совмещение изображений с последующим распознаванием положения и границ одиночных нуклеосом, измерение интенсивностей флуоресценции Cy3 и Cy5 и расчет эффективности FRET (Е) по формуле (1) для каждой из распознанных нуклеосом:

$$E = (I_5 - 0,14 \times I_3) / (I_5 + 0,86 \times I_3) \quad (1),$$

где I_3 и I_5 — это интенсивности сигналов Cy3 и Cy5, а коэффициенты 0,14 и 0,86 учитывают частичное перекрывание флуоресценции Cy3 и Cy5

в области 635–750 нм. Набор значений E для выборки нуклеосом графически представляется в виде гистограммы относительной частоты распределения этой величины (рис. 1, Д). При анализе динамики структуры для каждой нуклеосомы строится зависимость E от времени или гистограмма относительной частоты распределения величины E за измеренный промежуток времени (рис. 1, Д).

Сравнение частотных распределений величины E для нуклеосом, иммобилизованных с помощью биотин-ПЭГ-силана 2 и 5 кДа (в обоих случаях основным компонентом монослоя был ПЭГ-силан 2 кДа) выявило существенную дестабилизацию структуры нуклеосом при использовании биотин-ПЭГ-силана 2 кДа. Дестабилизация наблюдалась как в области, близкой к выходу ДНК из контакта с гистоновым октамером, так и в области метки, отстоящей на 35 пар нуклеотидов от входа в нуклеосому (рис. 2, А, Б). Таким образом, использование более длинного биотин-ПЭГ-силана 5 кДа

в комбинации с ПЭГ-силаном 2 кДа является существенным для сохранения нативной структуры нуклеосом при иммобилизации. Этот вывод подтверждает сравнение частотных распределений величины E для иммобилизованных и свободно диффундирующих нуклеосом (рис. 2, А, Б). Измерения свободно диффундирующих нуклеосом выполняли, как описано в предыдущих работах [6–8]. Близкие величины максимумов распределения указывают на сходную укладку ДНК у иммобилизованных и свободно диффундирующих нуклеосом, а отличия в ширине профилей, скорее всего, связаны с различиями во времени накопления сигнала: соответственно 2,4 с и 3 мс. Для иммобилизованных нуклеосом флуктуации E , связанные с подвижностью флуорофоров на сравнительно длинных линкерах, усредняются за 2,4 с интегрирования сигнала, чего не происходит при измерении флуоресценции нуклеосом в растворе с временной константой 3 мс.

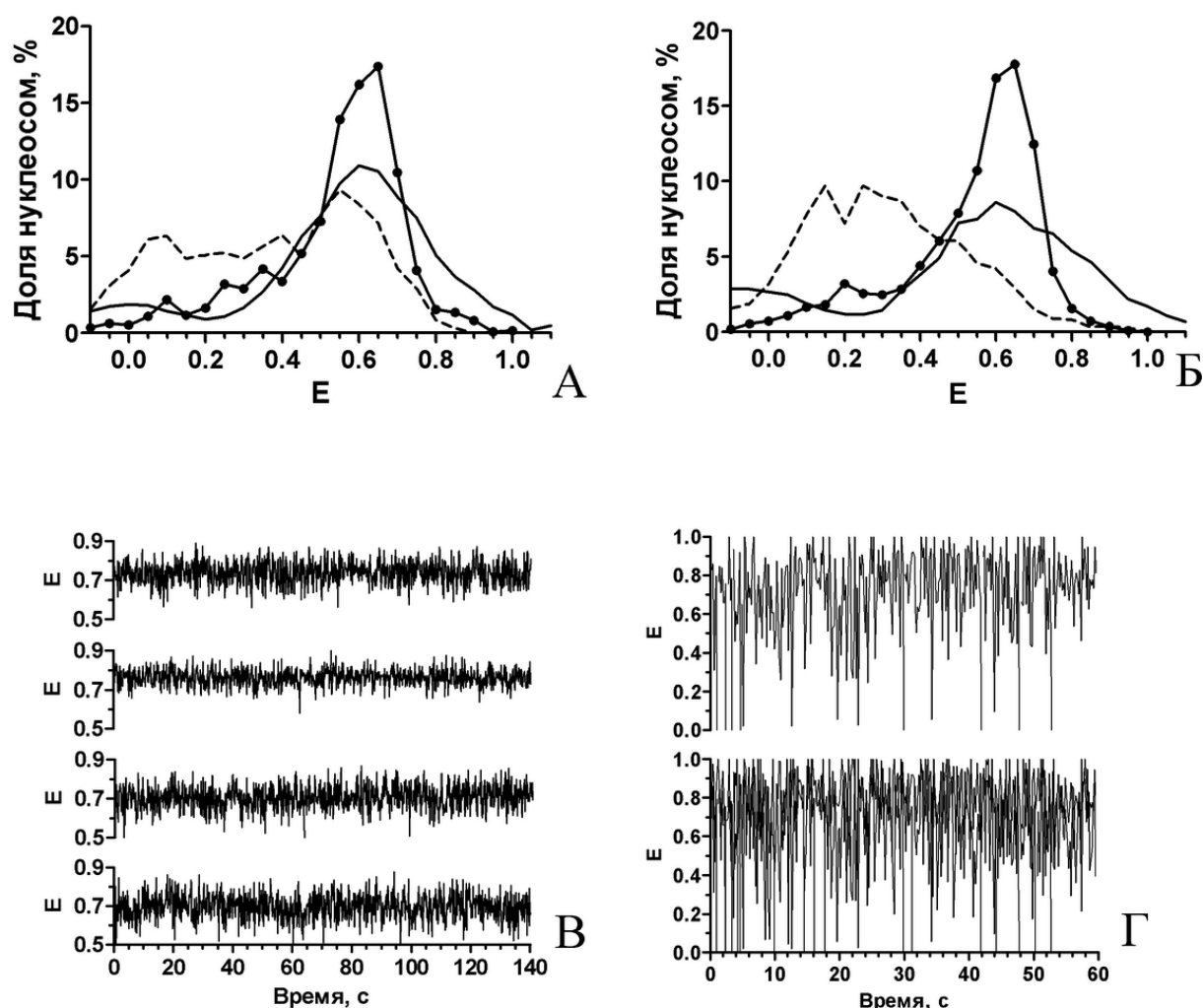


Рис. 2. А, Б — частотные распределения биотинилированных нуклеосом с метками в положениях +35, +113 (А) и +56, +135 (Б) пар нуклеотидов от входа в нуклеосому. Непрерывная линия — нуклеосомы, свободно диффундирующие в растворе. Прерывистая линия — нуклеосомы на поверхности, модифицированной ПЭГ-силаном 2 кДа и биотин-ПЭГ-силаном. Сплошная линия с точками — нуклеосомы на поверхности, модифицированной ПЭГ-силаном 2 кДа и биотин-ПЭГ-силаном 5 кДа. В, Г — типичные примеры динамики величины E для одиночных иммобилизованных нуклеосом с метками в положениях +35, +113 в буфере с 150 (В) и 600 (Г) мМ КСl

Существенным преимуществом иммобилизованных нуклеосом является возможность изучения изменений их структуры в динамике. Показано, что фотостабильность СуЗ и Су5 в условиях проводимых экспериментов достаточна для непрерывного наблюдения за нуклеосомами в течение 2–3 мин (рис. 2, В). При этом чувствительность экспериментальной установки и скорость считывания ЕМССD-камерой позволяют получать изображения нуклеосом каждые 120 мс. Анализ временных зависимостей величины Е для отдельных нуклеосом дает возможность изучать подвижность ДНК в области расположения меток. В удаленной от концов ДНК области нативных нуклеосом ДНК особенно прочно связана с гистоновым октамером, и ее укладка не меняется во времени, на что указывает узкий диапазон флуктуаций величины Е у нуклеосом, меченых в положениях +35 и +113 (рис. 2, В). Высокая ионная сила (600 мМ КСl) вызывает дестабилизацию структуры нуклеосом, что регистрируется как значительное возрастание амплитуды изменений величины Е (рис. 2, Г). Эти изменения Е свидетельствуют о том, что в условиях высокой ионной силы происходит периодическое

откручивание ДНК от гистонового кодра, которое имеет масштабный характер, затрагивая до 35 пар нуклеотидов, находящихся в контакте с октамером гистонов. При этом полной потери гистонов не происходит. Отметим, что анализ структурной динамики возможен только при изучении одиночных нуклеосом, так как в ансамбле нуклеосом разнонаправленные изменения структуры и, соответственно, величины Е будут усредняться.

Созданная экспериментальная установка в сочетании с разработанными методиками иммобилизации и исследования одиночных нуклеосом позволит изучать изменения в структуре нуклеосом, происходящие при их взаимодействии с разнообразными ядерными белками в динамике. Благодаря наличию в структуре иммобилизованных нуклеосом промотора и отсутствию влияния меток на транскрипцию [6, 8] в описанной системе возможно также проведение экспериментов по изучению структурных изменений, которые вызывает РНК-полимераза в нуклеосоме в процессе транскрипции в реальном времени.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sustarsic M., Kapanidis A.N. Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 34. P. 52–59.
2. Juetz M.F., Terry D.S., Wasserman M.R., Zhou Z., Altman R.B., Zheng Q., Blanchard S.C. The bright future of single-molecule fluorescence imaging // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. Vol. 20. P. 103–111.
3. Luo Y., North J.A., Poirier M.G. Single molecule fluorescence methodologies for investigating transcription factor binding kinetics to nucleosomes and DNA // *Methods.* 2014. Vol. 70. N 2–3. P. 108–118.
4. Ngo T.T., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 3964–3971.
5. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell.* 2015. Vol. 160. N 6. P. 1135–1144.
6. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
7. Feofanov A.V., Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Analysis of nucleosome transcription using single-particle FRET // *Springer Proc. Phys.* 2015. Vol. 164. P. 255–260.
8. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.

Поступила в редакцию
16.09.15

EXPERIMENTAL SETUP FOR STUDY OF IMMOBILIZED SINGLE NUCLEOSOMES USING TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE MICROSCOPY

K.S. Kudryashova^{1,2}, O.V. Chertkov^{1,2}, Y.O. Ivanov¹, V.M. Studitsky^{1,3}, A.V. Feofanov^{1,2,*}

¹ Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiyegory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, 117997, Moscow, Russia;

³ Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA

* e-mail: avfeofanov@yandex.ru

An experimental setup for study of immobilized molecules and their complexes by fluorescence microscopy with sensitivity at the single fluorophore level was developed. The installation records fluorescence images of immobilized molecules in two spectral ranges simultaneously, al-

lowing analysis based on the Förster resonance energy transfer effect. The fluorescence excitation is caused by evanescent light wave formed by the total internal reflection technique, and registration of signal with a highly sensitive detection system allows conducting measurements with a temporal resolution of about 100 ms. The glass surface modification protocol was developed for immobilization of nucleosomes via the high-affinity streptavidin-biotin interactions. To ensure immobilization, one of the DNA ends of fluorescently labelled nucleosomal DNA was biotinylated. The algorithm of image processing for analysis of structural rearrangements in single nucleosomes was developed. Fluorescence microscopy of single immobilized molecules and their complexes allows the analysis of nucleosome structural dynamics during transcription and its interaction with various nuclear proteins.

Key words: *nucleosome, chromotine, immobilization, fluorescence, microscopy, single molecule.*

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

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

Иванов Ярослав Олегович — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: dopellgunger@gmail.com

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). 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.: 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

МЕТОДЫ

УДК 581.17:582.263

СКРИНИНГ СРЕД С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ,
АССОЦИИРОВАННЫХ С БЕСПОЗВОНОЧНЫМИ БЕЛОГО МОРЯЕ.С. Лобакова^{1,*}, И.О. Селях¹, Л.Р. Семенова¹,
О.Б. Чивкунова¹, П.Н. Щербаков¹, А.Е. Соловченко^{1,2}¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН; Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35
* e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Оценивали способность к росту и накоплению биомассы трех выделенных из ассоциаций с морскими донными беспозвоночными животными штаммов *Desmodesmus* sp. (Scenedesmaceae, Chlorophyceae) — 1Pm66B, 2C166E, 3Dp86E-1 — в условиях периодического культивирования на жидких минеральных питательных средах (BG-11, среда Прата, Гольдберга, Громова, Тамия, искусственная морская вода) стандартного и модифицированного состава. Регистрировали визуальные показатели состояния культур, накопление биомассы, а также остаточное количество нитратного азота и фосфора. Интенсивный рост культур сопровождался защелачиванием среды до pH 10,0. Наибольший прирост биомассы отмечен на средах BG-11 (полной и с добавлением морской воды), Тамия, а также на среде Прата. Добавление искусственной морской воды не влияло на накопление биомассы *Desmodesmus* sp. в средах, содержащих связанный азот, а в отсутствие азота поддерживало рост, не вызывая агрегации клеток. По всем исследованным показателям среда BG-11 признана универсальной (пригодной для культивирования как симбиотических, так и свободноживущих микроводорослей). Среда Прата оптимальна для поддержания штаммов в коллекции.

Ключевые слова: *Desmodesmus*, накопление биомассы, тестирование сред, симбиотические микроводоросли, культивирование, биогенные элементы.

В последние годы активно исследуются возможности использования микроводорослей (МВ) в качестве источника возобновляемого сырья для биотоплива, а также для биоремедиации сельскохозяйственных отходов и загрязненных почв, очистки промышленных стоков и биоизъятия техногенных выбросов CO₂ [1]. Биомасса МВ также используется для производства пищевых добавок, удобрений, красителей, антиоксидантов и полиненасыщенных жирных кислот [2, 3]. Одним из лимитирующих факторов развития фотобиотехнологии в России является отсутствие патентно-чистых штаммов МВ с высоким биотехнологическим потенциалом. В этой связи особое внимание заслуживают штаммы МВ, выделенные из экстремальных мест обитания, не теряющие продуктивности в стрессовых условиях. К ним можно отнести МВ, формирующие симбиоз с беспозвоночными животными, обитающими в морях высоких широт. Однако успешные попытки выделения фототрофных микросимбионтов (цианобактерий и МВ) из животных единичны [4], так как культивирование их *in vitro* сопряжено с длительным периодом адаптации к апосимбиотическим условиям существования *ex animal* и требует тщательного подбора питательных сред. Особенно ак-

туальна эта задача для организмов, ранее не вводившихся в монокультуру.

В нашей лаборатории был получен ряд изолятов симбиотических МВ из донных беспозвоночных Белого моря. Установлено, что симбиотические изоляты обладают более высокой по сравнению со свободноживущими МВ устойчивостью к неблагоприятным условиям среды, а также высоким биотехнологическим потенциалом [5, 6]. Тем не менее, вопрос подбора оптимальных сред для культивирования симбиотических МВ из субарктических морей остается, в сущности, открытым. В настоящей работе тестировали ряд стандартных и модифицированных минеральных сред с целью выбора пригодных для лабораторного культивирования и сохранения в коллекциях исследованных нами симбиотических представителей МВ.

Материалы и методы

В работе использовали культуры зеленых МВ, изолированных из ассоциаций с беспозвоночными животными Ругозерской губы Кандалакшского залива Белого моря (66°34' N, 33°08' E). Исходные образцы беспозвоночных были собраны из мест с существенно различающимися условиями обита-

ния: гидроиды *Dynamena pumila* (L., 1758) и *Coryne lovenii* (M. Sars, 1846) — на Еремеевском пороге, каменистой сублиторали с активным постоянным перемешиванием морской воды и быстрым течением; кладки полихет *Phyllodoce maculata* (L., 1767) — в лужах на песчано-гравийной литорали в зоне опреснения водами прибрежных ручьев и максимальным прогревом воды в периоды отлива [7]. Фрагменты беспозвоночных, в которых визуально было выявлено присутствие МВ и цианобактерий, помещали в среду BG-11. Одновременно с цианобактериями из образцов беспозвоночных были выделены зеленые МВ [5, 6], идентифицированные по нуклеотидной последовательности фрагмента гена большой субъединицы RuBisCO *rbcL* и фрагмента ITS1-5.8S рРНК-ITS2 ядерного рибосомального кластера генов, а также по ультраструктурным особенностям как виды из рода *Desmodesmus* [8].

Культивирование и состав использованных сред.

МВ культивировали асептически фотоавтотрофно на минеральных средах стандартного и модифицированного состава. К стандартным средам относились среды BG-11 [9], Прата [10], Гольдберга [11], Громова № 1 [12], Тамия [13] и искусственная морская вода (соленость 27‰) без добавления витаминов [14]. В качестве модифицированных сред использовали среды без нитратного азота (BG-11₀ [15], среда Гольдберга), среды с добавлением морской воды в соотношении 1:1 (BG-11, BG-11₀, среда Гольдберга с минеральным азотом и без него), среда Прата, разбавленная вдвое дистиллированной водой; среда Прата с добавлением микроэлементов или без добавления. Во всех средах (кроме среды Прата без микроэлементов) использовали микроэлементы А5 [9]. Посевным материалом служили клетки, трижды отмытые от культуральной жидкости средой BG-11₀ центрифугированием (3000 g, 10 мин). Для каждой комбинации “организм — среда” выполнено не менее двух независимых экспериментов.

При периодическом культивировании в течение 4-х нед. в люминостате (фотосинтетически активная радиация — ФАР — 2 Вт/м²) по измерениям квантомером LI-850, “LiCOR”, США, на поверхности колбы) клетки МВ выращивали в колбах Эрленмейера в 100 мл среды при температуре 25°C и периодическом встряхивании (раз в сутки). Состояние культур оценивали визуально по следующим показателям: цвет, характер роста (гомогенность, агрегированность, адгезия к стенкам и/или дну колбы), накопление биомассы. Плотность засева во всех вариантах составляла 0,02 г сухого веса на литр среды.

рН среды регистрировали рН-метром “Аквилон рН410” с электродом ЭСК-10601/7. В литературе в прописях стандартных сред культивирования редко указывается рН после стерилизации. Во всех случаях рН среды доводили до 6,9–7,4.

В фотобиореакторе МВ культивировали в стерильных условиях в стеклянных пробирках (объем 600 мл, внутренний диаметр 40 мм) с силиконовыми пробками в 400 мл среды при постоянном освещении (ФАР 4 Вт/м²), температуре 25°C и продувании стерильным воздухом со скоростью 1 л/мин. В ходе эксперимента оценивали визуальные показатели роста МВ, прирост биомассы, изменения кислотности, а также остаточное количество неорганического фосфата и нитратного азота в среде культивирования. Начальная плотность культуры при интенсивном культивировании составляла 5 мг хлорофилла в литре среды.

Определение сухого веса. Для определения сухого веса клетки осаждали на доведенных до постоянной массы нитроцеллюлозных фильтрах “Millipore” (США) с диаметром пор 22 мкм. Фильтры с осажденными на них клетками высушивали в сушильном шкафу при 105°C.

Определение концентрации нитрата и фосфата. Содержание нитрата и ортофосфата в культуральной жидкости определяли методом ионной хроматографии на хроматографе ICS 1600 (“Thermo Dionex”, США) с кондуктометрическим детектором, аналитической колонкой IonPac AS12A (250×2 мм, 5 мкм) и предколонкой AG12A (50×2 мм, 5 мкм). Ионы элюировали изократически (скорость тока — 0,3 мл/мин) карбонатным буфером, содержащим 2,7 мМ Na₂CO₃ и 0,3 мМ NaHCO₃, при температуре 30°C.

Результаты и обсуждение

Многие виды МВ эволюционно адаптированы к обитанию в олиготрофной среде морских и пресноводных водоемов. Можно предположить, что соответствующая адаптация свойственна не только свободноживущим видам, но и МВ, образующим симбиозы и ассоциации с растениями и беспозвоночными. В то же время стандартные питательные среды, как правило, характеризуются высокими концентрациями солей. По-видимому, это обстоятельство является одной из важных причин неудачных попыток выделения МВ из их среды обитания. С учетом этого на начальных этапах введения в культуру полученных из природных образцов изолятов МВ целесообразно применение сред с достаточным для роста, но не чрезмерным содержанием элементов минерального питания. В настоящей работе использовали минеральные среды стандартного состава, а также обедненные и разбавленные дистиллированной водой среды (см. Материалы и методы).

Особое внимание уделяли тестированию исследованных МВ на средах, не содержащих нитратного азота, поскольку дефицит азота и азотное голодание индуцируют биосинтез ценных соединений — запасных липидов и вторичных каротиноидов в клетках многих свободноживущих [16] и симбиотических МВ [17].

Культивирование в колбах. Рост МВ на средах с относительно высоким содержанием нитратного азота сопровождался значительным повышением рН среды (рис. 1, а). Эта особенность может оказаться полезной при выращивании МВ в фотобиореакторах с продуванием газо-воздушной смесью с высоким содержанием углекислого газа, закисляющим при растворении среду культивирования.

Негативное влияние низких значений рН на скорость роста и продуктивность культур компенсируется защелачиванием, характерным для роста МВ на нитратных средах. Наибольшее защелачивание (до $\text{pH} \geq 10,0$) наблюдали у штаммов *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1 и 1Pm66B на средах BG-11, Прата, Тамия и Гольдберга, содержащих связанный азот. В случае штамма *Desmodesmus* sp. 2Cl66E, растущего

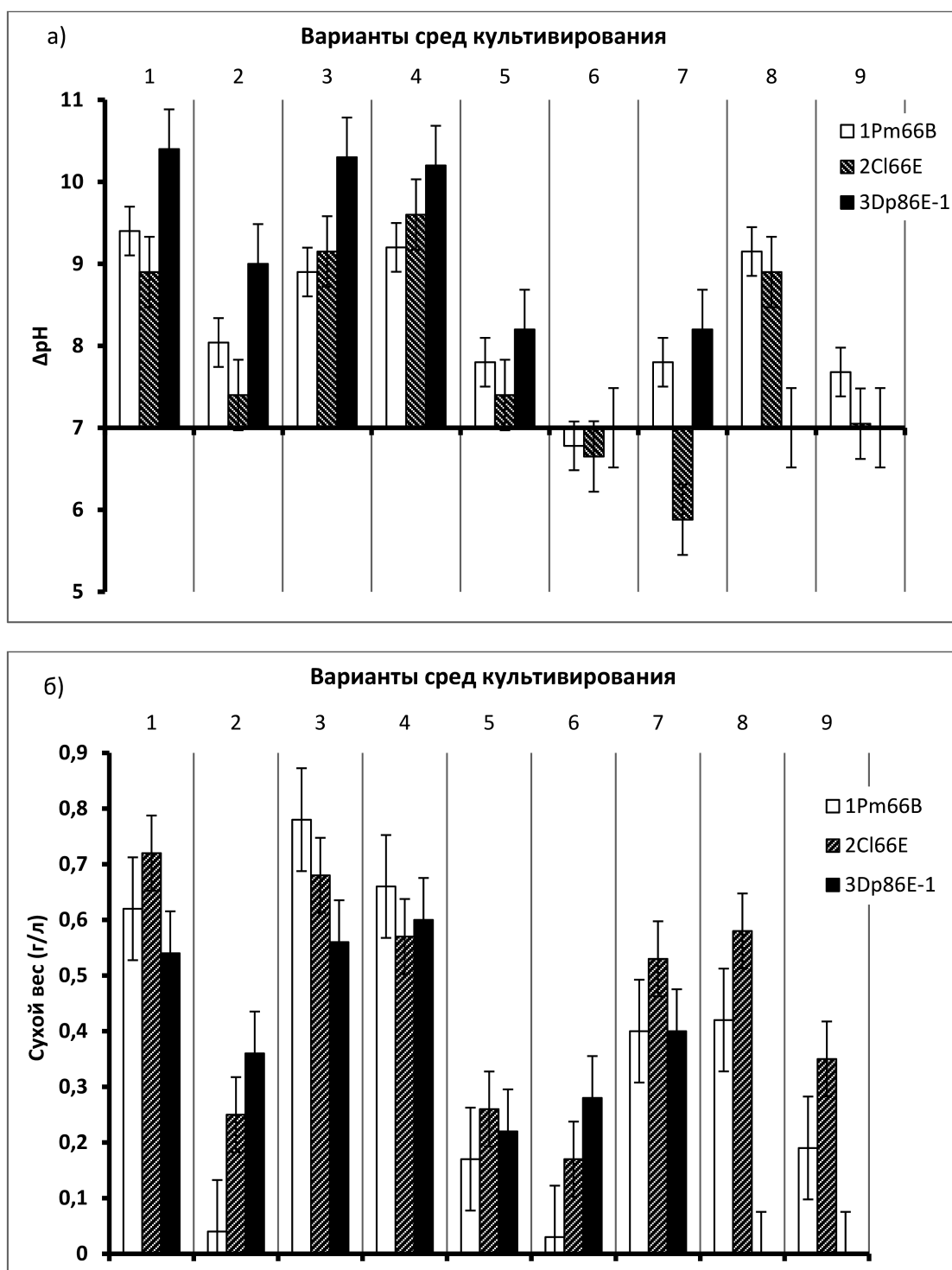


Рис. 1. Изменение pH среды (а) и прирост биомассы (б) в культурах симбиотических штаммов *Desmodesmus* sp. (1Pm66B, 2Cl66E и 3Dp86E-1) на различных средах — BG-11 (1), Гольдберга (2), Прата (3), Тамия (4), BG-11₀ (5), Гольдберга без азота (6), искусственной морской воде (ИМВ, 7), BG-11 + ИМВ (8), BG-11₀ + ИМВ (9) — после 28 сут роста в колбах. Приведены стандартные ошибки среднего

на среде Гольдберга со связанным азотом, сдвига pH не наблюдали. На безазотных аналогах этих сред и морской воде ни один из исследованных штаммов не вызвал существенного изменения pH среды при росте. Защелачивание среды культивирования (предположительно, вследствие поглощения нитрат-аниона) может косвенно свидетельствовать об активном росте культур.

Характер роста штаммов MB существенно зависел от типа среды культивирования. Для всех MB на среде Громова №1 отмечали сильную адгезию клеток на стенках колб и их слипание в мелкие агрегаты без существенного прироста биомассы. Планктонный гомогенный рост был характерен для штамма *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1 во всех испытанных вариантах и, по-видимому, является его специфической особенностью. Для штамма 1Pm66B при выращивании на средах со связанным азотом было характерно сильное прилипание клеток к стенкам культивационных сосудов.

Динамика роста штаммов *Desmodesmus* sp. 2Cl66E и 1Pm66B на среде BG-11 в разных модификациях, а также на средах Прата (исходной и разбавленной) и Тамия была сходной. Рост MB характеризовался незначительной адгезией и агрегацией клеток. Культивирование штамма 2Cl66E на безазотной среде Гольдберга сопровождалось сильной агрегацией клеток.

Накопление биомассы на исследованных средах зависело от наличия в среде нитратного азота (рис. 1, б). Максимальный прирост биомассы всех штаммов был зарегистрирован на средах BG-11,

Прата (независимо от наличия микроэлементов и концентрации солей) и Тамия. В этих случаях он составил 0,7–0,9 г/л сухого веса (на рис. 1, б приводятся данные только для полной среды Прата, поскольку существенных различий в приросте биомассы на ее модификациях не выявлено). На среде Гольдберга рост штаммов *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1 и 2Cl66E был незначительным, а у штамма 1Pm66B рост не зарегистрирован.

На безазотных вариантах сред и средах с искусственной морской водой рост всех исследованных штаммов MB был медленным и накопление биомассы не превышало 0,3 г/л сухого веса. Добавление искусственной морской воды в среды BG-11 и Гольдберга не влияло на физиологические характеристики растущих на них штаммов MB, но поддерживало их рост на данных средах и в отсутствие нитратного азота (рис. 1, б). Среда с искусственной морской водой не вызывали агрегации клеток штаммов *Desmodesmus* sp. 3Dp86E-1 и 2Cl66E. В то же время, у штамма *Desmodesmus* sp. 1Pm66B добавление морской воды, как и выращивание на ней, сопровождалось слипанием клеток в крупные агрегаты.

Культивирование штаммов MB в фотобиореакторе. Для культивирования MB в фотобиореакторе были выбраны среды BG-11 и среда Прата (полная и без микроэлементов). Среду Тамия не использовали в данных опытах из-за высокого содержания биогенных элементов, что в отдельных случаях приводило к выпадению осадка после стерилизации и затрудняло анализ изъятия биогенных элементов клетками MB в ходе эксперимента.

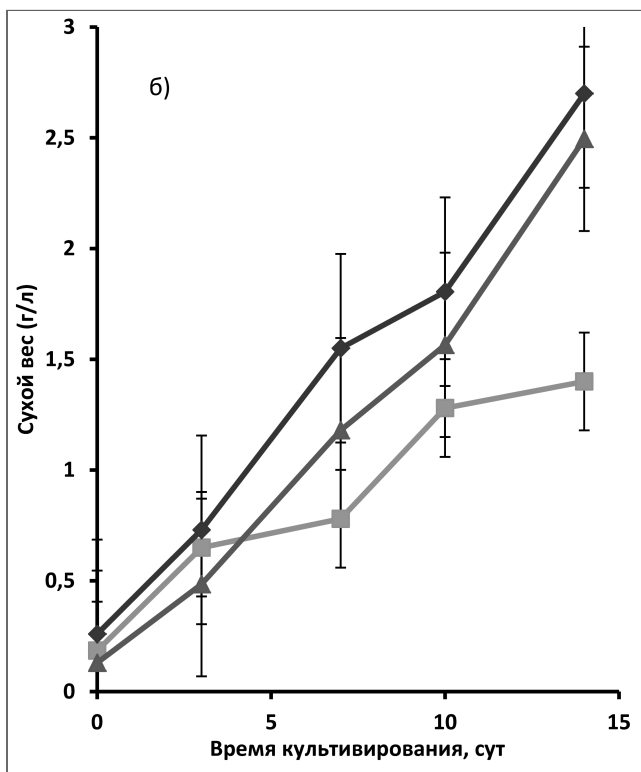
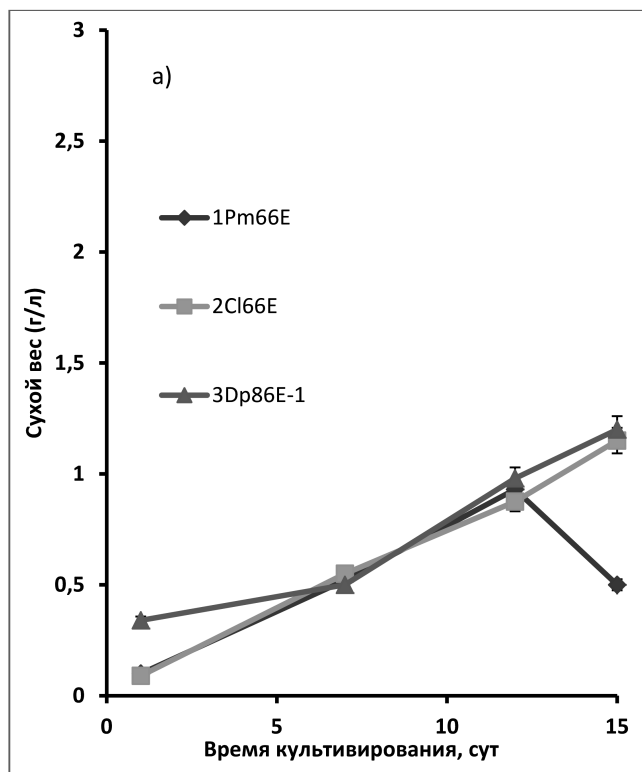


Рис. 2. Накопление биомассы штаммами *Desmodesmus* sp. (1Pm66B, 2Cl66E и 3Dp86E-1) при культивировании в фотобиореакторе на средах Прата (а) и BG-11 (б). Приведены стандартные ошибки среднего

Для культур, выращенных в биореакторах, регистрировали рост (рис. 2) и скорость биоизъятия основных биогенных элементов — азота и фосфора — во избежание возникновения лимитирования роста МВ нехваткой этих элементов.

В случае культивирования МВ на среде Прата с низкой концентрацией нитрата и ортофосфата (100 и 10 мг/л соответственно) уже к 7-м сут роста культуры практически полностью ($>99\%$ NO_3^- и $>95\%$ PO_4^{3-}) поглощали нитрат и фосфат из среды, однако стационарной фазы роста достигали только на 10–12-е сут. Добавление микроэлементов не влияло на скорость роста исследуемых культур. К концу эксперимента они накапливали 0,4–0,8 г/л сухого веса.

При культивировании МВ на среде BG-11, существенно более богатой биогенными элементами по сравнению со средой Прата, наблюдается лишь частичное ($<20\%$) изъятие нитрата на 7-е сут роста; полного изъятия нитрата не наблюдали и на 17-е сут. Концентрация ионов PO_4^{3-} в культуральной жидкости к 5–7-м сут роста снижалась на 50–60%. Прирост биомассы на среде BG-11 был в два раза выше, чем на среде Прата, логарифмическая фаза роста была более длительной. К 17-м сут культивирования концентрация PO_4^{3-} снижалась более чем на 90%, а прирост биомассы достигал 600%. Полученные данные иллюстрируют преимущества среды BG-11 при культивировании исследованных МВ в биореакторах.

Как правило, среды для культивирования эукариотных МВ содержат нитрат калия, тогда как BG-11 содержит нитрат натрия. Тем не менее, среда BG-11, исходно использованная для выделения цианобактерий из донных беспозвоночных Белого моря, оказалась пригодной для культивирования и зеле-

ных МВ. Тестирование распространенных сред, применяемых при выращивании МВ, показало, что в каждом случае необходим поиск среды, подходящей для конкретных культур и задач культивирования. Среда Прата (как полная, так и разбавленная) оптимальна для поддержания выделенных культур в условиях коллекции. Поскольку добавление микроэлементов мало влияло на их рост и сохранность культур, для коллекционных культур, по-видимому, оказывается достаточным следовых количеств микроэлементов в реактивах, используемых для приготовления среды.

Среда Тамия из-за высокой концентрации нитратов в дальнейшем в наших исследованиях не использовалась, хотя ее применение возможно при соответствующем разведении. С учетом полученных данных можно считать среду BG-11 пригодной для решения полного спектра задач по выделению и культивированию как свободноживущих, так и симбиотических МВ. Исходно разработанная для культивирования цианобактерий [9], эта среда оказалась подходящей для выделенных и охарактеризованных в нашей лаборатории симбиотических представителей рода *Desmodesmus* и свободноживущих МВ из родов *Haematococcus* [19], *Chlorella* [20] и *Acutodesmus* [21]. Следует также отметить, что безазотная модификация среды BG-11, BG-11₀, успешно использовалась для индукции биосинтеза липидов [17, 18] в клетках штаммов *Desmodesmus*, изученных в настоящей работе. Данное обстоятельство позволяет считать ее перспективной при разработке биотехнологий для получения биомассы, обогащенной этими соединениями.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловченко А.Е., Лобакова Е.С., Барский Е.Л., Савина Я.В., Дольникова Г.А., Лукьянов А.А., Кирпичников М.П. Экологические фотобиотехнологии для очистки сточных вод // Биотехнология. 2011. Т. 6. С. 70–88.
2. Borowitzka M.A., Borowitzka L.J., Kessly D. Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina* // J. Appl. Phycol. 1990. Vol. 2. N 2. P. 111–119.
3. Spolaore P., Joannis-Cassa C., Duran E., Isambert A. Commercial applications of microalgae // J. Biosci. Bioeng. 2006. Vol. 101. N 2. P. 87–96.
4. Hill R. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery // Microbial diversity and bioprospecting / Eds. A.T. Bull. Washington, DC: ASM Press, 2006. P. 177–190.
5. Gorelova O.A., Kosevich I.A., Baulina O.I., Fedorenko T.A., Torshkheeva A.Z., Lobakova E.S. Associations between the White sea invertebrates and oxygen-evolving phototrophic microorganisms // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2009. Vol. 64. N 1. P. 16–22.
6. Gorelova O.A., Baulina O.I., Solovchenko A.E., Fedorenko T.A., Kravtsova T.R., Chivkunova O.B., Koksharova O.A., Lobakova E.S. Green microalgae isolated from associations with white sea invertebrates // Microbiology. 2012. Vol. 81. N 4. P. 505–507.
7. Пятаева С.В., Лобакова Е.С., Косевич И.А. Цианобактерии — эндосимбионты колониальных гидроидных // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. 2006. № 4. С. 39–42.
8. Gorelova O., Baulina O., Solovchenko A., Chekanov K., Chivkunova O., Fedorenko T., Lobakova E. Similarity and diversity of the *Desmodesmus* spp. microalgae isolated from associations with White Sea invertebrates // Protoplasma. 2015. Vol. 252. N 2. P. 489–503.
9. Stanier R., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales) // Bacteriol. Rev. 1971. Vol. 35. N 2. P. 171–205.
10. Prát S. Algarum, Hepaticarum, Muscorumque in culturis collectio // Preslia. 1948. Vol. 22–23. P. 1–12.
11. Кабанова Ю.Г. Органический фосфор как источник питания фитопланктона: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1958. 13 с.
12. Громов Б.В., Тумова Н.Н. Коллекция культур водорослей лаборатории микробиологии Биологического института Ленинградского университета // Культивирование коллекционных штаммов водорослей / Под ред. Б.В. Громова. Л.: ЛГУ, 1983. С. 3–27.

13. Tamiya H. Mass culture of algae // Annu. Rev. Plant Physiol. 1957. Vol. 8. P. 309–334.
14. Reed R. H., Stewart W.D.P. Evidence for turgor-sensitive K⁺ influx in the cyanobacteria *Anabaena variabilis* ATCC 29413 and *Synechocystis* PCC 6714 // Biochim. Biophys. Acta — Biomembranes. 1985. Vol. 812. N 1. P. 15–162.
15. Stanier R., Cohen-Bazire G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria // Annu. Rev. Microbiol. 1977. Vol. 31. P. 225–274.
16. Guschina I.A., Harwood J.L. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry // Lipids in Aquatic Ecosystems / Eds. M. Kainz and M. Brett. Dordrecht: Springer, 2009. P. 1–24.
17. Solovchenko A.E., Chivkunova O.B., Semenova L.R., Selyakh I.O., Shcherbakov P.N., Karpova E.A., Lobakova E.S. Stress-induced changes in pigment and fatty acid content in the microalga *Desmodesmus* sp. isolated from a White Sea hydroid // Rus. J. Plant Physiol. 2013. Vol. 60. N 3. P. 313–321.
18. Solovchenko A., Gorelova O., Baulina O., Selyakh I., Semenova L., Chivkunova O., Scherbakov P., Lobakova E. Physiological plasticity of symbiotic *Desmodesmus* (Chlorophyceae) isolated from taxonomically distant white sea invertebrates // Rus. J. Plant Physiol. 2015. Vol. 62. N 5. P. 653–663.
19. Chekanov K., Lobakova E., Selyakh I., Semenova L., Sidorov R., Solovchenko A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia) // Mar. Drugs. 2014. Vol. 12. N 8. P. 4504–4520.
20. Solovchenko A., Pogosyan S., Chivkunova O., Selyakh I., Semenova L., Voronova E., Scherbakov P., Konyukhov I., Chekanov K., Kirpichnikov M., Lobakova E. Phycoremediation of alcohol distillery wastewater with a novel *Chlorella sorokiniana* strain cultivated in a photobioreactor monitored on-line via chlorophyll fluorescence // Algal Res. 2014. Vol. 6. Part B. P. 234–241.
21. Исмагулова Т.Т., Шебанова А.С., Баулина О.И., Горелова О.А., Чеканов К.А., Лобакова Е.С. Анализ элементного состава вакуолярных включений зеленых микроводорослей методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии // Всероссийский симпозиум с международным участием “Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов” (24–27 декабря 2014 г.). М.: Макс Пресс, 2014. С. 107.

Поступила в редакцию
31.08.2015 г.

SCREENING OF CULTURE MEDIA WITH DIFFERENT NUTRIENT CONTENT FOR CULTIVATION OF MICROALGAE ASSOCIATED WITH WHITE SEA BENTHIC INVERTEBRATES

E.S. Lobakova^{1,*}, *I.O. Selyakh*¹, *L.R. Semenova*¹,
*O.B. Chivkunova*¹, *P.N. Scherbakov*¹, *A.E. Solovchenko*^{1,2}

¹ Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276, Russia

* e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

The growth and biomass accumulation of three microalgal strains of *Desmodesmus* (Scenedes-maceae, Chlorophyceae), 1Pm66B, 2Cl66E, 3Dp86E-1, isolated from White Sea benthic inverte-brates were studied under conditions of batch culture in different standard (BG-11, Prat, Gold-berg, Gromov, Tamiya, artificial sea water) and modified media. Culture condition and biomass accumulation were recorded as well as the uptake of nitrate and phosphate. Vigorous growth of the microalgae brought about a significant alkalization of the culture medium to pH 10. The most sig-nificant biomass accumulation was recorded in BG-11 (the complete medium and one with addi-tion of artificial sea water), Tamiya and Prat media. Addition of the sea water did not affect the growth of *Desmodesmus* sp. in the nitrate-containing media although that maintained the growth of the microalgae in the nitrogen-lacking media without cell aggregation. The obtained results suggest the suitability of BG-11 medium for isolation and cultivation of both symbiotic and free-living microalgae. The Prat medium is more suitable for maintaining the microalgal strains in collection.

Keywords: *Desmodesmus*, biomass accumulation, testing cultural medium, symbiotic microalgae, cultivation, biogenic elements.

Сведения об авторах:

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биоло-гического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-41-69; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Селях Ирина Олеговна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-20-83; e-mail: i-savelyev@mail.ru

Семенова Лариса Ратмировна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинже-нерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-20-83; e-mail: semelar@mail.ru

Чивкунова Ольга Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-38-07; e-mail: olga.chivkunova@mail.ru

Щербаков Павел Николаевич — инженер-лаборант кафедры биоинженерии биологи-ческого факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-20-83; e-mail: 06keeper60@gmail.com

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии био-логического факультета МГУ, ведущий научный сотрудник Института физиологии расте-ний им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

МЕТОДЫ

УДК 577.21

**ИЗМЕНЕНИЕ КОНФОРМАЦИИ ЛИНКЕРНОЙ ДНК ПРИ СВЯЗЫВАНИИ
ГИСТОНА H1.5 С НУКЛЕОСОМОЙ: ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ
ОДИНОЧНЫХ КОМПЛЕКСОВ****А.В. Любителев¹, К.С. Кудряшова^{1,2}, М.С. Михайлова¹, Н.В. Малюченко¹,
О.В. Чертков^{1,2}, В.М. Студитский^{1,3,*}, А.В. Феофанов^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}**

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН;
Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз;
США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

* e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Разработана методика синтеза флуоресцентно-меченой ДНК для сборки мононуклеосом с ДНК-линкерами длиной 40 пар нуклеотидов (п.н.). Метки Су3 и Су5 введены в линкеры на расстояниях соответственно 10 п.н. до первого и 15 п.н. после последнего нуклеотида нуклеосом-позиционирующей последовательности ДНК. В отсутствие линкерного гистона H1.5 исследование методом флуоресцентной микроскопии одиночных комплексов выявило наличие двух равновероятных состояний нуклеосом, отличающихся конформацией ДНК-линкеров: открытой — с эффективностью переноса энергии Е между метками, равной 0,06, и закрытой — с $E = 0,37$, где линкеры сближены. Связывание гистона H1.5 с нуклеосомами происходит в наномолярном диапазоне концентраций, и скорость образования комплексов существенно выше, чем скорость их диссоциации. В комплексах происходит значительное сближение линкеров ($E = 0,73$), а их конформация в области меток становится более единообразной. Разработанные нуклеосомные конструкторы являются высокочувствительными флуоресцентными сенсорами для анализа структурных перестроек линкеров и в комбинации с методом микроскопии одиночных комплексов позволяют изучать структуру комплексов нуклеосом с различными архитектурными белками хроматина.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, линкерный гистон H1, флуоресценция, микроскопия, одиночная молекула.

Эффект Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET) широко используется в биологических исследованиях флуоресцентно-меченых молекул для изучения структурных перестроек биополимеров и межмолекулярных взаимодействий [1–3]. В комбинации с методом флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и комплексов FRET позволяет изучать сложные молекулярные системы, в которых присутствуют несколько отличающихся по структуре состояний, и выявлять эти состояния, скрытые в традиционных измерениях, основанных на усреднении флуоресценции множества молекул [4–6]. Данный подход все активнее применяется в нуклеосомных исследованиях [6–13], а его результативность и спектр решаемых задач в значительной мере зависят от оптимального расположения донор-акцепторной пары флуорофоров в изучаемой молекулярной системе. Например, введение меток Су3 и Су5 в соседние сверхспиральные витки ДНК в центральной [11] или дистальной от промотора [7, 9] областях нуклеосомного ядра позволяет изучать

структурные перестройки ДНК в этих областях при транскрипции хроматина РНК-полимеразой.

Не менее важными функциональными участками, вовлеченными в процессы организации хроматина и транскрипции нуклеосом, являются межнуклеосомные области ДНК-линкеры. Именно с ними взаимодействуют линкерные гистоны, способствуя упаковке нуклеосом в структуры более высокого порядка, а также некоторые факторы, регулирующие транскрипцию. Применение рентгеноструктурного анализа и спектроскопии ЯМР для изучения взаимодействия H1/H5 с нуклеосомой затруднено из-за большого молекулярного веса комплекса и низкой структурированности области взаимодействия. В проведенных ранее исследованиях установлено, что связывание H1/H5 защищает от воздействия гидроксид-радикалов область протяженностью более 15 нуклеотидов [14] и существенно изменяет конформацию линкеров, фиксируя их [15, 16]. Расшифровка структурных основ взаимодействия линкерных гистонов с нуклеосомой позволит прояснить целый ряд важных вопро-

сов — от принципов организации хроматина до механизмов регуляции раннего эмбрионального развития.

В настоящей статье представлены данные о разработке флуоресцентных нуклеосом для изучения конформации линкеров с помощью микроскопии одиночных комплексов и результаты исследования этих нуклеосом, а также их комплексов с гистонем H1.5 человека.

Материалы и методы

В работе использовали реагенты, описание которых дано в работах [7, 9, 11, 17]. Хроматин без гистона H1 выделяли из эритроцитов цыплят по методике, описанной ранее [17], и использовали как источник гистонов при сборке нуклеосом. ДНК-матрицу с позиционирующей последовательностью 603 (147 пар нуклеотидов, (п.н.)) получали при помощи двухстадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР). На первой стадии ПЦР выполняли с укороченными праймерами, используя в качестве матрицы плазмиду pDS1 со вставкой последовательности 603 по сайтам рестрикции XhoI и SacI. Праймеры были комплементарны концевым фрагментам последовательности 603 и имели следующие последовательности:

5'-CACCGGCACGAGGGCCCGGTTC-3';

5'-ACTTTCTGGCAAGAAAATGAGCT-3'.

ПЦР-продукт длиной 180 п.н. был очищен при помощи электрофореза (4–6 В/см, 2 ч) в 2%-ном агарозном геле на 0,5-кратном трис-боратном электродном буфере (TBE — 44,5 мМ Трис, 44,5 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА), содержащем 0,5 мг/мл бромистого этидия. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора для экстракции ДНК из геля E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Omega Biotek), следуя инструкциям производителя. ДНК (180 п.н.) служила матрицей для второй стадии ПЦР с праймерами, идентичными флуоресцентно меченым (см. ниже), но без меток. ПЦР-продукт (227 п. н.) был очищен, как описано выше, а отсутствие в нем ошибок подтверждено секвенированием с использованием праймеров длиной 38 п.н. Далее ДНК (227 п.н.) была использована как матрица для ПЦР со следующими флуоресцентно мечеными по тимидину олигонуклеотидами (“Синтол”, Россия) в качестве праймеров:

5'-TAAGGCGAATTCACAACCTTTTGGCT^{Cy5}AGA
AAATGAGCT-3';

5'-ACACGGCGCACTGCCAACCCAAACGACACC
T^{Cy3}GCACGAG-3'.

Конечный продукт реакции выделяли, как описано выше. Включение меток в состав ДНК подтверждали при помощи электрофореза в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) при соотношении акриламид:бисакриламид 39:1 в нативных условиях и флуоресцентного анализа геля с помощью ска-

нера Typhoon (GE Healthcare) в диапазонах возбуждения и эмиссии, характерных для Cy3 и Cy5.

Нуклеосомы собирали на (Cy3, Cy5)-меченой ДНК-матрице в ходе диализа против растворов с последовательно уменьшающейся концентрацией NaCl по протоколу, описанному в работе [17]. Сборку нуклеосом (>97%) контролировали методом электрофореза в 4,5%-ном ПААГ (неденатурирующие условия, 0,5-кратный буфер TBE) по флуоресценции Cy3 в составе ДНК (рисунок, Б).

Полноразмерный рекомбинантный гистон H1.5 человека был получен в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3)PlysS (Promega), любезно предоставленных проф. Димитровым [18]. Клетки выращивали в жидкой среде Лурия-Бертани в течение 3 ч, производили индукцию при помощи изопропил-бета-D-тиогалактопиранозид, ИПТГ, (0,1 мМ) и инкубировали далее 3 ч при 37°C. Биомассу бактерий осаждали центрифугированием при 5500 g в течение 15 мин, ресуспендировали в 50 мл буфера А (20 мМ Tris-HCl pH7,4, 100 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 1 мМ дитиотреитол, 10%-ный глицерин) с добавкой ингибиторов протеаз и разрушали ультразвуковой обработкой. Полученную суспензию центрифугировали при 21500 g в течение 30 мин при 4°C. Гистон H1.5 выделяли из супернатанта методом ионообменной хроматографии на колонке с фосфоцеллюлозой P11. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, а чистоту (>95%) подтверждали с помощью денатурирующего электрофореза в 12 %-ном ПААГ.

Нуклеосомы (20 нМ) смешивали с гистонем H1.5 (5–20 нМ) в буфере для транскрипции (ТБ-буфер), содержащем 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ MgCl₂, 2 мМ 2-меркаптоэтанол и 150 мМ KCl, после чего инкубировали 15–20 мин при 37°C. (Cy3, Cy5)-меченую ДНК-матрицу, нуклеосомы или их комплексы с H1.5 разбавляли до концентрации 0,2 нМ в ТБ-буфере с добавкой 0,1%-ного полиэтиленгликоля (380–420 Да) и переносили в лунку камеры Lab-Tek (Thermo Scientific, США) для анализа под микроскопом.

Измерения одиночных нуклеосом (и их комплексов) проводили методом двухканальной лазерной конфокальной микроскопии, используя установку, описанную в работах [7, 9, 11]. Одиночные нуклеосомы диффундировали через фокус лазерного луча, где для каждой из них измеряли интенсивности флуоресценции Cy3 (I₃) и Cy5 (I₅). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 514,5 нм (2 мкВт под объективом), а регистрировали в диапазонах 530–635 нм (Cy3) и 635–800 нм (Cy5) с константой интегрирования 5 мс. Диаметр конфокальной диафрагмы соответствовал 1 диску Эйри. Измерения выполняли в течение 10 мин, а величина выборки составляла 4000–6000 нуклеосом. Стабильность образцов во времени измеряли в течение 30 мин, анализируя выборки данных из последовательных пятиминутных интервалов. Алгоритм распознавания и обработки сигналов от-

дельных нуклеосом описан в работах [7, 9, 11]. Для каждой нуклеосомы по значениям I_3 и I_5 рассчитывали эффективность FRET (E):

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

где коэффициенты 0,19 и 0,81 введены для учета перекрывания спектров флуоресценции Cy3 и Cy5 в области 635–800 нм. Набор значений E, полученных в трех независимых измерениях, объединяли, графически представляли в виде гистограммы относительной частоты распределения величины E и описывали в виде суперпозиции полос Гауссовой формы. Итоговый размер выборок составил не менее 15000 нуклеосом.

Результаты и обсуждение

При разработке нуклеосом, меченых по линкерной ДНК, были учтены данные методов футпринтинга [18], криоэлектронной микроскопии [11, 20], молекулярного моделирования [21, 22] и рентгеноструктурного анализа [23], согласно которым глобулярный домен Н1 связывается в области входа и выхода ДНК из ядра нуклеосомы, фиксируя при этом участок, как минимум, одного из линкеров длиной 10–15 п.н. [15, 18, 23]. Существующие модели комплексов нуклеосомы с Н1 предсказывают значительное сближение участков линкеров, отстоящих от ядра нуклеосомы на 10–15 п.н. При выборе положения флуоресцентных меток Cy3 и Cy5 в линкерных участках ДНК ставилась задача соблюсти следующие условия. Метки должны находиться вне области предполагаемого связывания глобулярного домена гистона Н1, чтобы исключить их влияние на комплексообразование, а также избежать тушения флуоресценции или ограничения подвижности флуорофоров, влияющих на эффективность FRET. Эффективность FRET должна быть ненулевой при максимальном удалении линкеров друг от друга и значительно возрастать при их сближении. С учетом результатов молекулярного моделирования метка Cy3 была размещена на расстоянии 10 п.н. до первого нуклеотида (рисунок, А), а Cy5 — на расстоянии 15 п.н. после последнего нуклеотида позиционирующей последовательности ДНК-матрицы 603. При этом длина линкеров, выходящих за пределы ядра нуклеосомы, составила 40 п.н. Были подобраны условия, при которых эффективность сборки нуклеосом достигала >97% (рисунок, Б).

Измерения одиночных нуклеосом в разбавленных растворах, проведенные с помощью конфокальной микроскопии по методике, описанной ранее [7, 9, 11], выявили, что нуклеосомы гетерогенны по величине FRET (E) и могут быть описаны суммой двух нормальных распределений (состояний) с максимумами E, равными 0,06 и 0,37 (рисунок, В). Доли нуклеосом, находящихся в этих состояниях, примерно равны и не меняются во времени (рисунок, В, Д). Следовательно, состояние с E = 0,06 не является результатом появления свободной ДНК

из-за диссоциации нуклеосом в разбавленном растворе. Данный вывод дополнительно подтвержден измерением распределения свободной флуоресцентно-меченой ДНК по величине E, которое достоверно отличается от состояния нуклеосом с E = 0,06 и имеет максимум, равный 0,00 (рисунок, В). В свободной двухцепочечной ДНК метки Cy3 и Cy5 находятся далеко друг от друга, и FRET между ними не наблюдается. Состояние с E = 0,06 не связано с тушением флуоресценции Cy5 или переходом Cy5 в долгоживущее триплетное состояние, так как в аналогичных измерениях нуклеосом с метками, введенными в области ядра близко друг к другу, доля нуклеосом с E = 0,0–0,2 не превышает 3–5% [7, 9, 11].

Обнаруженное распределение (рисунок, В) соответствует двум состояниям нуклеосом, отличающимся по конформации линкеров. У нуклеосом в состоянии с E = 0,06 метки Cy3 и Cy5 больше удалены друг от друга и линкеры сильнее отведены от ядра нуклеосомы, по сравнению с нуклеосомами в состоянии с E = 0,37 (состояния 1 и 2 на рисунке, Ж). Электростатическое отталкивание полианионных линкеров способствует переходу в состояние с E = 0,06, а образование линкерами связей с положительно заряженными гистонами в области выхода ДНК из ядра нуклеосомы благоприятно для состояния с E = 0,37. При этом взаимодействие с противоionsами в солевых растворах способствует стабилизации нуклеосомы в одном из возможных состояний. Более открытая конформация линкеров, очевидно, облегчает взаимодействие нуклеосом с факторами (такими, как РНК-полимераза), функционирование которых требует откручивания ДНК от нуклеосомы. Сближенная конформация линкеров способствует связыванию факторов, которые взаимодействуют сразу с обоими линкерами, вызывают компактизацию нуклеосомы и препятствуют откручиванию ДНК.

К последним факторам можно отнести линкерный гистон Н1 и, в частности, его вариант Н1.5. Обнаружено, что образование комплекса Н1.5 с нуклеосомой сопровождается появлением нового состояния, максимум распределения по величине E у которого равен 0,73 (рисунок, Г). По мере увеличения концентрации гистона Н1.5 от 5 до 20 нМ доля нуклеосом в состояниях с E = 0,06 и E = 0,37 снижается, а доля нуклеосом с E = 0,73 растет. При этом комплексы формируются за времена менее 10 мин (данные не показаны). Зарегистрировать полный переход нуклеосом в состояние с E = 0,73 затруднительно из-за резкого усиления их агрегации при дальнейшем повышении концентрации Н1.5. Агрегация нуклеосом происходит под действием и других вариантов гистона Н1 [24]. Комплексы нуклеосом с Н1.5 мы исследовали при концентрации, в 100 раз меньшей, чем при их формировании. В этих условиях происходит медленная диссоциация комплексов, которая детектируется, начиная с 15 мин после разбавления комплексов, по умень-

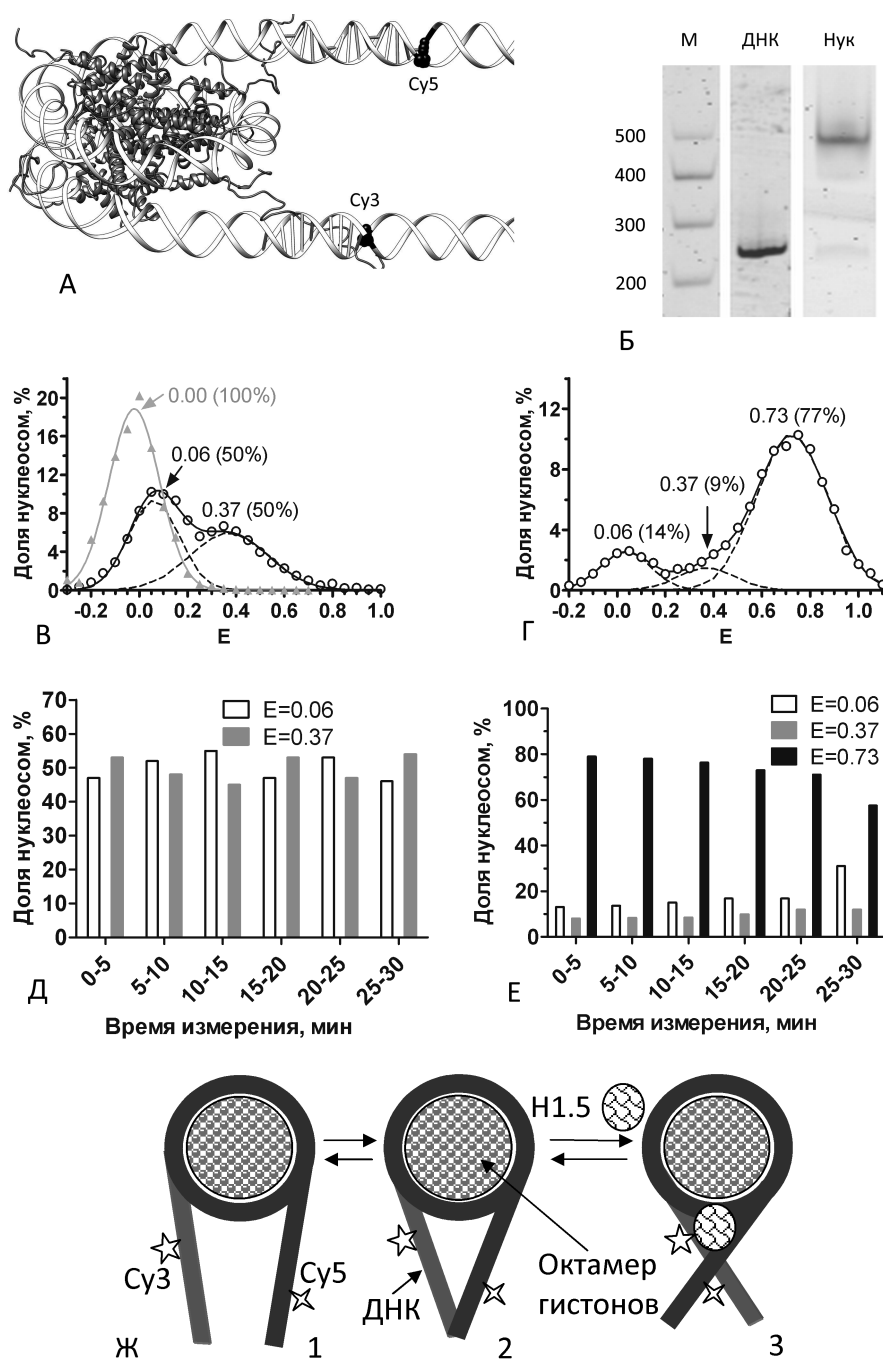


Рисунок. А — Модель нуклеосомы с линкерами длиной 40 п.н. с положением меток Cy3 и Cy5 на линкерах. Б — Электрофореграммы свободной ДНК (средняя дорожка) и нуклеосом (правая дорожка), собранных на ее основе. Разделение проводили в 4,5%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в неденатурирующих условиях. Детекция по флуоресценции Cy3 в составе ДНК; М — флуоресцеин-меченые маркеры ДНК и их размеры в п.н. В — Частотные распределения по величине E свободной ДНК (серая линия, треугольники) и нуклеосом (черная линия, кружки). Г — Частотное распределение по величине E комплексов нуклеосом с H1.5 (непрерывная линия, кружки) при молярном соотношении H1.5/нуклеосомы, равному 0,85. Прерывистые линии (В, Г) — разложения частотных распределений на сумму Гауссовых полос. Цифрами указаны максимумы этих полос и доля нуклеосом (в скобках), соответствующих каждой полосе. Д, Е — Зависимость от времени содержания нуклеосом в каждой из Гауссовых полос, на которые разложены измеренные частотные распределения, для образцов свободных нуклеосом (Д) и их комплексов с H1.5 (Е). Ж — модели конформаций линкеров в двух состояниях (1, 2) свободных нуклеосом и в комплексе с H1.5 (3). Звездочками обозначены положения на линкерах меток Cy3 и Cy5.

шению доли нуклеосом с $E = 0,73$ и возрастанию содержания нуклеосом с $E = 0,06$ и $E = 0,37$ (рисунок, Е). Наши исследования показали, что образование комплексов нуклеосом с H1.5 происходит в наномолярном диапазоне концентраций и скорость этого процесса существенно выше, чем ско-

рость диссоциации. Большая величина параметра E указывает на то, что в комплексах с H1.5 происходит значительное сближение линкеров (состояние 3 на рисунке, Ж), а нормальное распределение E свидетельствует, что комплексы единообразны по конформации линкеров в области положения меток.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные нами нуклеосомы с метками в области линкеров являются высокочувствительными флуоресцентными сенсорами для анализа структурных перестроек линкерных участков. Меченые нуклеосомы и метод микроскопии одиночных комплексов являются новым удобным инструментом для изучения влияния на структуру нуклеосомы различных архитектурных белков хро-

матина, а также особенностей процесса сборки хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00031). Авторы благодарят проф. С. Димитрова за предоставление штамма-продуцента гистона H1.5 и Г. Армеева за полезные обсуждения данных моделирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shrestha D., Jenei A., Nagy P., Vereb G., Szöllösi J. Understanding FRET as a research tool for cellular studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. N 4. P. 6718–6756.
2. Sustarsic M.K. Taking the ruler to the jungle: single-molecule FRET for understanding biomolecular structure and dynamics in live cells // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 18. P. 52–59.
3. Arai Y.N. Extensive use of FRET in biological imaging // *Microscopy (Oxf)*. 2013. Vol. 62. P. 419–428.
4. Sugawa M.A., Iwane A.H., Ishii Y., Yanagida T. Single molecule FRET for the study on structural dynamics of biomolecules // *Biosystems*. 2007. Vol. 88. N 3. P. 243–250.
5. Lee W., Obubuafo A., Lee Y.I., Davis L.M., Soper S.A. Single-pair fluorescence resonance energy transfer (spFRET) for the high sensitivity analysis of low-abundance proteins using aptamers as molecular recognition elements // *J. Fluoresc.* 2010. Vol. 20. N 1. P. 203–213.
6. Gansen A., Tóth K., Schwarz N., Langowski J. Structural variability of nucleosomes detected by single-pair Förster resonance energy transfer: histone acetylation, sequence variation, and salt effects // *J. Phys. Chem. B*. 2009. Vol. 113. N 9. P. 2604–2613.
7. Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Efremenko A.V., Solonin A.S., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Preparation of mononucleosomal templates for analysis of transcription with RNA polymerase using spFRET // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1288. P. 395–412.
8. Ngo T.T., Ha T. Nucleosomes undergo slow spontaneous gaping // *Nucleic Acids Res.* 2015. Vol. 43. N 8. P. 3964–3971.
9. Feofanov A.V., Kudryashova K.S., Chertkov O.V., Nikitin D.V., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Analysis of nucleosome transcription using single-particle FRET // *Springer Proc. Phys.* 2015. Vol. 164. P. 255–260.
10. Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell*. 2015. Vol. 160. N 6. P. 1135–1144.
11. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valieva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Development of fluorescently labeled mononucleosomes for the investigation of transcription mechanisms by single complex microscopy // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 4. P. 189–193.
12. Luo Y., North J.A., Poirier M.G. Single molecule fluorescence methodologies for investigating transcription factor binding kinetics to nucleosomes and DNA // *Methods*. 2014. Vol. 70. N 2–3. P. 108–118.
13. Simon M.N., Shimko J.C., Forties R.A., Ferdinand M.B., Manohar M., Zhang M., Fishel R., Ottesen J.J., Poirier M.G. Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. N 31. P. 12711–12716.
14. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.
15. Meyer S. B., Syed S.H., Goutte-Gattat D., Shukla M.S., Hayes J.J., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S., Everaers R. From crystal and NMR structures, footprints and cryo-electron-micrographs to large and soft structures: nanoscale modeling of the nucleosomal stem // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. P. 9139–9154.
16. Zhou B.R., Feng H., Kato H., Dai L., Yang Y., Zhou Y., Bai Y. Structural insights into the histone H1-nucleosome complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. N 48. P. 19390–19395.
17. 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.
18. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1-nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.
19. Meyer S., Becker N.B., Syed S.H., Goutte-Gattat D., Shukla M.S., Hayes J.J., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S., Everaers R. From crystal and NMR structures, footprints and cryo-electron-micrographs to large and soft structures: nanoscale modeling of the nucleosomal stem // *Nucleic Acids Res.* 2011. Vol. 39. N 21. P. 9139–9154.
20. Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R.M., Zhu P., Li G. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units // *Science*. 2014. Vol. 344. N 6182. P. 376–380.
21. Fan L., Roberts V.A. Complex of linker histone H5 with the nucleosome and its implications for chromatin packing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. N 22. P. 8384–8289.
22. Cui F., Zhurkin V.B. Distinctive sequence patterns in metazoan and yeast nucleosomes: implications for linker histone binding to AT-rich and methylated DNA // *Nucleic Acids Res.* 2009. Vol. 37. N 9. P. 2818–2829.
23. Zhou B.R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S., Bai Y. Structural mechanisms of nucleosome recognition by linker histones // *Mol. Cell*. 2015. Vol. 59. N 4. P. 628–638.
24. Bernier M., Luo Y., Nwokelo K.C., Goodwin M., Dreher S.J., Zhang P., Parthun M.R., Fondutse-Mittendorf Y., Ottesen J.J., Poirier M.G. Linker histone H1 and H3K56 acetylation are antagonistic regulators of nucleosome dynamics // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6. P. 10152.

CHANGE IN CONFORMATION OF LINKER DNA UPON BINDING OF HISTONE H1.5 TO NUCLEOSOME: FLUORESCENT MICROSCOPY OF SINGLE COMPLEXES

A.V. Lyubitelev¹, K.S. Kudryashova^{1,2}, M.S. Mikhaylova¹, N.V. Malyuchenko¹, O.V. Chertkov^{1,2}, V.M. Studitsky^{1,3,}, A.V. Feofanov^{1,2}, M.P. Kirpichnikov^{1,2}*

¹ *Bioengineering Department, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, 117997, Moscow, Russia;*

³ *Cancer Epigenetics Program Team, Fox Chase Cancer Center; Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

* *e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

The method of synthesis of fluorescently labeled DNA allowing assembly of mononucleosomes with 40 bp linkers was developed. Cy3 and Cy5 labels were introduced in the linkers at distances of 10 bp before the first and 15 bp after the last nucleotide of the nucleosome positioning DNA sequence, respectively. In the absence of histone H1.5 fluorescence microscopy of single complexes revealed the presence of two equally probable states of nucleosomes, differing in the conformation of linkers: open one with the energy transfer efficiency E between the labels being equal to 0.06 and closed one with $E = 0.37$. Binding of histone H1.5 with nucleosomes occurs in nanomolar range of concentrations, and the rate of complex formation is significantly higher than the dissociation rate. In the complexes, significant convergence of DNA linkers ($E = 0.73$) takes place, and their conformation in the region of labels becomes more uniform. Designed nucleosomal constructs are highly sensitive fluorescent sensors for the analysis of structural rearrangements of linkers and in combination with microscopy of single complexes allow studying the structure of complexes of nucleosomes with different chromatin architectural proteins.

Keywords: *chromatin, nucleosome, linker histone H1, fluorescence, microscopy, single molecule.*

Сведения об авторах:

Любителиев Александр Викторович — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: varanus-salvator@yandex.ru

Малюченко Наталья Валериевна — канд. биол. наук, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: mal_nat@mail.ru

Михайлова Мария Сергеевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: mashkuna@yandex.ru

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

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

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ; руководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США). Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Кирпичников Михаил Петрович — академик РАН, проф., докт. биол. наук, декан, зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ, заведующий отделом биоинженерии ИБХ РАН. Тел.: 8-495-939-27-76; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

Правила для авторов

Журнал “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, содержат информацию, касающуюся последних важнейших открытий в области биологии. Разделы журнала соответствуют основным направлениям современных биологических исследований — биохимия, молекулярная биология, вирусология, биофизика, биоинженерия, физиология, ботаника, зоология, эволюционная биология, генетика, микробиология, биология развития, геронтология, экология и др. Издание печатает экспериментальные и методические работы, проблемно-аналитические обзоры и краткие сообщения.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией “Allerton Press, Inc.” на английском языке под названием “Moscow University Biological Sciences Bulletin”. Оба издания полностью синхронны и выходят четыре раза в год. Желая опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте МАИК “Наука/Интерпериодика” (<http://www.maik.ru/ru/authors/agreement/>). Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей и сокращать статьи. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (*.doc), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полуторный, отступ — 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (от 5 до 10, курсивом).

Подробности оформления рукописи можно посмотреть в статье-образце, выложенной на сайте журнала.

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово “введение” не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как “результаты и обсуждение”), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки

в конце (полужирным шрифтом), слова “список литературы” набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

После списка литературы идет строка “Поступила в редакцию....”, где ответственный секретарь редколлегии указывает дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в “шапке” статьи).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

Иванов Иван Иванович — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи. Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово “рисунок” (“таблица”) при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово “рис” и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Если в диаграмме авторами использовалась цветная заливка, то ее следует заменить контрастной штриховкой.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, “...что соответствует выводам Смита [19]”.

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия. Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (инициалы после фамилии). Название тезисов // Название сборника тезисов (как на обложке сборника). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (*Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.*). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — NY и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

Примеры оформления источников в списке литературы:

Статья в журнале:

Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. exper. биол. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

Книга:

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.

Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

Статья в сборнике:

Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinnowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

Тезисы докладов (материалы) конференции:

Болеева Г.С., Борzych А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов–2012”, секция “Биология” (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

Автореферат диссертации:

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

Электронный ресурс:

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

Электронная публикация:

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

Особенности оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO₂ и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3*, его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ...два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocephalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через две недели, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Обе корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу vestnik@mail.bio.msu.ru. Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.

Ответственный секретарь редколлегии — Моргунова Галина Васильевна (тел.: 8-495-938-27-01; 8-495-939-28-33; моб.: 8-985-274-46-49).

Редакция располагается на биологическом факультете МГУ, “светелка” над зоной “А”, комн. 702, прием авторов — вторник и четверг с 11 до 14 часов.

Дополнительную информацию и статью-образец можно найти на сайтах журнала:

<http://www.bio.msu.ru/doc/index.php?ID=324>

<http://vestnik-bio-msu.elpub.ru>.