

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 73 • № 2 • 2018 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Генетика

Лавренов А.Р., Нефедова Л.Н., Ким А.И. Исследование взаимодействия белков семейства HP1 с нетранслируемыми регуляторными областями ретротранспозонов группы *gypsy* у *Drosophila melanogaster* 63

Геронтология

Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. О выборе контрольных объектов в экспериментально-геронтологических исследованиях 72

Гидробиология

Михеев М.А., Ипатова В.И., Спиркина Н.Е. Биотические взаимоотношения двух видов микроводорослей в смешанной культуре 78

Методы

Юрьева Н.О., Воронков А.С., Терешонок Д.В., Осипова Е.С., Платонова Е.В., Беляев Д.В. Экспресс-метод скрининга трансгенных растений картофеля по интенсивности флуоресценции репортерного белка GFP 85

Микология и альгология

Неплюхина А.А., Чудаев Д.А., Крылович О.А., Гололобова М.А. Диатомовые водоросли из торфяного отложения острова Шемя (Алеутские острова, США) 93

Молекулярная биология

Горковец Т.К., Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Совместное влияние аминокислотной последовательности гистона H1 и нуклеотидной последовательности ДНК на структуру хроматосомы: анализ методами молекулярного моделирования 99

Герасимов Е.С., Герасимова Н.С., Козлова А.Л., Студитский В.М. Дрожжевой белок Nhr6A связывается с короткими GC-богатыми генами 106

Физиология

Григорян Р.К., Крысанова Е.Ю., Кирьянов Д.А., Каплан А.Я. Зрительные стимулы для интерфейса мозг-компьютер на основе зрительных вызванных потенциалов: цвет, форма, подвижность 111

CONTENTS

Genetics

- Lavrenov A.R., Nefedova L.N., Kim A.I.* The study of interaction of the HP1 family proteins with the untranslated regulatory regions of the *gypsy* retrotransposons of *Drosophila melanogaster*. 63

Gerontology

- Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V.* On the choice of control objects in experimental gerontological research 72

Hydrobiology

- Mikheev M.A., Ipatova V.I., Spirkina N.E.* Biotic interactions between two species of microalgae in the mixed culture. 78

Methods

- Yuorieva N.O., Voronkov A.S., Tereshonok D.V., Osipova E.S., Platonova E.V., Belyaev D.V.* An assay for express screening of potato transformants by GFP fluorescence 85

Mycology and Algology

- Neplyukhina A.A., Chudaev D.A., Krylovich O.A., Gololobova M.A.* Diatoms of the peat-bog sediments from Shemya Island (Aleutian Islads, USA) 93

Molecular Biology

- Gorkovets T.K., Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* Joint effect of histon H1 amino acid sequence and DNA nucleotide sequence on the structure of chromatosomes: analysis by molecular modeling methods 99
- Gerasimov E.S., Gerasimova N.S., Kozlova A.L., Studitsky V.M.* Yeast protein Nhp6A binds with short GC-rich genes 106

Physiology

- Grigoryan R.K., Krysanova E.U., Kirjanov D.A., Kaplan A.Ya.* Visual stimuli for P300-based brain-computer interfaces: color, shape, mobility 111

ГЕНЕТИКА

УДК 577.218

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА HP1
С НЕТРАНСЛИРУЕМЫМИ РЕГУЛЯТОРНЫМИ ОБЛАСТЯМИ
РЕТРОТРАНСПОЗОНОВ ГРУППЫ *GYPSY* У *DROSOPHILA MELANOGASTER*****А.Р. Лавренов, Л.Н. Нефедова, А.И. Ким****Кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: aikim57@mail.ru*

В работе исследовано *in vitro* взаимодействие рекомбинантных белков-паралогов семейства HP1 (HP1a, HP1b и HP1c) с 5'-нетранслируемыми регуляторными областями ретротранспозонов группы *gypsy* у *Drosophila melanogaster*: *gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* и *17.6*. С использованием конкурентной ДНК подобраны условия, позволяющие добиться специфичного связывания с матрицей. Показано, что белки семейства HP1 эффективно связываются с 5'-нетранслируемой областью ретротранспозонов, имеющих в ее составе тандемные повторы. Обнаружено, что повторы абсолютно необходимы для связывания белка HP1a с 5'-нетранслируемой областью мобильных генетических элементов *Tirant* и *ZAM*. Отсутствие повторов в случае элемента *ZAM* или их число менее двух — в случае *Tirant* делает невозможным такое взаимодействие. Таким образом, наличие тандемных повторов в 5'-нетранслируемой области ретротранспозонов группы *gypsy* является важным инструментом регуляции их транспозиции гетерохроматиновыми белками.

Ключевые слова: гетерохроматиновые белки, дрозофила, *gypsy*, мобильные элементы, ретротранспозоны, нетранслируемые участки

Гетерохроматиновый белок HP1 (Heterochromatin Protein 1), кодируемый геном *Su(var)2-5*, принимает активное участие в формировании гетерохроматина и ассоциированном подавлении активности генов и мобильных генетических элементов (МГЭ). В геномах большинства эукариотических организмов имеется, по меньшей мере, один паралог гена *Su(var)2-5*, в то время как в геноме *Drosophila melanogaster* обнаружено пять паралогов гена *hpl*: *hpl1a* (*Su(var)2-5*), *hpl1b*, *hpl1c*, *hpl1d* (*rhino*), *hpl1e* [1]. Белки, кодируемые этими генами, имеют высококонсервативную сходную структуру, содержащую два ключевых домена: N-терминальный хромодомен (*chromo*), участвующий в связывании HP1 с N-концевым доменом гистона H3K9, и C-терминальный домен (*chromoshadow*), отвечающий за гомо- и гетеромеризацию HP1 [2].

Анализ экспрессии паралогов *hpl* у *D. melanogaster* выявил, что *hpl1a*, *hpl1b* и *hpl1c* экспрессируются во всех тканях взрослой мухи, а *hpl1d* и *hpl1e* — только в герминальных тканях самок и самцов соответственно [3]. Исследование хромосомной локализации белков семейства HP1 у дрозофилы показало, что паралоги HP1 имеют различное положение в хроматине: белок HP1a ассоциирован с гетерохроматином, белок HP1c обнаруживается исключительно в районах транскрипционно активного хроматина, а HP1b встречается как в гетеротак и в эухроматине [4, 5]. Белок HP1d локализован в гетерохроматине, в областях, содержащих кластеры

малых РНК. Он является важным компонентом процессинга рiРНК [1, 6]. Белок HP1e изучен мало. Известно, что он экспрессируется в герминальных тканях самцов. Предполагается, что каждый из паралогов выполняет специфичную функцию, а не дублирует уже имеющуюся. В то время как HP1a и HP1b подавляют транскрипцию генов, HP1c вызывает прямо противоположный эффект, активируя транскрипцию [4, 5]. Показано, что выключение гена *Su(var)2-5* (HP1a) является летальным [7], а инактивация гена *rhino* (HP1d) приводит к стерильности у самок [8].

Считается, что белок HP1 способен напрямую связываться с двух- и одноцепочечными молекулами ДНК, но точно установить участки взаимодействия пока не удалось. В некоторых работах утверждается, что белки HP1 связываются в основном с промоторной областью генов [9]. Отмечается, что при пониженном содержании белка HP1a у мутантов линии *D. melanogaster Su(var)2-5⁰⁵* наблюдается снижение уровней метилирования H3K27me3 в областях промоторов ряда генов, в то же время не наблюдается изменений в 3'-нетранслируемых областях тех же генов [10].

Белки семейства HP1 принимают участие не только в регуляции активности генов, но и в сайленсинге МГЭ. Подавление экспрессии МГЭ у *D. melanogaster* может осуществляться путем непосредственной компактизации участков хромосом, содержащих МГЭ, или путем РНК-интерференции.

Известно, что эти два пути тесно связаны между собой: РНК-интерференция играет важную роль в формировании гетерохроматина и, по-видимому, направляет его формирование [11]. Методом DamID было показано, что у *D. melanogaster* белки HP1 взаимодействуют с ДКП-ретротранспозонами, т.е. ретротранспозонами, содержащими длинные концевые повторы (ДКП), — 17.6, *Springer*, *McClintock* и др. [12], однако экспериментов, доказывающих непосредственное взаимодействие, довольно мало. В другой работе показали взаимодействие HP1a с ретротранспозонами, не имеющими ДКП, — *HeT-A* и *TART* [13]. Обнаружено, что HP1a ассоциирован с РНК, транскрибируемой с повторяющихся последовательностей ДКП *gypsy*, ДКП *copia* и других ДКП-ретротранспозонов [6]. Продemonстрировано прямое взаимодействие белка HP1a с 5'-нетранслируемой областью (5'-UTR, 5' untranslated region) ДКП-ретротранспозона *ZAM* в эксперименте *in vitro* [14]. Предполагается, что взаимодействие осуществляется благодаря имеющимся в повторах ретротранспозона инициаторным АТ-богатым участкам. Хромодомен HP1a напрямую узнает эти участки, образуя ДНК-белковый комплекс, от которого в обоих направлениях распространяются HP1a-ДНК-филаменты.

Показано, что ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* с тремя открытыми рамками считывания (эрантивирсы) обладают специфичностью интеграции в определенные последовательности ДНК. Группа *gypsy* подразделяется на три подгруппы в зависимости от специфичности интеграции: *ZAM*, *Idefix* и *gypsy* [15]. Кроме того, некоторые ДКП-ретротранспозоны ассоциированы с гетерохроматином. В частности, инсерции ретротранспозона *ZAM* у *D. melanogaster* обнаруживаются преимущественно в районах гетерохроматина [16].

Известно, что 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов содержат tandemные повторы разного нуклеотидного состава, роль которых в регуляции активности этих МГЭ слабо изучена. Целью данной работы стало исследование роли tandemных повторов в 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов подгрупп *ZAM*, *Idefix* и *gypsy* группы *gypsy* *D. melanogaster* во взаимодействии с ключевыми белками семейства HP1 — HP1a, HP1b и HP1c.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных белков HP1a, HP1b и HP1c. Для амплификации полноразмерных копий генов семейства *hp1* использовали пары праймеров: HP1a (5'-TATATACATATGATGGGCAAGA AAA-3' и 5'-TTAATTCTCGAGATCTTCATTATCA-3'), HP1b (5'-TATATACATATGGCCGAATTCTCAG-3' и 5'-TTAATTCTCGAGGTCATCCGCATCC-3'), HP1c (5'-TATATACATATGGTTAAAAACGAGC-3' и 5'-TTAATTCTCGAGTTGATTTTCCGCC-3'). Клонирование генов проводили в плазмиде для экспрессии и очистки белков pET30 (Novagen, Германия)

по сайтам рестрикции *NdeI* и *NotI*. Рестрикцию проводили с применением рестриктаз *NdeI* и *NotI* фирмы (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколам производителя. Для лигирования с вектором использовали ДНК-лигазу фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы.

Для получения рекомбинантных белков штамм *Escherichia coli* BL21 трансформировали рекомбинантными плазмидами pET30::hp1a, pET30::hp1b и pET30::hp1c, содержащими полноразмерные копии генов *hp1a*, *hp1b* и *hp1c* соответственно. Выделение и очистка белков проводилась по методике, описанной нашей лабораторией ранее в статье Кузьмина и др. [17].

Диализ растворов белков проводили в диализных трубках SERVAPOR (Serva, Германия). 1 мл раствора белка в буфере для элюции с колонки HisTrap FF диализовали против 200 мл раствора (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7,4) при 4°C в трех сменах буфера: по 3 ч в двух первых сменах и ночь в последней смене. Выпавший осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин на охлаждаемой центрифуге 5415R (Eppendorf, Германия) при 12000 g, супернатант собирали и использовали в дальнейшей работе.

Измерение концентрации белка проводили с помощью набора реактивов "Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination" (Sigma, США) по протоколу фирмы.

Фрагменты ДНК ретротранспозонов получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Матрицей для ПЦР служила хромосомная ДНК, выделенная из особей *D. melanogaster* лабораторной линии SS из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Для амплификации использованы пары праймеров, подобранные в программе UGENE (ugene.net) к области, охватывающей ДКП и нетранслируемую область МГЭ: *Springer* (5'-TTAACTAAGTTAACCG-3' и 5'-ATGACTCGCTCATGG-3'); 17.6 (5'-GTTCTTGAGCCATTT-3' и 5'-TGACATATTCACAT-3'); *gypsy* (5'-AACAATAACAATG-3' и 5'-CCCAACTCATTGGTT-3'); *Rover* (5'-TAACATAATATGCT-3' и 5'-GACCATATTTGAGT-3'); *ZAM* (5'-TTACCGACCCATC-3' и 5'-GATCGTGTAACCT-3'); *Tirant* (5'-CGGACACTCAACC-3' и 5'-AATTCATTTGAGGTACTTA-3' — для полноразмерного фрагмента регуляторной области); (5'-GTCGACTGAAAGTGACTAGGA-3' и 5'-CGGTACAGTACGTGGTGTATT-3' — для амплификации участков, содержащих разное количество tandemных повторов (6 полиморфных вариантов)). Для поиска tandemных повторов использовали компьютерную программу Tandem Repeats Finder (tandem.bu.edu). Для амплификации конкурентной ДНК использовали праймеры CG4680

(5'-GAACTTCGATGGCAGTGATC-3' и 5'-GGTTGCCAATGCTCTTGAAC-3'; 5'-ATGGATCCCGAGTTCGTG-3' и 5'-СТАСТТСТТССАAGCACTAGC-3').

ПЦР проводили с использованием Taq-полимеразы (Евроген, Россия) (2,5 ед/мкл), концентрация MgCl₂ – 2,5 мМ, каждого праймера – 0,4 мкМ. ПЦР проводили в амплификаторе ТП4-ПЦР-01 “Терцик” (ДНК-Технология, Россия). Схема этапов ПЦР: предварительный этап плавления ДНК – 2 мин при 95°C; 30 циклов – плавление 30 сек при 95°C, отжиг праймеров 1 мин при 55–60°C (в зависимости от температуры плавления праймеров) и синтез 1–2 мин (в зависимости от длины фрагмента) при 72°C; заключительная инкубация 10 мин при 72°C.

Фрагменты ДНК, которые планировали использовать для связывания, выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия), в соответствии с протоколом, приложенным к набору.

Связывание белков HP1 с 5'-UTR ретротранспозонов методом гель-шифт. Связывание белка с ДНК проводили в пробирке объемом 0,5 мл в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, 0,5 М KCl pH 7,4 в течение 30–60 мин при 0°C. Очищенные фрагменты (100 нг) смешивали с 8 мкг белка. В некоторых экспериментах, проведенных на нетранслируемой области элементов ZAM и Tirant, использовали концентрацию белка 0,125 мкг/мкл. В смеси присутствовала конкурентная проба ДНК – ампликат гена CG4680. Связывание анализировали в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ). Оценка эффективности связывания проводилась визуально, после окрашивания ПААГ в растворе бромистого этидия. Об образовании ДНК-белковых комплексов можно было судить по снижению количества целевых фрагментов и появлению ДНК-белковых комплексов, обладающих низкой электрофоретической подвижностью в геле.

В качестве контроля использовался бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США). Белок добавлялся в реакционную смесь вместо HP1 до конечной концентрации 0,5 мкг/мкл.

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что у *D. melanogaster* ретровирусы (эрантивирусы) с тремя открытыми рамками считывания (ОРС) и производные от них ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* с двумя ОРС проявляют специфичность в отношении выбора ДНК-мишени [15], в связи с чем ДКП-ретротранспозоны группы *gypsy* можно разделить на три подгруппы: *gypsy*, *ZAM* и *Idefix*. ДКП-ретротранспозоны подгруппы *Idefix* встраиваются в ТА-повторы (от 3 до 20 динуклеотидов), ДКП-ретротранспозоны подгруппы *gypsy* – преимущественно встраиваются в последовательность 5'-АТАТАТ-3', а ДКП-ретротранспозоны подгруппы *ZAM* предпочитают для встраивания мишень 5'-GCGCGC-3'.

Известно, что инсерции ДКП-ретротранспозонов обнаруживаются преимущественно в гетерохроматине [18]. Мы решили выяснить, различаются ли представители трех подгрупп ретротранспозонов группы *gypsy* по способности связываться с гетерохроматиновыми белками семейства HP1. Проанализировав последовательности ДКП-ретротранспозонов *Springer*, *gypsy*, *Rover*, *17.6*, *Tirant* и *ZAM* в секвенированном геноме *D. melanogaster*, мы обнаружили, что пять из них имеют tandemные повторы в 5'-UTR (таблица). По биоинформатическим данным, у элемента *Springer* в нетранслируемой области tandemные повторы отсутствуют, а элемент *gypsy* содержит наименьшее число повторов среди представленных элементов и наименьшую их протяженность. МГЭ *Tirant* – единственный МГЭ с варьирующим числом повторов (до шести). Примечательно, что и у *ZAM*, и у *Tirant* повторы характеризуются меньшим содержанием нуклеотидов А/Т, чем у других ДКП-ретротранспозонов.

Для исследования взаимодействия 5'-UTR ДКП-ретротранспозонов с гетерохроматиновыми белками нами были выделены и очищены белки HP1a, HP1b и HP1c (рис. 1А). Далее были поставлены эксперименты по связыванию этих белков с ДНК ДКП-ретротранспозонов *in vitro*. В качестве контроля использовали бычий сывороточный аль-

Таблица
Содержание и нуклеотидный состав tandemных повторов в нетранслируемых областях ДКП-ретротранспозонов группы *gypsy*

МГЭ	Длина tandemного повтора	Число повторяющихся модулей в нетранслируемой области	Длина области, занимаемой tandemными повторами (п.н.)	Содержание А/Т в tandemных повторах
<i>Springer</i>	–	0	–	–
<i>gypsy</i>	109	2	229	73,36%
<i>Rover</i>	151	3	462	76,84%
<i>17.6</i>	6	39	251	96,85%
<i>Tirant</i>	102	1–6	102–610	54,10%
<i>ZAM</i>	307	2,3	699	65,76%

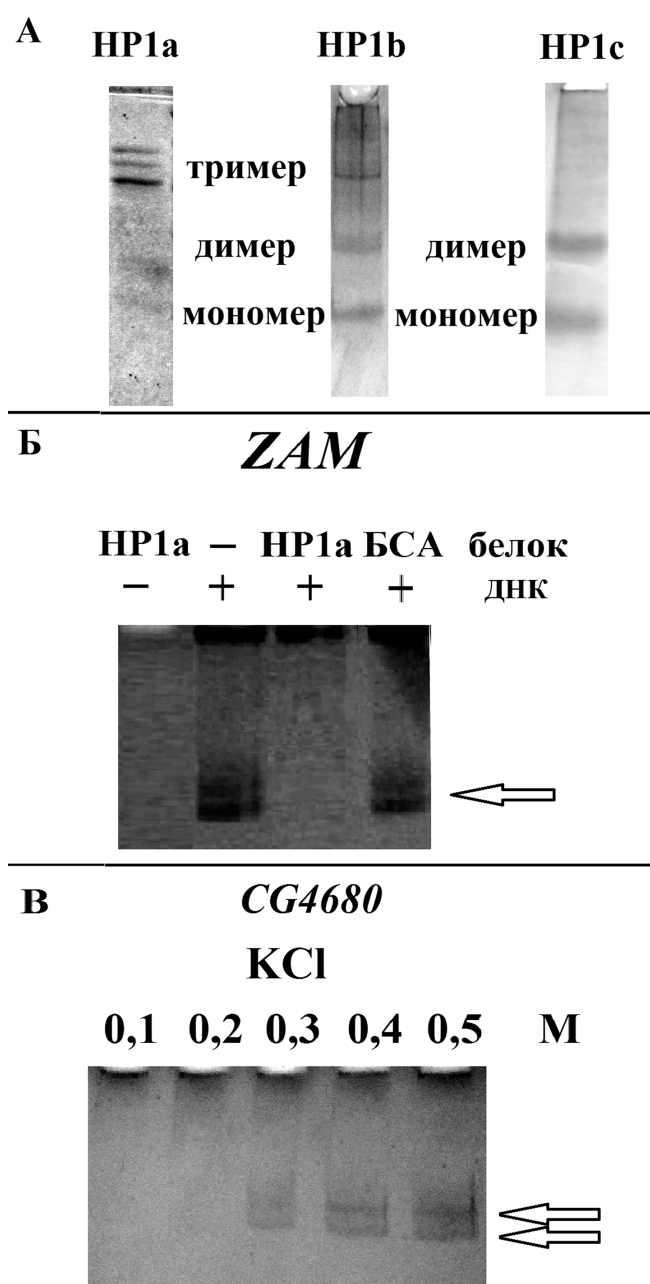


Рис. 1. А — электрофореграмма белков HP1a, HP1b и HP1c. Белок HP1a представлен в виде тримера и димера, HP1b — в трех вариантах макромолекулярных комплексов (моно-, ди- и тример); HP1c представлен в виде мономера и димера. Б — контрольная электрофореграмма. Связывание белка HP1a с ампликатами элемента *ZAM*. Знаком “+” обозначено присутствие в пробе ДНК; “—” — отсутствие. Во всех пробах использовался 0,5 М KCl. В — электрофореграмма эффективности связывания белка HP1a с ампликатами гена *CG4680* (900 и 1100 п.н.) при различной концентрации KCl (от 0,1 до 0,5 М). БСА — бычий сывороточный альбумин

бумин, который добавляли к матрице вместо белка HP1a (рис. 1Б). В качестве матрицы для связывания использовали ампликаты, содержащие 5'-UTR элементов *ZAM*, *Tirant*, *17.6*, *Rover*, *gypsy* и *Springer* (рис. 2). Для исследования взаимодействия использовали метод анализа изменения электрофоретической подвижности ДНК в ПААГ (гель-шифт). Помимо целевых фрагментов в общую смесь

для связывания добавляли конкурирующую ДНК, с которой ДНК-белковые комплексы образовываться не должны. Конкурирующая ДНК выступает контролем, подтверждающим, что исследуемый белок связывается специфически, игнорируя конкурента. В качестве конкурирующей ДНК использовали ампликат гена *D. melanogaster CG4680*, полученный с двух пар праймеров таким образом, чтобы образовывались фрагменты двух близких размеров — 900 и 1100 п.н. (рис. 1В). Этим мы проверяли возможность избирательного связывания белка HP1a с фрагментами разной длины. В ходе проведения экспериментов было обнаружено, что при низкой ионной силе раствора (0,1–0,2 М KCl) белок HP1a эффективно (неспецифично) связывается с конкурирующей ДНК (рис. 1В). Однако при концентрации KCl 0,4–0,5 М связывание конкурирующей ДНК с белком HP1a не происходит. При этом никакой избирательности белка HP1a в отношении длины ДНК мы не обнаружили. В дальнейших экспериментах по связыванию использовали 0,5 М KCl. В работе [19] исследовали стабильность комплексов ДНК-HP1 в различных составах солей. При высоких концентрациях KCl стабильность снижалась. Однако в наших экспериментах высокая концентрация KCl не влияла на стабильность ДНК-белковых комплексов, образованных белком HP1 и регуляторными областями ретротранспозонов, в отличие от ситуации с комплексами, образованными при участии контрольных фрагментов ДНК.

Кроме этого, было исследовано влияние различных концентраций белка HP1a на силу связывания. В результате проведенных экспериментов выявлено, что белок HP1a в концентрации 0,5 мкг/мкл способен связываться с 5'-UTR всех исследуемых МГЭ. Однако предпочтительнее HP1a связывается с нетранслируемыми областями элементов, содержащими тандемные повторы, богатые А/Т-последовательностями (*Tirant*, *ZAM*, *rover* и *17.6*). Хуже всего прошло связывание белка HP1a с 5'-UTR МГЭ *Springer*, не содержащей повторов (рис. 2). На электрофореграмме можно заметить неполное истощение его целевого продукта. Отметим, что используемая нами конкурирующая ДНК не содержит в своем составе повторяющихся последовательностей.

Анализ связывания белков HP1b и HP1c показал, что оба белка способны образовывать ДНК-белковые комплексы с регуляторными областями МГЭ *gypsy*, *Springer*, *Rover* и *17.6* (рис. 2). Однако в случае белка HP1c связывание с фрагментами происходит слабее в сравнении с опытами, проведенными с белками HP1a и HP1b. Примечательно, что только в случае элементов *ZAM* и *Tirant* сила связывания белков HP1a, HP1b и HP1c с матрицей была одинаковой: белок HP1c образовывал ДНК-белковые комплексы с той же эффективностью, что и HP1b и HP1a.

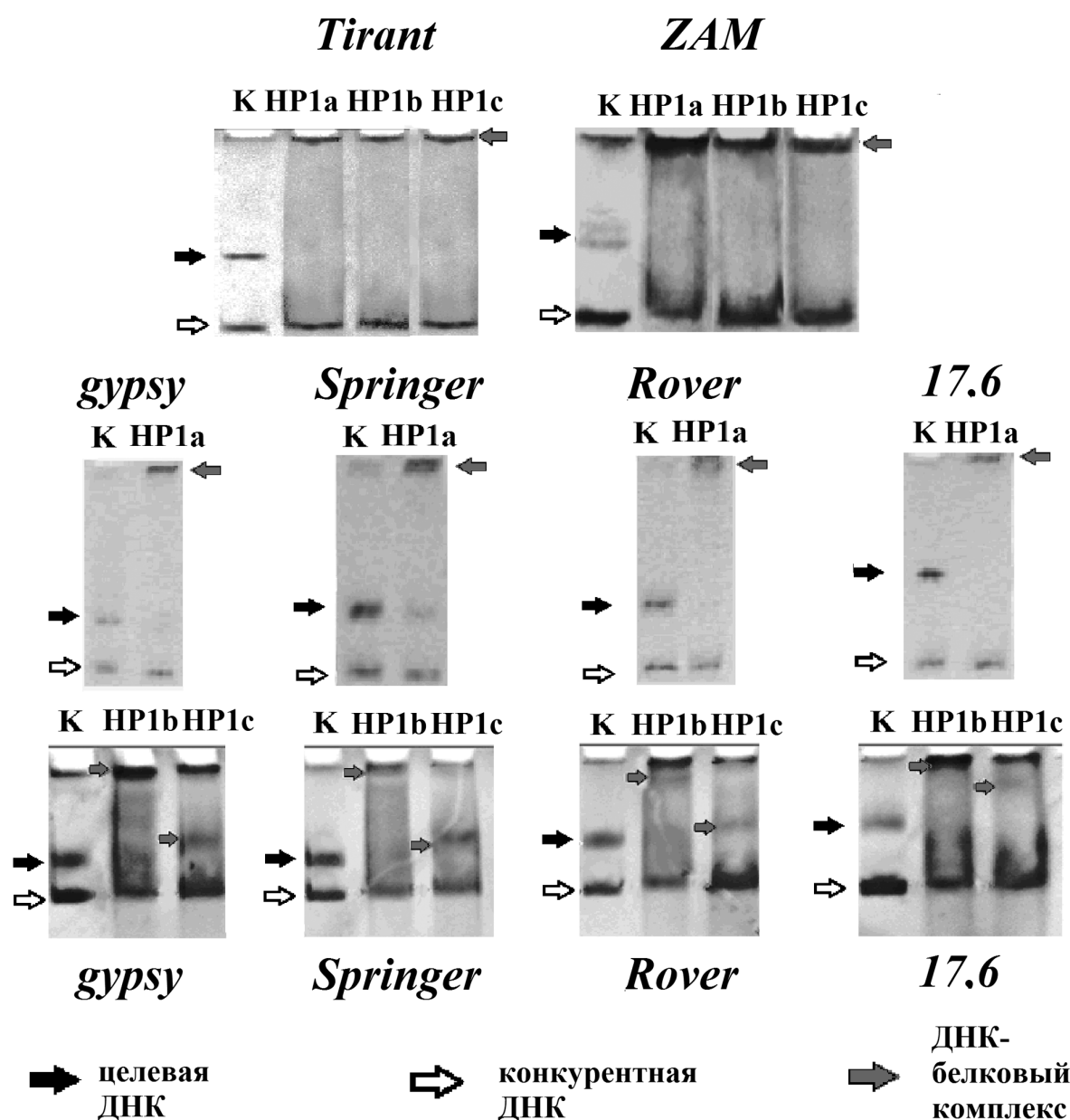


Рис. 2. Анализ гель-шифт связывания белков семейства HP1 с регуляторными участками ДКП-ретротранспозонов группы *gypsy*. Связывание белков HP1a, HP1b и HP1c с регуляторными участками элементов группы *gypsy* (*gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* и *17.6*). Концентрация белка во всех пробах – 0,5 мкг/мкл. Во всех пробах использовался 0,5 М KCl

Таким образом, 5'-UTR всех исследованных элементов, кроме *Springer*, хорошо связываются в белком HP1a, и это, очевидно, обусловлено наличием повторов в 5'-UTR. Два из шести исследованных МГЭ (*ZAM* и *Tirant*) одинаково эффективно связываются как с белком-маркером гетерохроматина (HP1a), так и с белком-маркером эухроматина (HP1c).

Для того чтобы определить концентрацию белка в пробе, достаточную для эффективного связывания с матрицей, мы провели эксперименты по связыванию 5'-UTR *ZAM* (содержит три повторяющихся модуля) и *Springer* (не содержит повторов) с разведениями белка HP1a (рис. 3). Обнаружено, что ПЦР-фрагмент ДНК, содержащий 5'-UTR элемента *ZAM* с тремя повторяющимися модуля-

ми, образует комплексы с HP1a уже при концентрации белка 0,125 мкг/мкл. В то же время полное связывание амплификата 5'-UTR элемента *Springer* обнаруживается только при концентрации белка 0,25 мкг/мкл. Таким образом, мы установили, что элемент *Springer* обладает наименьшим сродством к белкам семейства HP1 среди элементов его группы, поскольку для образования ДНК-белковых комплексов со всеми специфичными молекулами ДНК (амплификаты элемента *Springer*) требуется большее количество белка.

Мы предположили, что в случае с *ZAM* и *Tirant* важную роль при связывании с белками HP1 играет наличие крупных и множественных tandemных повторов в регуляторных областях элементов соответственно. Для подтверждения нашего предпо-

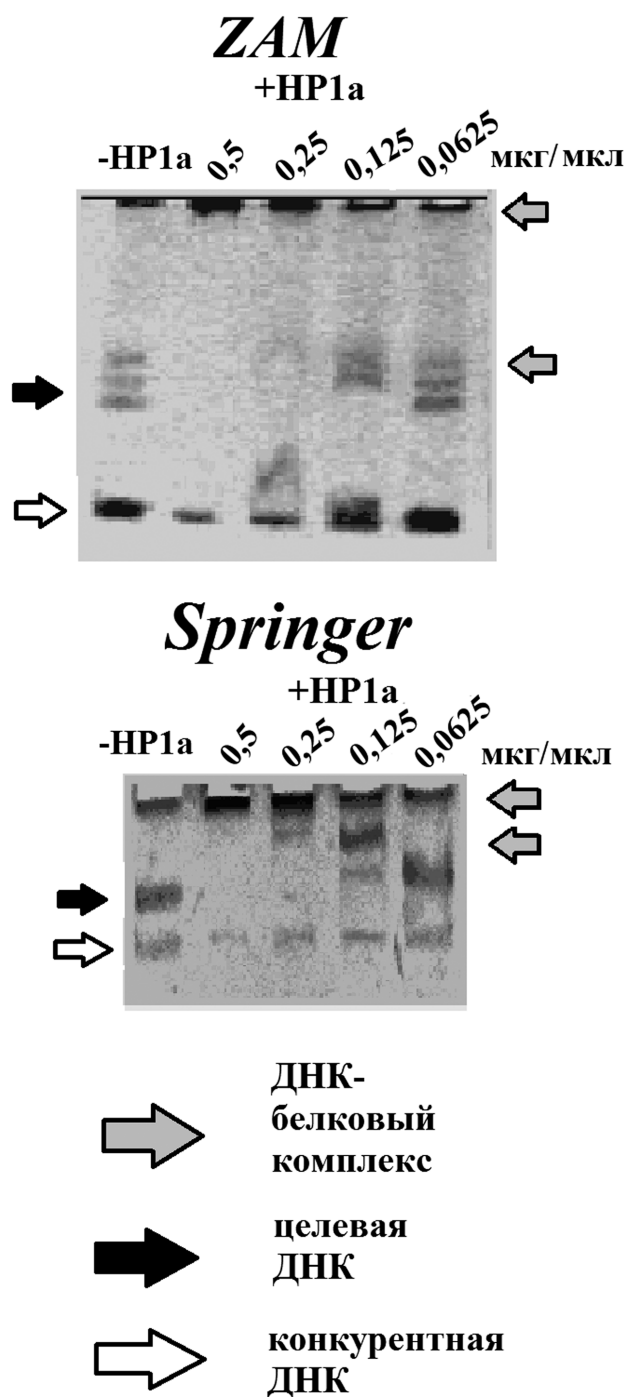


Рис. 3. Связывание белка HP1a в различных разведениях (0,5 мкг/мкл, 0,25 мкг/мкл, 0,125 мкг/мкл и 0,0625 мкг/мкл белка) с элементами *ZAM* и *Springer*. Три ампликата элемента *ZAM* на электрофореграмме представляют собой фрагменты, содержащие разное количество tandemных повторов (от 1 до 3).

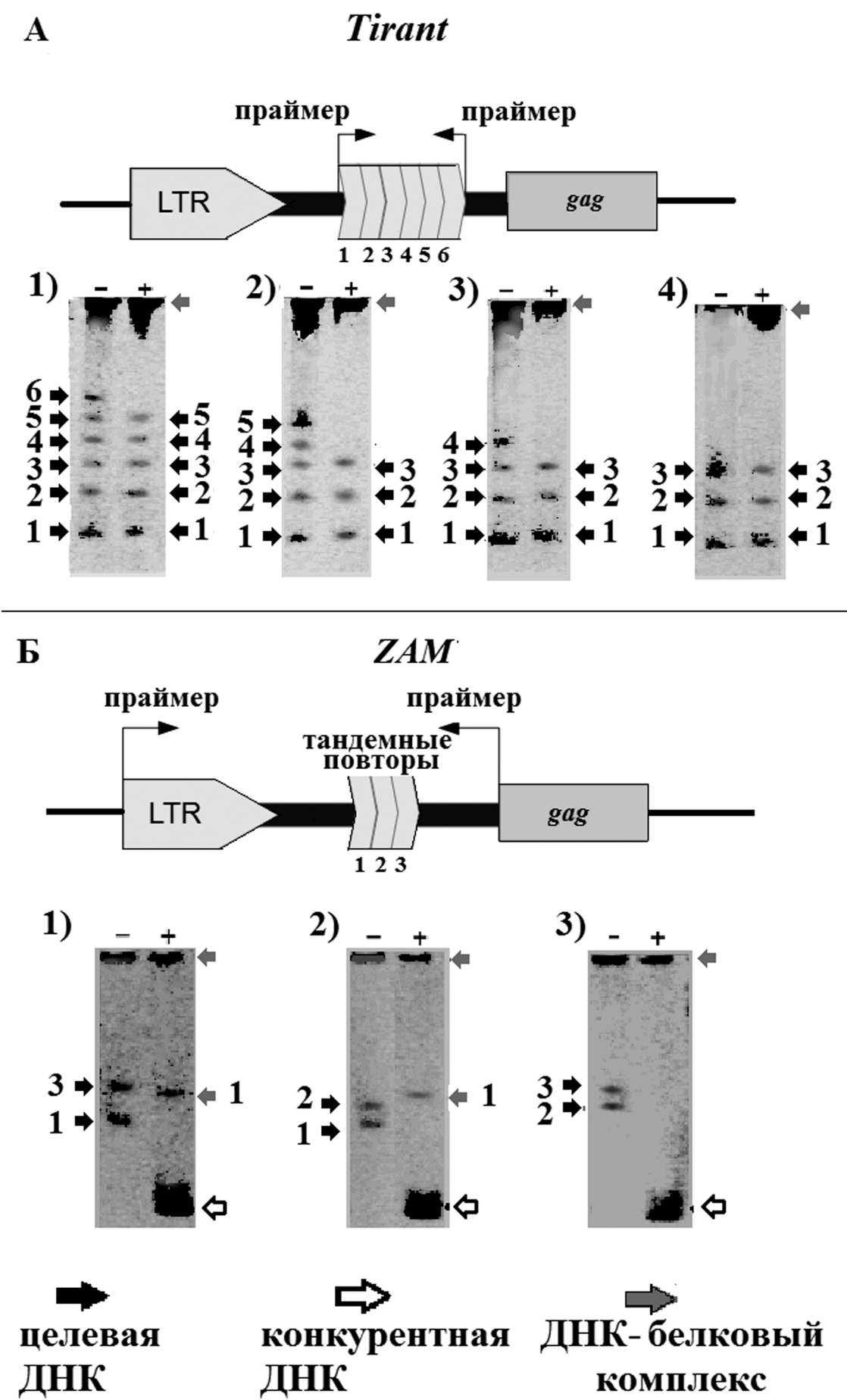
Во всех пробах использовался 0,5 М KCl

ложения мы провели серию экспериментов по связыванию различного числа tandemных повторов 5'-UTR *Tirant* и *ZAM* с белком HP1a.

Ранее было показано, что у *D. melanogaster* лабораторной линии SS из коллекции кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова присутствуют все возможные полиморфные варианты МГЭ *Tirant*, различающиеся количеством повторов в 5'-UTR [20]. С использованием праймеров, локализованных вблизи области tandemных повторов, мы провели амплификацию фрагментов *Tirant*, включающих 5'-UTR, используя в качестве матрицы геномную ДНК дрозофил линии SS. В результате амплификации мы получили набор фрагментов 5'-UTR, содержащих от одного до шести повторяющихся модулей по 102 п.н. Далее мы выделяли и очищали каждый из ПЦР-фрагментов и составляли их смеси. Всего было составлено четыре смеси. Первая смесь содержала все шесть возможных вариантов 5'-UTR (от самого длинного до самого короткого). Каждая последующая смесь отличалась от предыдущей отсутствием самого длинного фрагмента (рис. 4А).

При связывании белка HP1a с набором всех возможных полиморфных вариантов 5'-UTR МГЭ *Tirant* ДНК-белковые комплексы образовывались с ДНК-фрагментами, содержащими шесть tandemно повторяющихся модулей (рис. 4А1). Если мы убирали из общей смеси фрагмент, содержащий шесть повторяющихся модулей, связывание и образование ДНК-белковых комплексов происходило с ампликатами, имеющими четыре и пять повторяющихся модулей, а связывания с оставшимися ампликатами (1–3 повторяющихся модуля) не происходило (рис. 4А2). Похожая картина наблюдалась при удалении из смеси фрагмента с пятью повторяющимися последовательностями: несвязавшимися оставались ампликаты с 1–3 повторами, а связывание происходило с фрагментом, имеющим четыре повторяющихся модуля (рис. 4А3). Наконец, при тех же концентрациях HP1a и отсутствии ампликатов с четырьмя, пятью и шестью повторяющимися модулями связывания с оставшимися ампликатами (1–3 повторяющихся модуля) не происходило (рис. 4А4). Результат эксперимента говорит о том, что трех повторов недостаточно для эффективного связывания с белком HP1. Отметим, что избирательность связывания не зависит от длины фрагмента, это мы доказали с использованием фрагментов конкурирующей ДНК разной длины (рис. 1В).

Рис. 4. Связывание белка HP1a с ампликатами, содержащими различное число tandemных повторов в 5' UTR мобильных генетических элементов *Tirant* и *ZAM*. А1 – шесть ампликатов, содержащих от 1 до 6 tandemных повторов в 5' UTR *Tirant*; А2 – от 1 до 5 повторов в 5' UTR *Tirant*; А3 – от 1 до 4 повторов в 5' UTR *Tirant*; А4 – от 1 до 3 повторов в 5' UTR *Tirant*; Б1 – связывание белка HP1a с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими три повторяющихся модуля и один повторяющийся модуль соответственно, Б2 – с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими два повторяющихся модуля и один повторяющийся модуль соответственно, Б3 – с двумя вариантами ампликатов 5' UTR *ZAM*, содержащими три повторяющихся модуля и два повторяющихся модуля соответственно. Цифры рядом со стрелками соответствуют количеству tandemно повторяющихся модулей в 5' UTR. “+” – присутствие в пробе белка; “–” – отсутствие



Подобная картина наблюдалась и с элементом *ZAM*. Мы составляли разные комбинации амплификатов, содержащих от одного до трех повторяющихся модулей (тандемных повторов) длиной 307 п.н. в нетранслируемой области *ZAM*. Во всех трех экспериментах HP1a связывался полностью с фрагментами, имеющими два и три повторяющихся модуля (рис. 4Б). Амплификат с одним повторяющимся модулем связывался слабее, что наблюдали на электрофореграмме как небольшое смещение ПЦР-продукта (рис. 4Б1, Б2).

Таким образом, повторы абсолютно необходимы для связывания белка HP1a с 5'-UTR МГЭ *Tirant* и *ZAM*. Отсутствие повторов в случае элемента *ZAM* или их число менее двух — в случае *Tirant* делает невозможным такое взаимодействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klattenhoff C., Xi H., Li C., Lee S., Xu J., Khurana J.S., Zhang F., Schultz N., Koppetsch B.S., Nowosielska A., Seitz H., Zamore P.D., Weng Z., Theurkauf W.E. The *Drosophila* HP1 homolog Rhino is required for transposon silencing and piRNA production by dual-strand clusters // *Cell*. 2009. Vol. 138. N 6. P. 1137–1149.
2. Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas, J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain // *Nature*. 2001. Vol. 410. N 6824. P. 120–124.
3. Vermaak D., Henikoff S., Malik H. Positive selection drives the evolution of *rhino*, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila* // *PLoS Genet*. 2005. Vol. 1. N 1. P. 96–108.
4. Abel J., Eskeland R., Raffa G.D., Kremmer E., Imhof A. *Drosophila* HP1c is regulated by an autoregulatory feedback loop through its binding partner Woc // *PLoS One*. 2009. Vol. 4. N 4. e5089.
5. Font-Burgada J., Rossell D., Auer H., Azorin F. *Drosophila* HP1c isoform interacts with the zinc-finger proteins WOC and relative-of-WOC to regulate gene expression // *Gene Dev*. 2008. Vol. 22. N 21. P. 3007–3023.
6. Mohn F., Sienski G., Handler D., Brennecke J. The rhino-deadlock-cutoff complex licenses noncanonical transcription of dual-strand piRNA clusters in *Drosophila* // *Cell*. 2014. Vol. 157. N 6. P. 1364–1379.
7. Eissenberg J., Hartnett T. A heat shock-activated cDNA rescues the recessive lethality of mutations in the heterochromatin-associated protein HP1 of *Drosophila melanogaster* // *Mol. Gen. Genet*. 1993. Vol. 240. N 3. P. 333–338.
8. Volpe A.M., Horowitz H., Grafer C.M., Jackson S.M., Berg C.A. *Drosophila rhino* encodes a female-specific chromo-domain protein that affects chromosome structure and egg polarity // *Genetics*. 2001. Vol. 159. N 3. P. 1117–1134.
9. Cabrera J.R., Olcese U., Horabin J.I. A balancing act: heterochromatin protein 1a and the Polycomb group coordinate their levels to silence chromatin in *Drosophila* // *Epigenet. Chromatin*. 2015. Vol. 8:17.
10. Alekseyenko A.A., Gorchakov A.A., Zee B.M., Fuchs S.M., Kharchenko P.V., Kuroda M.I. Heterochromatin-associated interactions of *Drosophila* HP1a with dADD1, HIPPI, and repetitive RNAs // *Genes Dev*. 2014. Vol. 28. N 13. P. 1445–1460.
11. Lippman Z., Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing // *Nature*. 2004. Vol. 431. N 7006. P. 364–370.
12. Greil F., van der Kraan I., Delrow J., Smothers J.F., de Wit E., Bussemaker H.J., van Driel R., Henikoff S., van Steensel B. Distinct HP1 and Su(var)3-9 complexes bind to sets of developmentally coexpressed genes depending on chromosomal location // *Genes Dev*. 2003. Vol. 17. N 22. P. 2825–2838.
13. Perrini B., Piacentini L., Fanti L., Altieri F., Chichia-relli S., Berloco M., Turano C., Ferraro A., Pimpinelli S. HP1 controls telomere capping, telomere elongation, and telomere silencing by two different mechanisms in *Drosophila* // *Mol. Cell*. 2004. Vol. 15. N 3. P. 467–476.
14. Minervini C.F., Marsano R.M., Casieri P., Fanti L., Caizzi R., Pimpinelli S., Rocchi M., Viggiano L. Heterochromatin protein 1 interacts with 5'UTR of transposable element ZAM in a sequence-specific fashion // *Gene*. 2007. Vol. 393. N 1–2. P. 1–10.
15. Nefedova L.N., Mannanova M.M., Kim A.I. Integration specificity of Itr-retrotransposons and retroviruses in the *Drosophila melanogaster* genome // *Virus Genes*. 2011. Vol. 42. N 2. P. 297–306.
16. Baldrich E., Dimitri P., Desset S., Leblanc P., Codipietro D., Vauray C. Genomic distribution of the retrovirus-like element ZAM in *Drosophila* // *Evolution and impact of transposable elements. Contemporary issues in genetics and evolution*, vol 6 / Ed. P. Capy. Dordrecht: Springer, 1997. P. 131–140.
17. Kuz'min I.V., Shnyriaeva A.A., Nefedova L.N., Kim A.I. Translational analysis of the *Grp* gene, a genomic homologue of the *Gag* gene of the gypsy retrotransposon of *Drosophila melanogaster* // *Russ. J. Genet*. 2011. Vol. 47. N 9. P. 1275–1277.
18. Lippman Z., Gendrel A.V., Black M., Vaughn M.W., Dedhia N., McCombie W.R., Lavine K., Mittal V., May B., Kasschau K.D., Carrington J.C., Doerge R.W., Colot V., Martienssen R. Role of transposable elements in heterochromatin

and epigenetic control // *Nature*. 2004. Vol. 430. N 6998. P. 471–476.

19. Tao Zhao, Heyduk T., Allis C.D., Eissenberg J.C. Heterochromatin protein 1 binds to nucleosomes and DNA *in vitro* // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. N 36. P. 28332–28338.

20. Nefedova L.N., Urusov F.A., Romanova N.I., Shmel'kova A.O., Kim A.I. Study of the transcriptional and

transpositional activities of the *Tirant retrotransposon* in *Drosophila melanogaster* strains mutant for the *flamenco* locus // *Russ. J. Genet.* 2012. Vol. 48. N 11. P. 1089–1096.

Поступила в редакцию
02.02.2018

Принята к печати
19.03.2018

GENETICS

THE STUDY OF INTERACTION OF THE HP1 FAMILY PROTEINS WITH THE UNTRANSLATED REGULATORY REGIONS OF THE *GYPSY* RETROTRANSPOSONS OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

A.R. Lavrenov, L.N. Nefedova, A.I. Kim*

Department of Genetics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: aikim57@mail.ru

We have investigated the *in vitro* interaction of recombinant HP1 family protein paralogs (HP1a, HP1b and HP1c) and the 5' untranslated regulatory regions of *gypsy* retrotransposon group in *Drosophila melanogaster*: *gypsy*, *Springer*, *Tirant*, *ZAM*, *Rover* and *17.6*. With the use of competitive DNA, conditions for specific binding were obtained. It is shown that HP1 family proteins effectively bind to the 5' untranslated region of retrotransposons, which have tandem repeats in their composition. It has been found that repeats are absolutely necessary for binding HP1a protein to the 5' untranslated region of *Tirant* and *ZAM* mobile genetic elements. The absence of repeats in the case of *ZAM* element or their number less than two—in the case of *Tirant* makes such interaction impossible. Thus, the presence of tandem repeats in the 5' untranslated region of retrotransposons of the *gypsy* group is an important tool for regulating their transposition by heterochromatin proteins.

Keywords: heterochromatin proteins, *Drosophila*, *gypsy*, mobile elements, retrotransposons, untranslated regions

Сведения об авторах

Лавренов Антон Русланович — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: overtaki@mail.ru

Нефедова Лидия Николаевна — докт. биол. наук, доц. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Ким Александр Иннокентьевич — докт. биол. наук, проф. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-53; e-mail: aikim57@mail.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 57.017.6+57.033+576.53+57.022

**О ВЫБОРЕ КОНТРОЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ГЕРОНТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ****А.Н. Хохлов*, А.А. Клебанов, Г.В. Моргунова***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*

В последнее время появилось большое количество публикаций, описывающих успешное использование различных биологически активных соединений в качестве геропротекторов. Среди таких препаратов – короткие пептиды, митохондриальные антиоксиданты, антидиабетические бигуаниды, миметики ограничения питания, модуляторы аутофагии и др. Однако, на наш взгляд, в большинстве случаев положительные результаты таких исследований определяются “удачным” выбором контрольных объектов. В качестве таковых часто используются животные с какими-либо аномалиями, так что любое благоприятное воздействие на соответствующие патологические процессы ведет к увеличению продолжительности жизни (впрочем, контрольные животные могут быть нормальными, т.е. дикого типа, но помещенными в некоторые экстремальные условия, бороться с которыми как раз и могут помогать определенные биологически активные соединения). Таким образом, налицо лечение патологий, а не воздействие на фундаментальные процессы старения. Существует точка зрения, согласно которой известные всему миру результаты опытов Клайва Маккея, значительно продлившего жизнь крысам с помощью ограничения калорийности питания, определяются, во-первых, тем, что контрольные животные питались *ad libitum*, т.е. потребляли столько пищи, сколько хотели съесть (что совершенно не свойственно животным в дикой природе), а во-вторых, тем, что использованные в экспериментах крысы Фишер-344 являются короткоживущими. Вышеупомянутые соображения, по-видимому, касаются и геронтологических экспериментов на клеточных культурах. В частности, мы иногда слышим от коллег замечания в адрес используемой в нашей лаборатории модели “стационарного старения” клеточных культур в связи с тем, что большинство экспериментов проводятся на трансформированных, а не на нормальных клетках. Однако такой подход представляется нам вполне оправданным, так как феномен “стационарного”/хронологического старения свойствен самым разным клеткам, среди которых бактерии, дрожжи, цианобактерии, микоплазмы, клетки животных и растений. При этом клетки с неограниченным митотическим потенциалом не изменяются ни от эксперимента к эксперименту, ни в процессе длительного культивирования как с пересевами, так и без пересевов (в рамках модели “стационарного старения”), чего не скажешь о нормальных диплоидных фибробластах, теломеры которых укорачиваются при каждом делении. А от момента посева клеток до входа их в стационарную фазу роста клетки могут поделиться до 10 раз! Мы полагаем, что для поиска эффективных геропротекторов, обеспечивающих воздействие на фундаментальные механизмы старения, необходимо проводить исследования на “максимально здоровых” животных либо на “максимально стабильных” модельных системах.

Ключевые слова: старение, клеточное старение, геропротекторы, контрольные группы, клеточные культуры, экспериментальные животные

На сегодняшний день одним из самых известных способов продления жизни (и, как предполагают, замедления старения) экспериментальных животных является ограничение питания. Идея базируется главным образом на экспериментах Клайва Маккея, проведенных им в начале 30-х годов XX в. Исследуя вместе со своими коллегами крыс линии Фишер-344, Маккей обнаружил, что уменьшение

калорийности потребляемой пищи (за счет снижения количества жиров и углеводов, но не белков) при сохранении полноценности ее состава приводит не только к замедлению роста, но и к значительному увеличению как средней, так и максимальной продолжительности жизни (ПЖ) животных [1]. Сходные эксперименты многократно проводились впоследствии в различных геронтологиче-

ских лабораториях на разных объектах, а также в рамках клинических исследований, однако далеко не всегда результаты были такими же обнадеживающими. В связи с этим надо подчеркнуть, что, ссылаясь на работы Маккея, ученые часто игнорируют три важных обстоятельства:

1) Крысы Фишер-344 являются короткоживущими. Насколько нам известно, их ПЖ не превышает 1192 сут [2]. В дикой природе крысы могут жить четыре года и более [3] (хотя, конечно, вероятность дожить до такого возраста достаточно мала). Таким образом, даже с учетом значительного увеличения в опытах Маккея максимальной ПЖ животных (вплоть до 1421 сут), она не достигала значений этого показателя для крыс дикого типа или некоторых долгоживущих чистых линий (например, Вистар [4]).

2) У крыс Фишер-344 высока частота развития спонтанных опухолей [5], так что ограничение питания могло влиять не столько на сам процесс старения, сколько на канцерогенез. Собственно, это отмечал и сам Маккей в своих последующих публикациях [6].

3) Контрольные животные в экспериментах Маккея питались *ad libitum*, что, по-видимому, не является для них нормой. Иначе говоря, не исключено, что они просто слишком много ели и поэтому старели быстрее, а вот опытные крысы как раз питались “нормально”.

Таким образом, складывается впечатление, что результаты исследований Маккея могли определяться не воздействием на фундаментальные механизмы старения, а лишь “удачным” выбором как контрольных животных, так и условий (не совсем благоприятных) их содержания. К сожалению, в последние десятилетия такой подход стал чрезвычайно популярным среди ученых-геронтологов, занимающихся поиском потенциальных геропротекторов (физических и химических факторов, направленных на замедление старения, которое, согласно классическому определению, представляет собой совокупность изменений организма, приводящих к увеличению вероятности его смерти [7–9]).

В частности, это касается мышей SAM, крыс OXYS и так называемых “шведских” мышей.

Мыши SAM (Senescence Accelerated Mouse) были выведены в 70-х годах XX века группой японских геронтологов под руководством Т. Такеды из мышей линии AKR/J [10]. Линия SAM состоит из нескольких инбредных сублиний, объединенных в две группы – SAMP (“prone” – склонные к ускоренному старению) и SAMR (“resistant” – устойчивые к ускоренному старению). Мыши SAMP характеризуются соответствующей кривой выживания (сниженной средней и максимальной ПЖ), а также целым набором патологических возрастных изменений (несколько различающихся у разных

сублиний), свидетельствующих об их ускоренном/преждевременном старении: старческий амилоидоз, уменьшенные почки, сниженный иммунный ответ, ухудшенный слух, проблемы с легкими, старческий остеопороз, вторичный амилоидоз, проблемы с обучением и памятью, эмоциональные расстройства, атрофия мозга, кожные дефекты, усиленный лордоз [11, 12]. Впрочем, необходимо подчеркнуть, что у мышей SAMR, которые изначально были предложены как контроль для геронтологических исследований на мышах SAMP, тоже наблюдались определенные патологические показатели, отличавшие их от животных с “нормальным” старением: кисты яичников, нетимусные лимфомы, гистиоцитарные саркомы и др. К сожалению, в дальнейшем появилось огромное количество работ, в которых описывалось благотворное/геропротекторное влияние различных соединений лишь на мышей SAMP [13–15], которые как раз и использовались в качестве контрольных животных. Соответственно, такие результаты были вполне ожидаемыми, но, на наш взгляд, не позволяют отнести изученные препараты к геропротекторам.

Сходная ситуация сложилась и с крысами OXYS, выведенными в 70-х годах XX века в Новосибирском Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН из крыс Вистар, которые в дальнейшем предлагалось использовать в качестве контроля к новой линии. Как и у мышей SAM, у крыс OXYS, наряду с уменьшенной ПЖ, наблюдался целый ряд патологических признаков, позволивших отнести их к животным с ускоренным/преждевременным старением, и в первую очередь – “сверхпродукция” свободных радикалов, ретинопатии и целый ряд нейродегенеративных процессов [16]. Последнее обстоятельство, в частности, позволило предложить использовать крыс OXYS, как, впрочем, и мышей SAM [17], для изучения патогенеза болезни Альцгеймера [16, 18]. В большом количестве работ, выполненных под руководством Н.Г. Колосовой, было продемонстрировано положительное влияние на таких крыс самых разных потенциальных геропротекторов, например, рапамицина [19], антиоксиданта SkQ1 [20], метформина [21] и др. Собственно, этого опять-таки следовало ожидать с большой вероятностью.

Митохондриальный антиоксидант SkQ1 действовал как геропротектор и в экспериментах на еще одной модели ускоренного/преждевременного старения – так называемых “шведских” мышах с дефектной митохондриальной ДНК-полимеразой [22]. У этих животных значительно увеличена интенсивность образования свободных радикалов со всеми вытекающими последствиями – нарушение функционирования митохондрий, а затем и многих клеточных функций, что, в свою очередь, ведет к патологическим “старческим” изменениям

органов и тканей, а также к уменьшению ПЖ мышцей. Совсем не очевидно, что антиоксидант таким же образом повлиял бы на нормальных животных. Интересно, что в экспериментах В.Н. Анисимова с соавт. [23] на мышцах нескольких линий было обнаружено, что SkQ1 проявляет свое геропротекторное действие только при содержании животных в не очень благоприятных условиях — в виварии, недостаточно хорошо защищенном от инфекционных агентов. При содержании мышей в другом, полностью защищенном от инфекций, виварии геропротекторный эффект SkQ1 исчезал.

Таким образом, можно полагать, что во всех трех рассмотренных модельных системах геропротекторное действие изучаемых соединений могло определяться лишь тем, что использованные животные не были “практически здоровыми” либо содержались в неблагоприятных условиях. Помимо этого, у них у всех наблюдались проявления окислительного стресса, связанного с усиленным образованием свободных радикалов, а изучаемые потенциальные геропротекторы, как правило, обладали антиоксидантными свойствами. В то же время существует точка зрения, согласно которой антиоксиданты проявляют свое геропротекторное действие как раз тогда, когда в экспериментах используются животные с различными патологиями (например, с высокой частотой спонтанных опухолей) или находящиеся в плохих условиях [24].

По-видимому, имеет смысл при проведении экспериментально-геронтологических исследований потенциальных геропротекторов усилить акцент на оценке ПЖ (причем максимальной/видовой, а не средней, изменение которой может быть никак не связано с влиянием на процесс старения) нормальных высших животных и людей, иначе мы будем относить к этому классу соединений все, что обеспечивает нормальное существование организма, в том числе — воду, пищу, витамины, микроэлементы и т.п. [25].

Хотелось бы также подчеркнуть, что выбор “правильного” контрольного объекта чрезвычайно важен не только в геронтологических экспериментах на животных, но и в цитогеронтологических исследованиях потенциальных геропротекторов на клеточных культурах. В нашей лаборатории мы проводим такое тестирование на модели “стационарного старения”, предполагающей идентичность изменений клеток непересееваемой культуры и стареющего многоклеточного организма [25–27]. При этом “старение” культуры оценивается либо по скорости накопления соответствующих макромолекулярных изменений (главным образом — повреждений ДНК), либо по кинетике вымирания клеток в стационарной фазе роста [28–30]. Эксперименты мы проводим, как правило, на культивируемых трансформированных клетках млекопитающих, пролиферация которых остановлена

только контактным торможением (никакие специальные воздействия не используются, так что ситуация сходна с той, которая возникает при формировании постмитотических тканей взрослого организма). Нам не кажется оправданным подход некоторых исследователей, которые “состаривали” клетки (как нормальные, так и трансформированные) с помощью агентов или условий культивирования, вызывающих повреждения ДНК [31]. Такого рода подходы были заложены еще в 90-х годах XX в. Т. фон Зглиницки с соавт., вызывавшими остановку пролиферации и “старение” нормальных фибробластов человека путем культивирования их в гипероксических (40% кислорода в атмосфере или добавление пероксида водорода в ростовую среду) условиях [32–34]. Модификация таких “возрастных” изменений какими-либо потенциальными геропротекторами опять-таки, на наш взгляд, является просто “лечением больного”, но не воздействием на фундаментальные механизмы старения.

Мы часто слышим от коллег замечания в адрес используемой в нашей лаборатории модели “стационарного старения” клеточных культур в связи с тем, что большинство экспериментов по тестированию геропротекторов проводятся нами на трансформированных, а не на нормальных клетках млекопитающих. Однако такой выбор контрольного объекта представляется нам вполне оправданным по следующим соображениям. Феномен “стационарного”/хронологического старения свойствен самым разным клеткам, среди которых бактерии, дрожжи, цианобактерии, микоплазмы, клетки животных и растений [25, 26, 35]. При этом “репликативный возраст” клеток с неограниченным митотическим потенциалом не изменяется ни от эксперимента к эксперименту, ни в процессе длительного культивирования как с пересевами, так и без пересевов (в рамках модели “стационарного старения”), чего не скажешь о нормальных диплоидных фибробластах, теломеры которых укорачиваются при каждом делении. А от момента посева клеток до входа их в стационарную фазу роста клетки могут поделиться до 10 раз! Таким образом, нормальные клетки, входящие в стадию “плато”, будут иметь гораздо больший “репликативный возраст”, чем клетки в момент посева, так что дальнейшие их изменения могут определяться не только интересующим нас “стационарным старением”. По тем же причинам корректные повторы экспериментов становятся проблематичными (нормальные клетки в массовой культуре непрерывно изменяются со временем). Наконец, часто мы проводим так называемые “поперечные” (cross-sectional) эксперименты, в которых клетки засеваются в культуральные флаконы через определенные (иногда достаточно большие) интервалы времени, а используются для оценки изучаемых показателей в один конкретный момент, когда у

групп флаконов разных “стационарный возраст”. Если работать на нормальных фибробластах, “считающих” пассажи, то обеспечить идентичность всех групп посеянных клеток практически невозможно. В данном случае, как говорится, “нельзя войти в одну реку дважды” [25, 26].

Суммируя вышеизложенное, мы полагаем, что для поиска эффективных геропротекторов, обеспечивающих воздействие на фундаментальные механизмы старения, необходимо проводить исследова-

ния либо на “максимально здоровых” животных, либо на “максимально стабильных” клеточных модельных системах.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № АААА-А16-116021660098-8). Исследования Г.В. Моргуновой поддержаны стипендией Президента РФ (SP-4224.2018.4) и грантом Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-34-00813 мол_а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McCay C.M., Crowell M.F., Maynard L.A. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size // J. Nutr. 1935. Vol. 10. N 1. P. 63–79.
2. Chesky J.A., Rockstein M. Life span characteristics in the male Fischer rat // Exp. Aging Res. 1976. Vol. 2. N 5. P. 399–407.
3. Carey J.R., Judge D.S. Longevity records: life spans of mammals, birds, amphibians, reptiles, and fish. Odense monographs on population aging, 8. Odense: Odense Univ. Press, 2000. 214 pp.
4. Nistiar F., Racz O., Lukacinova A., Hubkova B., Novakova J., Lovasova E., Sedlakova E. Age dependency on some physiological and biochemical parameters of male Wistar rats in controlled environment // J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng. 2012. Vol. 47. N 9. P. 1224–1233.
5. Maronpot R.R., Nyska A., Foreman J.E., Ramot Y. The legacy of the F344 rat as a cancer bioassay model (a retrospective summary of three common F344 rat neoplasms) // Crit. Rev. Toxicol. 2016. Vol. 46. N 8. P. 641–675.
6. McCay C. M., Pope F., Lunsford W. Experimental prolongation of the life span // Bull. N. Y. Acad. Med. 1956. Vol. 32. N 2. P. 91–101.
7. 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.
8. Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N. Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 1. P. 13–16.
9. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Does aging have a purpose? // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 222–224.
10. Takeda T., Hosokawa M., Takeshita S., Irino M., Higuchi K., Matsushita T., Tomita Y., Yasuhira K., Hamamoto H., Shimizu K., Ishii M., Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence // Mech. Ageing Dev. 1981. Vol. 17. N 2. P. 183–194.
11. Takeda T., Hosokawa M., Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence // Exp. Gerontol. 1997. Vol. 32. N 1–2. P. 105–109.
12. Takeda T. Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice // Neurochem. Res. 2009. Vol. 34. N 4. P. 639–659.
13. Yuneva M.O., Bulygina E.R., Gallant S.C., Kramarenko G.G., Stvolinsky S.L., Semyonova M.L., Boldyrev A.A. Effect of carnosine on age-induced changes in senescence-accelerated mice // J. Anti-Aging Med. 1999. Vol. 2. N 4. P. 337–342.
14. Li L., Ng T.B., Gao W., Li W., Fu M., Niu S.M., Zhao L., Chen R.R., Liu F. Antioxidant activity of gallic acid from rose flowers in senescence accelerated mice // Life Sci. 2005. Vol. 77. N 2. P. 230–240.
15. Chan Y.C., Hosoda K., Tsai C.J., Yamamoto S., Wang M.F. Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in senescence-accelerated mice // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2006. Vol. 52. N 4. P. 266–273.
16. Kolosova N.G., Stefanova N.A., Korbolina E.E., Fursova A.Zh., Kozhevnikova O.S. Senescence-accelerated OXYS rats: a genetic model of premature aging and age-related diseases // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N. 4. P. 294–298.
17. Morley J.E., Armbrrecht H.J., Farr S.A., Kumar V.B. The senescence accelerated mouse (SAMP8) as a model for oxidative stress and Alzheimer’s disease // Biochim. Biophys. Acta. 2012. Vol. 1822. N 5. P. 650–656.
18. Stefanova N.A., Kolosova N.G. Evolution of Alzheimer’s disease pathogenesis conception // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 4–10.
19. Kolosova N.G., Muraleva N.A., Zhdankina A.A., Stefanova N.A., Fursova A.Z., Blagosklonny M.V. Prevention of age-related macular degeneration-like retinopathy by rapamycin in rats // Am. J. Pathol. 2012. Vol. 181. N 2. P. 472–477.
20. Loshchenova P.S., Sinitsyna O.I., Fedoseeva L.A., Stefanova N.A., Kolosova N.G. Influence of antioxidant SkQ1 on accumulation of mitochondrial DNA deletions in the hippocampus of senescence-accelerated OXYS rats // Biochemistry (Moscow). 2015. Vol. 80. N 5. P. 596–603.
21. Kolosova N.G., Vitovtov A.O., Stefanova N.A. Metformin reduces the signs of sarcopenia in old OXYS rats // Adv. Gerontol. 2016. Vol. 6. N 1. P. 70–74.
22. Shabalina I.G., Vyssokikh M.Y., Gibanova N., Csikasz R.I., Edgar D., Hallden-Waldemarson A., Rozhdestvenskaya Z., Bakeeva L.E., Vays V.B., Pustovidko A.V., Skulachev M.V., Cannon B., Skulachev V.P., Nedergaard J. Improved health-span and lifespan in mtDNA mutator mice treated with the mitochondrially targeted antioxidant SkQ1 // Aging (Albany NY). 2017. Vol. 9. N 2. P. 315–336.
23. Anisimov V.N., Egorov M.V., Krasilshchikova M.S. et al. Effects of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on

lifespan of rodents // *Aging* (Albany NY). 2011. Vol. 3. N 11. P. 1110–1119.

24. Frolkis V.V., Muradian Kh.K. Life span prolongation. Boca Raton: CRC Press, 1991. 427 pp.

25. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: from organism to cell and back // *Aging: exploring a complex phenomenon* / Ed. Sh.I. Ahmad. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. P. 577–595.

26. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.

27. 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 // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 2. P. 62–70.

28. 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.

29. Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.

30. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chrono-

logical aging of different cells // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.

31. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological research // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.

32. von Zglinicki T., Saretzki G., Döcke W., Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? // *Exp. Cell Res.* 1995. Vol. 220. N 1. P. 186–193.

33. Saretzki G., Feng J., von Zglinicki T., Villeponteau B. Similar gene expression pattern in senescent and hyperoxic-treated fibroblasts // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1998. Vol. 53. N 6. P. B438–B442.

34. von Zglinicki T., Pilger R., Sitte N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28. N 1. P. 64–74.

35. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1992. Vol. 663. P. 475–476.

Поступила в редакцию
17.01.2018

Принята в печать
15.03.2018

GERONTOLOGY

ON THE CHOICE OF CONTROL OBJECTS IN EXPERIMENTAL GERONTOLOGICAL RESEARCH

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

*Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia*

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

Recently, a large number of papers have appeared that describe the successful use of various biologically active compounds (mitochondrial antioxidants, antidiabetic biguanides, mimetics of dietary restriction, etc.) as geroprotectors. However, in our opinion, in most cases, the positive results of such studies are determined by a “successful” selection of control objects. As such, animals with some abnormalities are often used, so that any favorable effect on the corresponding pathological processes leads to an increase in life span. Besides, control animals can be normal, i.e. wild type, but placed in some extreme conditions, which can be overcome precisely by certain biologically active compounds. Thus, treatment of pathologies is present, and not an effect on the fundamental processes of aging. There is a point of view, according to which the results of Clive McCay’s experiments, which have significantly prolonged the life of rats by limiting caloric intake, are determined, firstly, by the fact that the control animals were fed *ad libitum* (which is not at all characteristic of animals in the wild), and secondly, because the Fisher-344 rats used in experiments are short-lived. The above considerations seem to concern also gerontological experiments on cultured cells. In particular, we sometimes hear from our colleagues remarks about the model of “stationary phase aging” of cell cultures used in our laboratory due to the fact that most of the experiments are carried out on transformed rather than normal cells. However, this approach seems to us quite justified, because the phenomenon of “stationary phase”/chronological aging is common to a wide variety of cells, including bacteria, yeasts, cyanobacteria, mycoplasmas, animal and plant cells. Herewith cells with unlimited mitotic potential do not change either from experiment to experiment or during long-term cultivation both with and without (in the framework of stationary phase aging model) subcultivation, which cannot be said of normal diploid fibroblasts, whose telomeres are shortened with each division (and from the moment of seeding of the cells to their entering the stationary phase of growth they can divide up

to 10 times!). We believe that to search for effective geroprotectors, which provide an impact on the fundamental mechanisms of aging, it is necessary to conduct studies on “maximally healthy” animals, or on “maximally stable” model systems.

Keywords: *aging, cell senescence, geroprotectors, control groups, cell cultures, experimental animals*

Сведения об авторах

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

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

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

ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 574.34

БИОТИЧЕСКИЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ДВУХ ВИДОВ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
В СМЕШАННОЙ КУЛЬТУРЕМ.А. Михеев¹, В.И. Ипатова^{1,*}, Н.Е. Спиркина²¹Кафедра гидробиологии и ²кафедра генетики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: viipatova@hotmail.com

Исследовали биотические взаимодействия в смешанной культуре двух видов микроводорослей — *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. и *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., используемых в монокультуральном биотестировании в качестве тест-объектов. Оценивали токсическое влияние бесклеточных фильтратов, полученных из монокультуры *S. quadricauda* разного “возраста” (2, 7, 10, 15, 21 и 28 сут), на развитие “молодой” тест-культуры *M. arcuatum* и, наоборот, оценивали токсичность фильтратов, полученных из монокультуры *M. arcuatum* разного “возраста” (2, 7, 10, 15, 21 и 28 сут), на развитие “молодой” тест-культуры *S. quadricauda*. Одновременно с помощью тест-культуры каждого вида контролировали токсичность “своих” фильтратов разного “возраста”. Взаимодействия видов в смешанной культуре можно рассматривать как отрицательные, типа антагонистических, когда обе популяции тормозят развитие друг друга через метаболиты и конкуренцию за пищевой ресурс, при этом влияние *S. quadricauda* на *M. arcuatum* значительно сильнее. Основным фактором, сдерживающим развитие монокультуры *S. quadricauda*, является быстрое истощение пищевого ресурса среды, а не угнетение роста собственными метаболитами. Такое истощение пищевого ресурса из среды у монокультуры *M. arcuatum* происходит значительно позднее, чем у *S. quadricauda*. Метаболиты *S. quadricauda* оказывают сильное угнетающее действие на развитие *M. arcuatum*, а метаболиты *M. arcuatum* — слабое влияние на развитие *S. quadricauda*. Наибольшее ингибирующее действие на процесс деления клеток *M. arcuatum* оказывают фильтраты “старой” (21–28 сут) культуры *S. quadricauda*. Сравнительный анализ динамики численности двух видов *S. quadricauda* и *M. arcuatum* в моно- и двухвидовых культурах водорослей, а также эксперименты с фильтратами этих монокультур показали, что взаимодействие видов можно объяснить конкуренцией за пищевой ресурс и аллелопатическим взаимодействием (влиянием экзометаболитов).

Ключевые слова: микроводоросли, конкуренция, смешанные культуры, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium arcuatum*, биотестирование, метаболиты

Микроводоросли (МВ) являются важным звеном в создании первичного органического вещества в водных экосистемах. На развитие МВ кроме абиотических факторов существенное влияние оказывают биотические взаимоотношения между видами внутри фитопланктонного сообщества. Исследования смешанных культур МВ направлены на поиск возможности управления их ростом и биосинтезом с целью успешного регулирования цветения воды, получения ценных продуктов, использования МВ в медицине, при приготовлении пищевых продуктов, в качестве корма для животных и в качестве удобрения, в очистке сточных вод, а также при биотестировании.

Одним из способов исследования биотических взаимодействий в лабораторных условиях является изучение смешанных культур МВ на основе анализа динамики численности, биомассы видов, а также результатов экспериментов с фильтратами монокультур.

В монокультурах можно изучать отношения “среда—популяция”, а в смешанных культурах — является возможность изучать отношения “популяция—популяция”, определять границы устойчивого сосуществования, условия доминирования и элиминации видов.

Конкуренция за лимитирующий ресурс (эксплуатационная конкуренция) является одним из биотических факторов, определяющим структуру фитопланктонного сообщества [1]. Помимо этого, между водорослями существуют аллелопатические взаимодействия через выделение прижизненных метаболитов, подавляющих рост популяций-партнеров по сообществу [2–4]. Аллелопатически активная популяция препятствует, таким образом, использованию партнерами по сообществу ресурсов среды, что соответствует интерференционной конкуренции [1].

Между водорослями могут наблюдаться как отрицательные (эксплуатационная конкуренция,

аллелопатическое подавление роста конкурента), так и положительные (стимулирование роста сопутствующего вида) взаимодействия [5]. В некоторых случаях наблюдается и самоугнетение видов собственными продуктами жизнедеятельности.

Основными механизмами межвидовых конкурентных взаимоотношений, обеспечивающими доминирование видов макроводорослей в сообществах, для *Ahnfeltia tobuchiensis* и *Gracilaria gracilis* являются потребление ресурса и химическое воздействие на конкурентов; для *Chaetomorpha linum* или *Ulva prolifera* — оккупация пространства и затенение конкурентов; для *Eucheuma denticulatum* — химическое воздействие на конкурентов [6].

В зависимости от формы пищевого ресурса может изменяться характер взаимодействия между популяциями: при использовании азота мочевины эксплуатационная конкуренция являлась единственным путем взаимодействия динофитовой водоросли *Amphidinium carterae* и диатомеи *Pseudo-nitzschia delicatissima*, тогда как при ассимиляции нитратов она дополнялась аллелопатическими взаимодействиями [7].

Иногда смешанные культуры используют для увеличения их продуктивности [8, 9].

Таким образом, в отличие от монокультур, смешанные культуры позволяют изучать взаимодействие видов партнеров по ценозу и одновременно исследовать действие различных факторов среды, в том числе и токсических. Однако смешанные культуры микроводорослей пока еще мало используются в биотестировании в качестве многовидовых тест-систем для оценки качества водной среды.

Целью настоящей работы явилось исследование биотического взаимодействия в смешанной культуре двух видов MB — *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. и *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., используемых в монокультуральном биотестировании, что может служить предпосылкой для их применения в качестве двухвидовой тест-системы.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись альгологически чистые культуры зеленых хлорококковых микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Vreb. и *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., широко распространенных в пресных водоемах Южного и Северного полушария и являющихся важным звеном в их трофических цепях.

S. quadricauda получена из коллекции культур водорослей кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (DMMSU, штамм S-3). Данный вид относится к ценобиальным организмам и широко используется в мировой практике для биотестирования качества водной среды.

M. arcuatum — одноклеточная водоросль, которая введена в культуру на кафедре гидробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и рекомендована в качестве нового тест-объекта в биотестировании [10].

Культуры выращивали на среде Успенского № 1 в люминостате при освещенности 3,5 клк, температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$ и перемешивании 2 раза в сутки во избежание оседания клеток.

Основными показателями состояния культур служили изменение численности клеток и ростовых характеристик (время генерации g , удельная скорость роста V , соотношение живых и мертвых клеток) в динамике развития культур. Время генерации рассчитывали по формуле:

$$g = \frac{\ln 2(t_2 - t_1)}{\ln \frac{q_2}{q_1}},$$

где q_2 — численность клеток на момент времени t_2 , q_1 — численность клеток на момент времени t_1 .

Удельную скорость роста рассчитывали за 31 сут по формуле:

$$V = \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) / 31,$$

где N_0 — исходная численность, N — численность на 31-е сут опыта.

Развитие двух видов *S. quadricauda* и *M. arcuatum* изучали при совместном культивировании с исходным соотношением численности клеток 1:1 (25 и 25 тыс. кл/мл). Опыты длительностью 31 сут проводили в конических колбах емкостью 150 мл, в которые добавляли 50 мл среды.

Численность клеток подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом. Определение живых и мертвых клеток осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа Axioscop 2 FS Plus (Carl Zeiss, Германия). При облучении объекта короткими сине-фиолетовыми лучами получали длинноволновое видимое свечение объекта: живые клетки имели ярко-красное свечение, а мертвые — зеленое.

Чтобы выяснить характер взаимоотношения двух видов в смешанной культуре на уровне метаболитов (аллелопатическое взаимодействие), каждый вид культивировали на “своих” и “чужих” фильтратах. Методом биотестирования оценивали токсическое влияние бесклеточных фильтратов, полученных из монокультуры *S. quadricauda* разного “возраста” (2, 7, 10, 15, 21 и 28 сут), на развитие “молодой” 7-суточной тест-культуры *M. arcuatum* и, наоборот, оценивали токсичность фильтратов, полученных из монокультуры *M. arcuatum* разного “возраста” (2, 7, 10, 15, 21 и 28 сут), на развитие “молодой” 7-суточной тест-культуры *S. quadricauda*. Одновременно с помощью тест-культуры каждого вида контролировали токсичность “своих” фильтратов разного “возраста”. Биогенные элементы в фильтраты 28-суточных культур добавляли в количестве, соответствующем их содержанию в питательной среде на начало эксперимента.

Бесклеточные фильтраты получали осаждением клеток с использованием центрифуги Eppendorf

5702R (Германия) в течение 30 мин при 4°С и 3000g. Надосадочную жидкость переносили в новые центрифужные пробирки и повторно центрифугировали в течение 30 мин в том же режиме.

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA 6.1. Оценку статистической значимости различий контрольной и опытных выборок в экспериментах на водорослях проводили с использованием теста Стьюдента, считали различия достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При проведении испытаний со смешанной культурой одновременно были поставлены эксперименты с монокультурами двух видов.

Развитие монокультуры *M. arcuatum*, в отличие от развития монокультуры *S. quadricauda* (табл. 1), характеризуется более высокой скоростью роста в логарифмической фазе и большей ее длительностью, а также более поздним переходом в стационарную фазу роста. Так, время генерации *M. arcuatum* было в 1,7 раз меньше, а удельная скорость роста была немного выше, чем такие же показатели для *S. quadricauda*. При этом численность клеток *M. arcuatum* на 31-е сут возрастала в 480 раз по сравнению с исходной, а в смешанной культуре — в 16 раз, т.е. в смешанной культуре в присутствии *S. quadri-*

cauda происходило существенное подавление роста *M. arcuatum*.

По данным люминесцентной микроскопии, доля живых клеток *M. arcuatum* в монокультуре на протяжении опыта снижалась и составляла 99–92%, а в смешанной — со временем уменьшалась и на 25-е сут составляла 78%.

Развитие *S. quadricauda* в моно- и смешанной культурах происходило иначе, чем у *M. arcuatum* (табл. 1). Рост *S. quadricauda* в моно- и смешанной культурах был схожим, и культура *M. arcuatum* не оказывала существенного влияния на рост *S. quadricauda*: наблюдалось лишь незначительное угнетение на всех этапах роста *S. quadricauda* со стороны *M. arcuatum*.

Доля живых клеток *S. quadricauda* в моно- и смешанных культурах была сходной и к концу опыта составила около 80%.

При смешанном культивировании с равным посевным титром в накопительном режиме культивирования вид *S. quadricauda* доминировал над *M. arcuatum* уже на 7-е сут и постепенно вытеснял его (рис. 1).

Для количественного выражения взаимодействия между видами в совместной культуре был использован индекс взаимодействия (И.И. — Interaction Index):

Таблица 1

Характеристики роста *Monoraphidium arcuatum* и *Scenedesmus quadricauda* в моно- и смешанной культурах (пояснения в тексте)

Культура водорослей	Длительность лаг-фазы (сут)	Время генерации (сут)	Число клеток в миллилитре среды на 4-е сут роста	N/N ₀	Удельная скорость роста (сут ⁻¹)
<i>Monoraphidium arcuatum</i>					
Монокультура	< 1	1,66	847 000	480	0,22
Смешанная культура	4	8,4	310 000	16	0,10
<i>Scenedesmus quadricauda</i>					
Монокультура	< 1	2,8	513 000	140,7	0,18
Смешанная культура	< 1	2,64	462 000	134,7	0,17

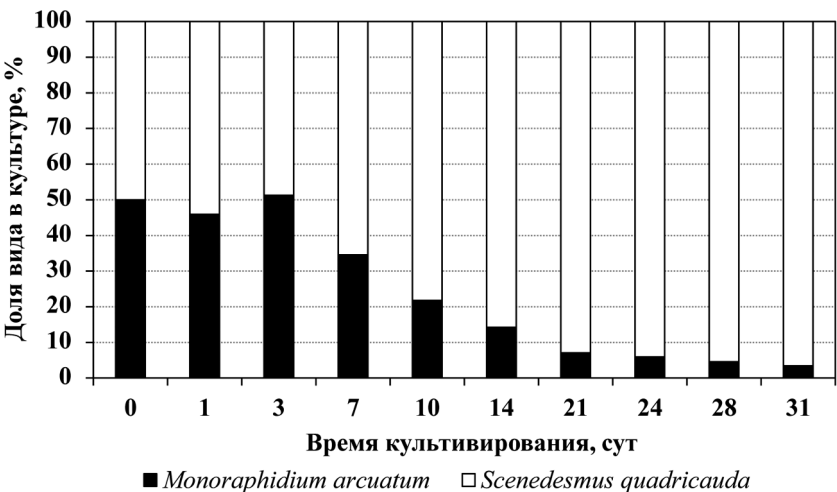


Рис. 1. Доля *Scenedesmus quadricauda* и *Monoraphidium arcuatum* в смешанной культуре (в %)

$$I.I. = \left(\frac{X_{p_t}}{X_{p_0}} \right) / \left(\frac{X_{m_t}}{X_{m_0}} \right),$$

где X_{p_t} и X_{p_0} — численность популяции анализируемого вида в смешанной культуре в момент времени t и t_0 соответственно, а X_{m_t} и X_{m_0} — численность популяции того же вида в монокультуре в момент времени t и t_0 соответственно.

Значения $I.I.$ могут быть равными 1, больше 1 или меньше 1. Чем больше индекс для одного вида, тем большее влияние он оказывает на другой вид. Значения $I.I.$ двух видов в смешанной культуре приведены в табл. 2. В смешанной культуре значения $I.I.$ для *M. arcuatum* со временем уменьшаются на 2 порядка, что свидетельствует о подавлении этого вида в процессе роста партнером по ценозу —

S. quadricauda. Значения $I.I.$ в совместной культуре для *S. quadricauda*, в отличие от значений $I.I.$ для *M. arcuatum*, со временем сильно увеличиваются, что указывает на слабое влияние на рост *M. arcuatum* со стороны *S. quadricauda*.

Таким образом, в смешанной двухвидовой культуре вид *S. quadricauda* является более конкурентноспособным и вытесняет вид *M. arcuatum*. При этом рост *S. quadricauda* в смешанной культуре близок к таковому в монокультуре, а рост *M. arcuatum* подавлен и существенно медленнее, чем в монокультуре. Угнетение *M. arcuatum* выразилось в уменьшении количества живых клеток и замедлении темпа деления, что приводило к снижению их численности.

Результаты экспериментов с монокультурами *S. quadricauda* и *M. arcuatum* при культивировании на “чужих” филтрах приведены на рис. 2 и 3.

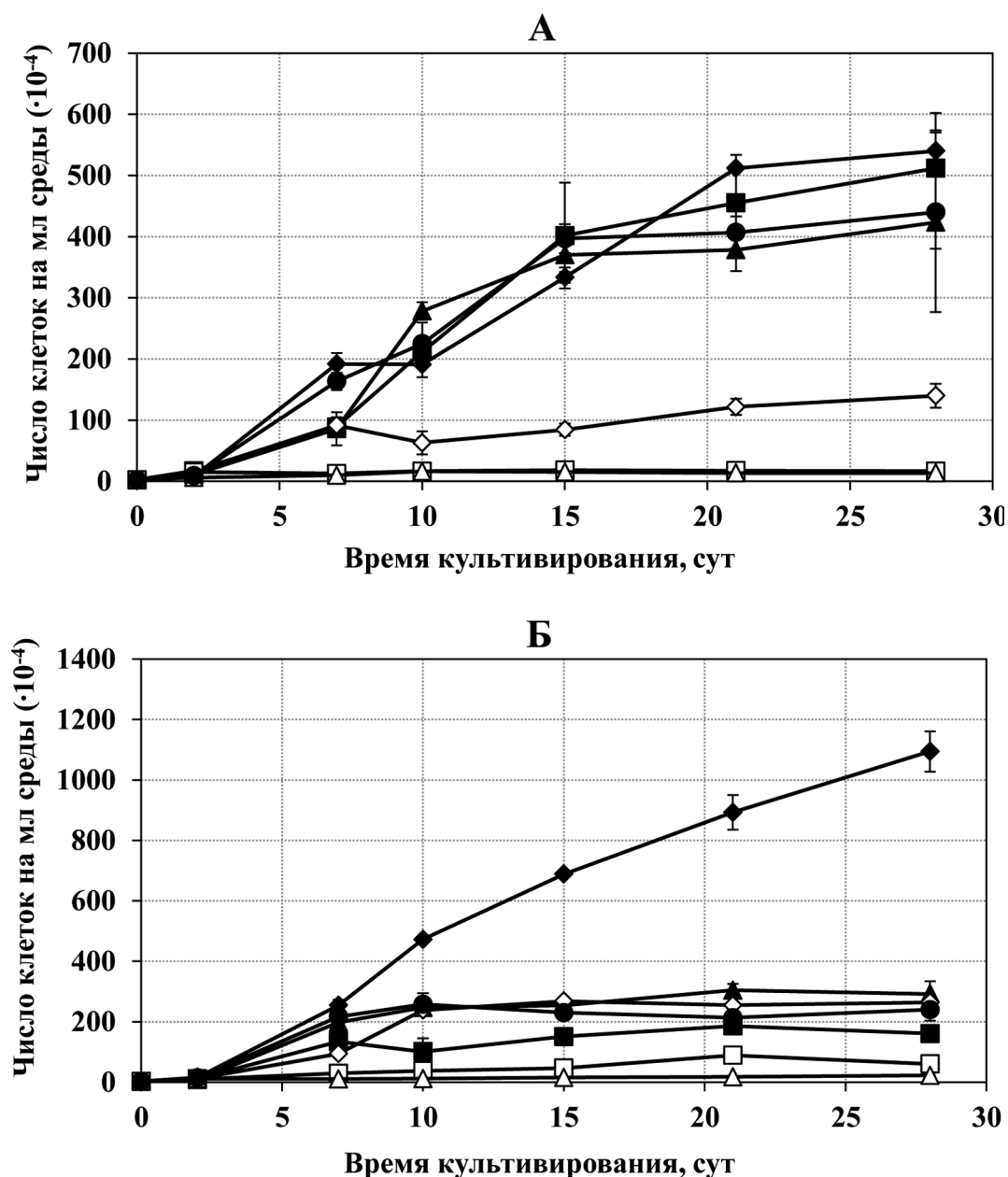


Рис. 2. Численность клеток “молодых” тест-культур *Scenedesmus quadricauda* (А) и *Monoraphidium arcuatum* (Б) на филтрах культуры *Scenedesmus quadricauda*, полученных через 2 (■), 7 (▲), 15 (◇), 21 (□) и 28 (Δ) сут ее роста, а также при добавлении биогенных элементов к 28-суточному фильтрату (●) и в чистой среде в качестве контроля (♦)

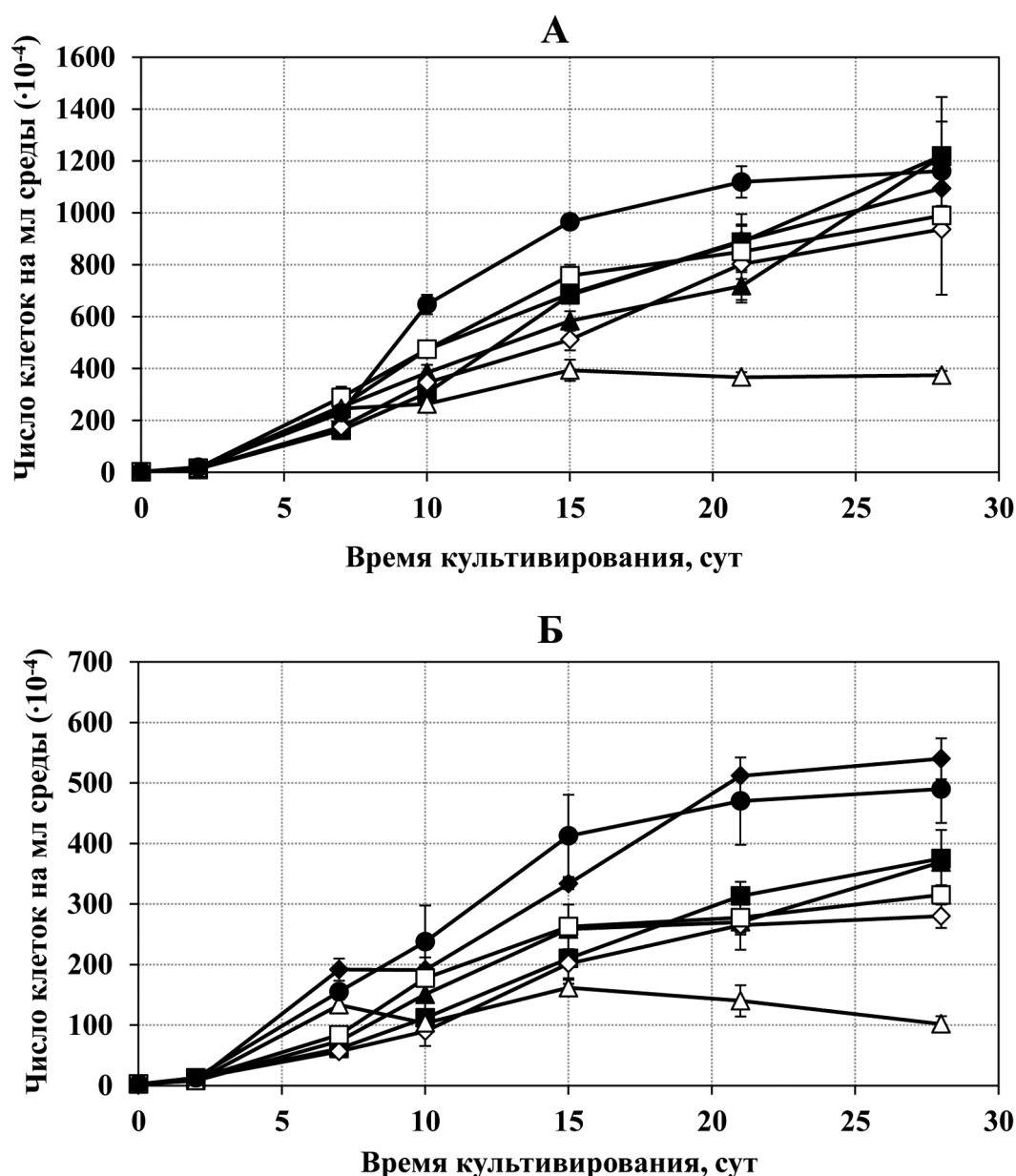


Рис. 3. Численность клеток “молодых” тест-культур *Monoraphidium arcuatum* (А) и *Scenedesmus quadricauda* (Б) на фильтратах культуры *Monoraphidium arcuatum*, полученных через 2 (■), 7 (▲), 15 (◇), 21 (□) и 28 (△) сут ее роста, а также при добавлении биогенных элементов к 28-суточному фильтрату (●) и в чистой среде в качестве контроля (◆)

Таблица 2
Индекс взаимодействия (I.I., пояснения в тексте)
двух видов в смешанной культуре

Срок культивирования, сут	<i>Monoraphidium arcuatum</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
0	1,0	1,0
1	1,3	0,8
3	0,8	1,2
7	0,3	3,3
10	0,2	5,1
14	0,1	9,6
18	0,1	12,5
21	0,1	19,9
28	0,05	22,2
31	0,04	27,8

Фильтраты, полученные в разные сроки развития (2, 7, 15, 21 и 28 сут) из монокультур каждого вида, были условно названы нами 2-, 7-, 15-, 21- и 28-суточными фильтратами.

Оказалось, что только “старые” 15–28-суточные фильтраты *S. quadricauda* угнетали развитие “молодой” тест-культуры *S. quadricauda* (рис. 2А). Однако добавка питательной среды в 28-суточный фильтрат приводила к тому, что рост тест-культуры *S. quadricauda* на нем на протяжении месяца был близок к уровню контрольной культуры *S. quadricauda* (рис. 2А). Следовательно, главным фактором, сдерживающим развитие *S. quadricauda* в норме после 15 сут, является истощение пищевого ресурса из среды, а не угнетение роста собственными метаболитами.

Все фильтраты *S. quadricauda* (даже 2-суточный фильтрат) оказывали угнетающее действие на *M. arcuatum* (рис. 2Б). Добавка биогенных элементов в 28-суточный фильтрат *S. quadricauda* не приводила к активации роста *M. arcuatum* (рис. 2Б), что свидетельствует об ингибирующем влиянии метаболитов *S. quadricauda* на рост *M. arcuatum*.

Только 28-суточный фильтрат *M. arcuatum* угнетал развитие “молодой” тест-культуры *M. arcuatum* (рис. 3А), тогда как у *S. quadricauda* уже 15-суточный фильтрат угнетал развитие тест-культуры *S. quadricauda* (рис. 2А). Таким образом, истощение пищевого ресурса из среды у монокультуры *M. arcuatum* происходит значительно позднее, чем у *S. quadricauda*.

Фильтраты разного “возраста” *M. arcuatum* также оказывали угнетающее действие на развитие *S. quadricauda*, но в значительно меньшей степени, чем фильтраты *S. quadricauda* на *M. arcuatum* (рис. 3Б). Добавка биогенов в 28-суточный фильтрат *M. arcuatum* приводила к росту *S. quadricauda*, сходному с контрольным (рис. 3Б). Следовательно, метаболиты *M. arcuatum* оказывают слабое угнетающее действие на развитие *S. quadricauda*.

Таким образом, исследование характера взаимоотношений двух видов водорослей при культивировании на “своих” и “чужих” фильтратах позволяет косвенно судить о влиянии метаболитов культуры одного вида на развитие культуры другого вида. Полученные данные свидетельствуют о том, что метаболиты *S. quadricauda* оказывают сильное угнетающее действие на развитие *M. arcuatum*, а метаболиты *M. arcuatum* — слабое влияние на развитие *S. quadricauda*. Наибольшее ингибирующее действие на процесс деления клеток *M. arcuatum* оказывают фильтраты “старой” культуры *S. quadricauda*, поскольку на мере “старения” водорослей происходит накопление окисленных токсических продуктов в среде.

В наших экспериментах взаимодействия видов можно рассматривать как отрицательные, типа антагонистических, когда обе популяции тормозят

развитие друг друга через метаболиты и конкуренцию за пищевой ресурс. При этом влияние *S. quadricauda* на *M. arcuatum* значительно сильнее. Указания на антагонистические взаимоотношения встречаются и в других работах [5, 11].

При совместном культивировании высокий конкурентный эффект может быть достигнут или за счет подавления развития партнера по совместному росту токсичными экзометаболитами, или за счет быстрого изъятия пищевого ресурса вследствие более высокой скорости роста, или за счет большей потребности в биогенах одного вида по сравнению с другими. В настоящем исследовании при развитии *S. quadricauda* в монокультуре стационарная фаза наступала быстрее, чем у *M. arcuatum*, следовательно, *S. quadricauda* в норме быстрее изымает питательные вещества из среды. Добавка биогенных элементов в “старый” фильтрат *S. quadricauda* приводила к возобновлению роста на нем “молодой” тест-культуры этого же вида. Однако по скорости роста *M. arcuatum* превосходит *S. quadricauda*, вероятно, за счет образования большего количества автоспор. Способность *M. arcuatum* на отдельных этапах роста образовывать преимущественно по 8 автоспор и более высокий темп деления клеток в начальный период развития приводят к более высокой численности, чем у *S. quadricauda* [10]. Поэтому более быстрое изъятие пищевого ресурса из среды у *S. quadricauda* может быть обусловлено скорее большей потребностью вида в биогенах и более высокой скоростью изъятия их из среды по сравнению с *M. arcuatum*.

Сравнительный анализ динамики численности двух видов *S. quadricauda* и *M. arcuatum* в моно- и двухвидовых культурах водорослей, а также эксперименты с фильтратами этих монокультур показали, что взаимодействие видов можно объяснить конкуренцией за пищевой ресурс и аллелопатическим взаимодействием (влиянием экзометаболитов).

Работа выполнена в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова часть 2 (тема № АААА-А16-116021660047-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sommer U. The impact of light intensity and daylength on silicate and nitrate competition among marine phytoplankton // Limnol. Oceanogr. 1994. Vol. 39. N 7. P. 1680–1688.
2. Cembella A. Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems // Phycologia. 2003. Vol. 42. N 4. P. 420–447.
3. Tillmann U., Alpermann T., John U., Cembella A. Allelochemical interactions and short-term effects of the dinoflagellate *Alexandrium* on selected photoautotrophic and heterotrophic protists // Harmful Algae. 2008. Vol. 7. N 1. P. 52–64.
4. Zak A., Musiewicz K., Kosakowska A. Allelopathic activity of the Baltic cyanobacteria against microalgae // Estuar. Coast. Shelf Sci. 2012. Vol. 112. P. 4–10.
5. Nabivailo Yu.V., Skriptsova A.V., Titlyanov E.A. The interspecific relationships of seaweeds and their role in the formation of communities of *Ahnfeltia tobuchiensis* (Kanno et Matsubara, 1932) Makienko, 1970 (Rhodophyta) // Russ. J. Mar. Biol. 2014. Vol. 40. N 5. P. 344–353.
6. Nabivailo Yu.V., Titlyanov E.A. Competitive relationships in natural and artificial algal communities // Russ. J. Mar. Biol. 2014. Vol. 32. N 1. P. 521–531.
7. Белевич Т.А., Запара Е.В., Ильин Л.В. Взаимодействие между планктонными водорослями при разных источниках азота // Усп. совр. биол. 2009. Т. 129. № 4. С. 379–385.
8. Novoveská L., Franks D.T., Wulfers T.A. Henley W.J. Stabilizing continuous mixed cultures of microalgae // Algal Res. 2016. Vol. 13. P. 126–133.
9. Hong Y., Xu K. Co-existing growth relationships of a lipid-producing alga with three microalgae // Allelopathy J. 2013. Vol. 32. N 2. P. 301–314.

10. Спиркина Н.Е., Ипатова В.И., Дмитриева А.Г., Филенко О.Ф. Сравнительная динамика роста культур микроводорослей видов *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind. и *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. // Бюлл. МОИП. Отд. биол. 2014. Т. 119. № 2. С. 64–69.

11. Ilyash L.V., Belevich T.A. Interaction between populations of marine microalgae *Prorocentrum micans* and *Platy-*

monas viridis in mixed cultures // Russ. J. Aquatic Ecol. 1996. Vol. 5. N 1. P. 21–26.

Поступила в редакцию
22.02.2018

Принята к печати
27.03.2018

HYDROBIOLOGY

BIOTIC INTERACTIONS BETWEEN TWO SPECIES OF MICROALGAE IN THE MIXED CULTURE

М.А. Mikheev¹, V.I. Ipatova^{1,*}, N.E. Spirkina²

¹Department of Hydrobiology and ²Department of Genetics, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
*e-mail: viipatova@hotmail.com

Biotic interactions in a mixed culture of two microalgae species — *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Breb. and *Monoraphidium arcuatum* (Korsch.) Hind., used in bioassay in monocultures as test objects, were studied. The toxic effect of cell-free filtrates from different “ages” monoculture (2, 7, 10, 15, 21 and 28 days) *S. quadricauda* on the growth of the “young” test culture *M. arcuatum* and, conversely, the toxic effect of cell-free filtrates from the different “ages” (2, 7, 10, 15, 21 and 28 days) monoculture *M. arcuatum* on the growth of the “young” test culture *S. quadricauda* was evaluated. Simultaneously the toxicity of their own filtrates of different “ages” was monitored by a test culture of each species. The interactions of the species in the mixed culture can be regarded as negative, such as antagonistic, when both populations inhibit the growth of each other through metabolites and food resource competition, while the effect of *S. quadricauda* on *M. arcuatum* is much stronger. The main factor constraining the growth of monoculture *S. quadricauda* is the rapid depletion of the food resource from the medium, and not the inhibition of growth by its own metabolites. The depletion of the food resources from the medium in monoculture *M. arcuatum* occurs much later than in monoculture *S. quadricauda*. Metabolites of *S. quadricauda* cause a strong inhibitory effect on the growth of *M. arcuatum*, and the metabolites of *M. arcuatum*—a weak inhibitory effect on the growth of *S. quadricauda*. The filtrates of the “old” culture of *S. quadricauda* (21–28 days) cause the greatest inhibitory effect on the process of cell division of *M. arcuatum*. The filtrates of the “old” culture *S. quadricauda* (21–28 days) cause the greatest inhibitory effect on the process of cell division of *M. arcuatum*. A comparative analysis of the cell number dynamics of two species *S. quadricauda* and *M. arcuatum* in mono- and two-species algal cultures, as well as experiments with filtrates of these monocultures, showed that the interaction of species can be explained by the food resource competition and allelopathic interaction (exometabolite effect).

Keywords: microalgae, competition, mixed cultures, *Scenedesmus quadricauda*, *Monoraphidium arcuatum*, bioassay, metabolites

Сведения об авторах

Михеев Михаил Александрович — аспирант кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-48; e-mail: miheev_m.93@mail.ru

Ипатова Валентина Ивановна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-48; e-mail: viipatova@hotmail.ru

Спиркина Наталья Евгеньевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры генетики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-56; e-mail: natus25@list.ru

МЕТОДЫ

УДК 57.087.3

ЭКСПРЕСС-МЕТОД СКРИНИНГА ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ПО ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РЕПОРТЕРНОГО БЕЛКА GFP

Н.О. Юрьева^{1,*}, А.С. Воронков^{1,2}, Д.В. Терешонок¹,
Е.С. Осипова¹, Е.В. Платонова¹, Д.В. Беляев¹¹Институт физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, Россия, 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 35;²Государственный гуманитарно-технологический университет, Россия, 142611, г. Орехово-Зуево, ул. Зеленая, д. 22
*e-mail: yuorieva@mail.ru

Разработан экспресс-метод первичного анализа трансформированных растений по интенсивности флуоресценции зеленого флуоресцентного белка (green fluorescent protein, GFP). По сравнению с распространенными методами скрининга трансгенных растений методами полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени или Нозерн-гибридизации, оценка по интенсивности флуоресценции GFP предлагаемым методом не требует дорогостоящих реактивов и занимает меньше времени. Такой подход может позволить вести скрининг первичных трансгенных регенерантов, сохраняя их для дальнейшей работы. Для доказательства корректности разработанного метода соотносили экспрессию модифицированного гена *GFP* (*hGFP*) в листьях трансформированных растений картофеля сорта “Скорoplodный”, определенную по накоплению мРНК, с интенсивностью флуоресценции белка GFP в микропрепаратах листьев. Высокая степень корреляции данных, полученных этими двумя методами, свидетельствует о наличии зависимости интенсивности флуоресценции от количества целевой мРНК.

Ключевые слова: *GFP*, генетическая инженерия, интенсивность флуоресценции, картофель, скрининг, первичные регенеранты

Зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) из медузы *Aequorea victoria* широко используется в качестве репортера для изучения экспрессии генов и локализации целевых белков в клетках бактерий, человека и растений [1]. Ген *GFP* кодирует белок, который флуоресцирует зеленым светом с максимумом около 506 нм при возбуждении синим светом с длиной волны 488 нм [2].

Флуоресценция GFP не зависит от типа клеток и их локализации и устойчива к фотообесцвечиванию. Белок GFP стабилен в довольно разнообразных условиях [3] и может быть оптически детектирован и количественно определен в флуоресцирующих тканях живых растений без использования лизиса клеток или других биохимических предобработок. Этот белок делает возможным оптическое изучение клеточных структур и динамики молекул, а также мониторинг патогенов в растительных препаратах минимального размера [4]. Известно, что по мере увеличения уровня экспрессии гена *GFP* увеличивается интенсивность флуоресценции GFP как в интактных листьях, так и в экстрактах белков трансгенных растений [5].

Чаще всего факт встраивания гена *GFP* в геном определяют только по наличию свечения, тогда как для определенных целей важно получить количественную оценку экспрессии гена, для чего обычно используют методы Нозерн-гибридизации или полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени, которые тре-

буют дорогостоящих реактивов, оборудования и времени. Существующие в настоящее время методы измерения флуоресценции позволяют с высокой точностью определять накопление белка GFP в изолированных клетках, но они плохо применимы для сложных объектов, которыми являются неповрежденные ткани листьев растений.

Принимая во внимание большое количество информации об исследованиях тканей трансгенных растений с использованием гена *GFP* в качестве репортера, мы поставили цель создать экспресс-метод для первичного скрининга регенерантов и предварительной оценки уровня экспрессии гена *GFP* с использованием минимального количества оборудования и реактивов, а также в кратчайшие сроки.

Материалы и методы

1. Исходный материал

1.1. Генетическая конструкция. Для экспрессии репортерного гена *GFP* в клетках растений нами создана генетическая конструкция *pBI-RbcS-GFP*. Промотор *rbcS* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit promoter) гена малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы был амплифицирован из геномной ДНК табака сорта “Самсун” с помощью праймеров RB-F-Hind (5'-GCGCAAGCTTGTGGGAACGAGATAAGGGCGAAGT-3') и Rb-R-Xba (5'-GCGTCTAGATGTTAA

TTACAATTAGACAGAA-3'), встроен в вектор pTZ57R/T (Fermentas, Литва) и секвенирован. Последовательность промотора полностью идентична опубликованной [6]. Затем промотор был встроен в вектор pBI121 (Clontech, США) по сайтам рестрикции *Hind*III и *Xba*I. Полученная конструкция названа pBI-RbGUS. Модифицированный ген *hGFP* был вырезан из pTR-UF2 [7] рестриктазой *Not*I и встроен в вектор *pBluescript*II KS(+) (Stratagene, США) по сайту рестрикции *Not*I, чтобы воспользоваться сайтами *Xba*I и *Sac*I, присутствующими как в *pBluescript*II KS(+), так и в pBI121. Полученная плазмида была названа KS(+)-*hGFP*. Затем фрагмент ДНК, содержащий *hGFP*, был вырезан из KS(+)-*hGFP* и встроен в описанную выше конструкцию pBI-RbGUS, из которой с помощью *Xba*I и *Sac*I был предварительно вырезан ген *GUS*, кодирующий глюкуронидазу. Полученная конструкция названа pBI-RbcS-GFP.

1.2. Растительный материал. С использованием модифицированного метода трансформации [8] были получены трансгенные растения с геном *hGFP* сорта картофеля "Скороплодный". Трансгенные растения с геном *hGFP*, нетрансформированные растения исходного сорта, а также *NPTII*-линии (линии с селективным геном, кодирующим неомизинфосфотрансферазу-II) выращивали в течение 3 недель в пробирках на среде с минеральными компонентами по Мурасиге и Скугу [9] с 2%-ной сахарозой и 7%-ным агаром, без гормонов и антибиотиков, при +22–24°C и освещенности 6000 люкс, 16-часовом фотопериоде и влажности воздуха 75%.

2. Генетический анализ

2.1. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Геномную ДНК растений картофеля выделяли методом с использованием цетилтриэтиламмония [10]. Для обнаружения гена *hGFP* использовали метод ПЦР со следующими праймерами: прямой – GFPPhNdeI (5'-CCCCATATGAGCAAGGGCGAGGAA-3') и обратный – 3'myGFP (5'-CCGGTCACCA CCTAGGAGGGCCSTTGTACAGCTCGTCCAT-3'). Длина амплифицированного фрагмента составляла 742 п.н. Амплификацию проводили в объеме 25 мкл в программируемом термоциклере Терцик (ЗАО "ДНК-Технология", Россия) при следующих условиях: первичная денатурация 2 мин при 94°C; 5 циклов: денатурация 20 с при 94°C, отжиг 10 с при 60°C, элонгация 10 с при 72°C; 35 циклов: денатурация 5 с при 94°C, отжиг 5 с при 60°C, элонгация 5 с при 72°C; заключительная элонгация 2 мин при 72°C. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с 0,01%-ным бромистым этидием в однократном Трис-боратном буфере. Для верификации длины фрагментов использовали маркер молекулярной массы M11 (ДНК маркер 1 Kb, "СибЭнзим", Россия).

2.2. Анализ экспрессии GFP с помощью Нозерн-гибридизации. Тотальную РНК выделяли по мето-

дике, любезно предоставленной Иль-Хо Кангом (Университет Флориды, США). Растительную ткань (0,2 г) измельчали с жидким азотом пестиком в ступке, затем заливали 400 мкл смеси (1:1) кислого фенола (Sigma, США) и буфера для экстракции РНК (0,1 М LiCl, 0,1 М Трис-HCl pH 7,5, 1% додецилсульфата натрия и 10 мМ динатриевой соли ЭДТА). После оттаивания содержимое ступки переносили в микроцентрифужные пробирки, встряхивали 5 мин, добавляли 200 мкл хлороформа, встряхивали 15–30 мин, центрифугировали при 20000 g 30 мин и переносили верхнюю фазу в новую пробирку. Затем экстракцию хлороформом повторяли. К водной фазе добавляли 1/3 объема 8 М LiCl и инкубировали 16 ч при 4°C, затем РНК осаждали 30 мин в центрифуге при 12000 g, осадок промывали 96%-ным этанолом и растворяли в 15–30 мкл воды. Концентрацию РНК определяли измерением оптической плотности её раствора на спектрофотометре при длине волны 260 нм. Электрофорез 30 мкг РНК в 2%-ной агарозе с формальдегидом, а также перенос РНК на мембрану Hybond-N+ (GE Healthcare, США) проводили, как описано в сборнике "Методы генетической инженерии" [11]. Фрагмент *hGFP* вырезали из pTR-UF2 рестриктазой *Not*I, выделяли из агарозного геля с помощью Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, Литва) и затем из него готовили меченный ³²P ДНК-зонд с использованием NEBlot Kit (New England Biolabs, США). Предгибридизацию и гибридизацию проводили в буфере, содержащем 7% SDS, 0,25 М фосфат натрия, 1 мМ ЭДТА, 10 г/л бычьего сывороточного альбумина и 50 мг/л низкомолекулярной ДНК спермы сельди в гибридизационном инкубаторе Robbins (США) при 65°C. В гибридизационный буфер добавляли ранее приготовленный ДНК-зонд. После отмывок в последовательно x1, x0,1 и x0,1 цитратном буфере с добавлением 0,1% додецилсульфата натрия при 65°C мембрана была экспонирована в течение 20 сут в кассете PhosphorImager (GE Healthcare, США), и интенсивности сигналов были измерены с помощью программного обеспечения ImageQuant TLверсии 7.0 (GE Healthcare, США).

3. Измерение флуоресценции

3.1. Приготовление микропрепаратов. От растения первичного регенеранта, выращенного в пробирке, в стерильных условиях ламинар-бокса пинцетом отделяли второй полностью развернувшийся верхний лист длиной 4–6 мм. Скальпелем удаляли черешок и 1 мм основания листа. Подготовленный эксплантат помещали в каплю дистиллированной воды на предметном стекле и накрывали покровным стеклом, немного надавливая на него, чтобы удалить пузырьки воздуха. Подготавливали по 3 препарата на 1 генотип.

3.2. Микроскопирование. Исследовали под микроскопом и фотографировали по 5 полей зрения

на препарат. Анализировали участки листа: между жилками, жилки и в некоторых случаях трихомы. Для анализа флуоресценции использовали флуоресцентный микроскоп AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Зеленый флуоресцентный белок исследовали в свете ртутной лампы HBO 100 с набором фильтров №38 (Кат № 000000-1031-346; Carl Zeiss, Германия) возбуждение 440–470 нм, эмиссия 525–550 нм. Все изучаемые линии растений были исследованы при одинаковой экспозиции и одинаковом значении пропускающей диафрагмы ртутной лампы. Фотографии получали с помощью высокочувствительной монохромной камеры AxioCam MRm (Carl Zeiss, Германия).

3.3. Анализ изображений. Полученные снимки обрабатывали с помощью программ AxioVision или ZEN Blue (Carl Zeiss, Германия).

Стандартное отклонение в опытах и коэффициент корреляции (r) для массивов данных вычисляли с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты

Исходный материал для разработки метода был получен посредством агробактериальной трансформации с использованием созданной нами конструкции и модифицированной методики [8]. Получено 15 первичных регенерантов картофеля сорта “Скорoplodный”. В 9 линиях с помощью ПЦР было подтверждено наличие целевого гена и определен уровень накопления мРНК методом Нозерн-гибридизации (рис. 1А).

Интенсивность флуоресценции GFP оценивали по ее среднему значению для:

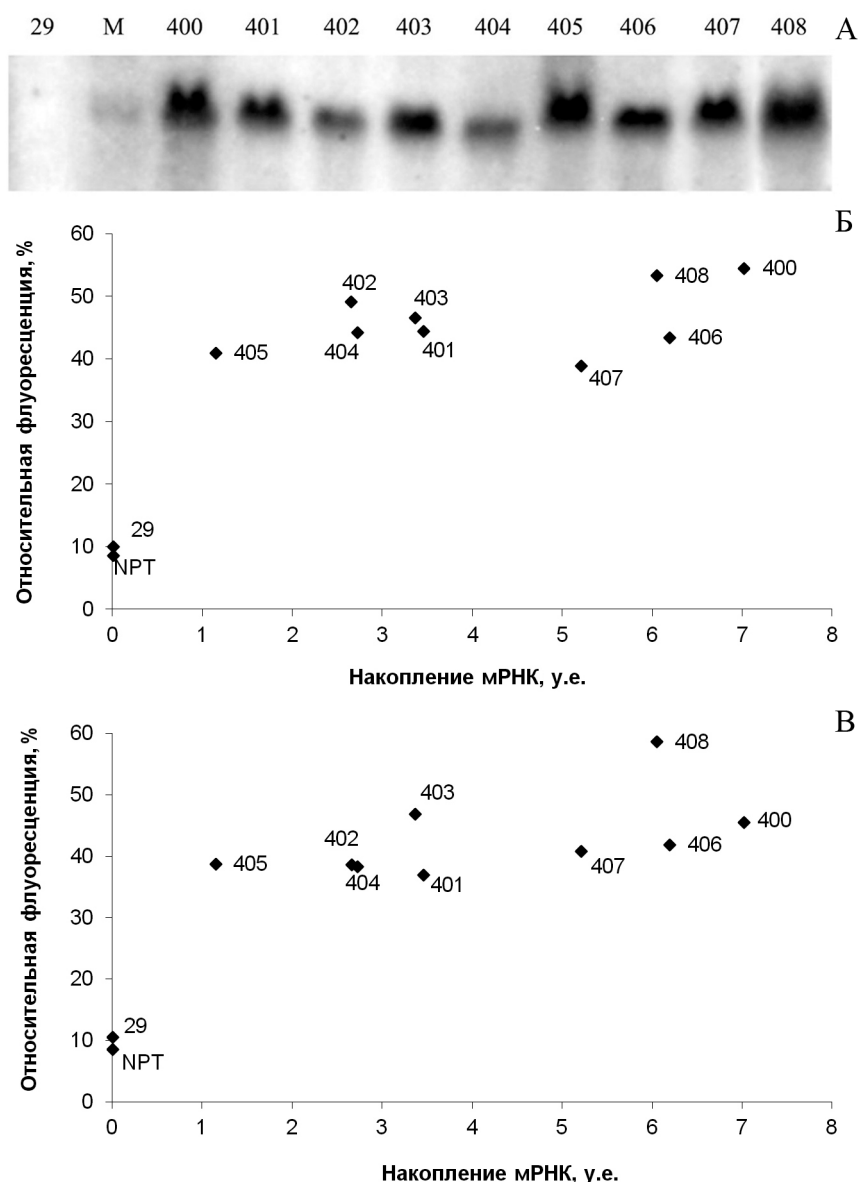


Рис. 1. Нозерн-гибридизация мРНК с *GFP*-зондом (А), а также взаимосвязь между накоплением мРНК *hGFP* и его относительной флуоресценцией в тканях листьев, вычисленной с помощью инструментов “профиль” (Б) и “прямоугольник” (В). 29 — исходный сорт “Скорoplodный”; М — маркер (High Range RNA Ladder, Fermentas, Литва) молекулярной массы РНК (на рисунке виден фрагмент длиной 1000 н.); NPT — трансгенная линия с *NPTII*; 400–408 — трансгенные линии с *hGFP*

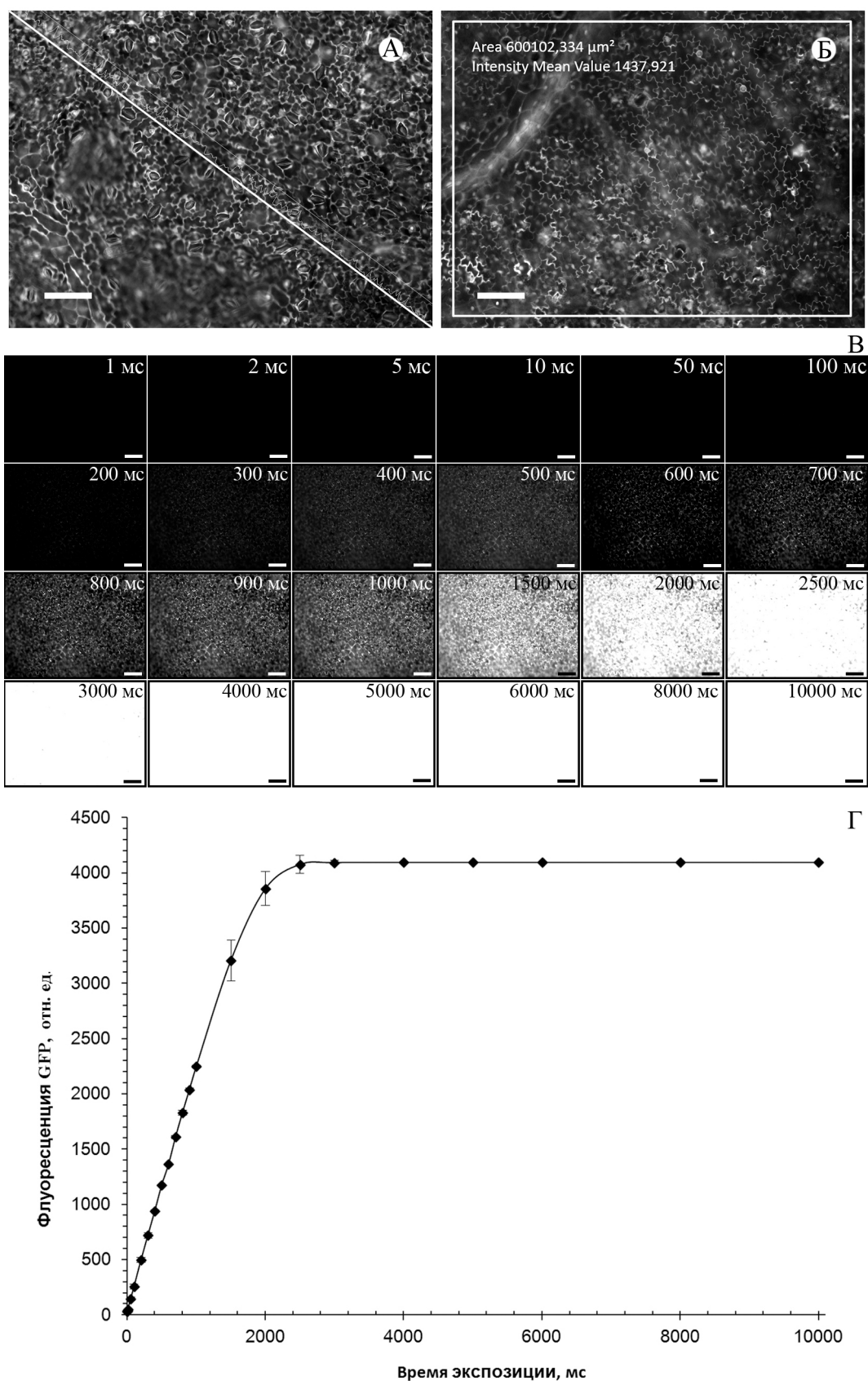


Рис. 2. Микрофотографии участка листа трансгенного картофеля: А – “профиль” флуоресценции; Б – “прямоугольник”. В – микрофотографии с различной экспозицией съемки. Масштабная линейка – 100 мкм. Г – зависимость интенсивности флуоресценции GFP от экспозиции

1) профиля, проведенного в программе Axio-Vision 4.8 (Carl Zeiss, Германия) по диагонали фотографии (инструмент “Profile”) (рис. 2А);

2) всего поля зрения в программе ZEN Blue с использованием инструмента “Rectangle (aligned)” (прямоугольник) (рис. 2Б).

Для подбора условий получения репрезентативных снимков исследуемых препаратов, когда величина интенсивности флуоресценции укладывалась в границы значений чувствительности камеры от 0 (черный цвет) до 4095 (белый цвет), был использован косвенный подход. Мы оценили зависимость интенсивности флуоресценции GFP от изменения времени экспозиции съемки камерой AxioCam MRm в границах от 1 до 10000 мс. Для этого была сделана серия снимков одного и того же образца с разным временем экспозиции без изменения расстояния до объекта (рис. 2В). Из этой серии снимков видно, что как при малых (от 1 до 100 мс), так и при больших (от 3000 до 10 000 мс) экспозициях нет заметных “на глаз” изменений интенсивности флуоресценции образца.

В программе ZEN с помощью инструмента “прямоугольник” мы оценили интенсивность флуоресценции не менее десяти снимков для каждой из выбранных экспозиций и представили средние значения измерений, а также их стандартное отклонение в виде графика (рис. 2Г).

Из графика (рис. 2Г) следует, что в границах экспозиций от 10 мс до 1500 мс зависимость носит линейный характер, поэтому используемый нами

подход можно считать вполне обоснованным. При более высоких значениях появляются “пересвеченные” пиксели, их интенсивность ≥ 4095 отн. ед., что выходит за границы чувствительности камеры, и в них невозможно оценить интенсивность флуоресценции, а начиная с 3000–4000 мс, уже весь образец получается “пересвеченным”, и график выходит на плато.

Перед съемкой всех исследуемых линий было подобрано такое время экспозиции, которое обеспечивало получение “непересвеченных” фотографий образцов. Первые пробные фотографии были сделаны с экспозицией в границах линейной зависимости чувствительности камеры. С помощью функции OverExposition программы AxioVision 4.8 была выбрана оптимальная экспозиция (500 мс), которая позволила получить репрезентативные снимки, с видимыми клетками. Все фотографии исследуемых образцов были сделаны с одинаковым временем экспозиции. На фотографиях тканей листьев растений исходного сорта (29), *NPTII* и *GFP*-трансгенов 400–408 (рис. 3) отчетливо видны различия по интенсивности флуоресценции между образцами с геном *GFP* и без него.

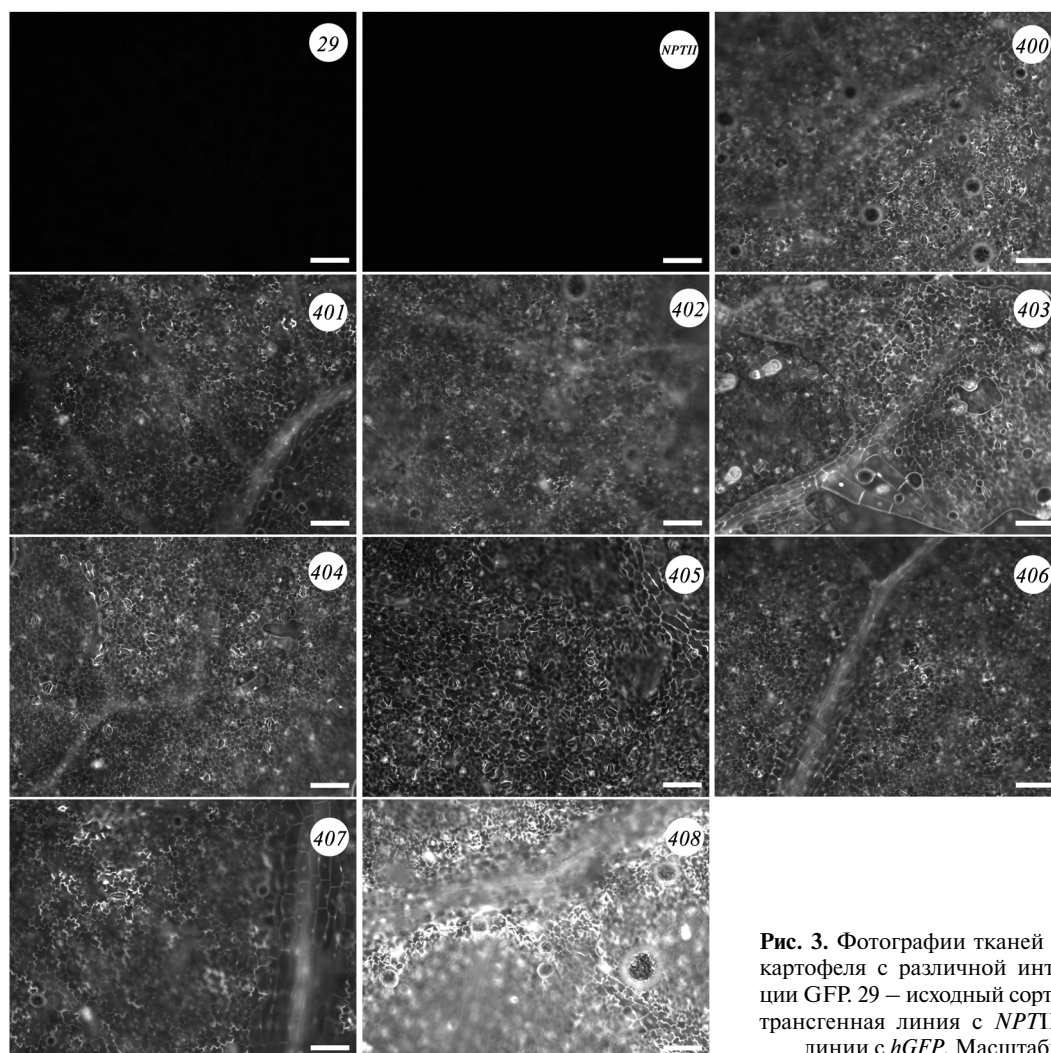


Рис. 3. Фотографии тканей участков листьев растений картофеля с различной интенсивностью флуоресценции GFP. 29 — исходный сорт “Скорoplодный”, *NPTII* — трансгенная линия с *NPTII*, 400–408 — трансгенные линии с *hGFP*. Масштабная линейка — 100 мкм

Анализ относительной интенсивности флуоресценции в листьях асептических растений исходного сорта “Скороплодный” и его трансгенных линий с подтвержденной вставкой *GFP*, а также с вставкой *NPTII* по отношению к максимальному уровню флуоресценции выявил достоверные различия ($p \leq 0,05$) между относительными интенсивностями флуоресценции *GFP*-трансгенов и растений, не несущих ген *hGFP* (исходного сорта и *NPTII*), измеренными как методом “профиль” с помощью компьютерной программы AxioVision 4.8 (рис. 1Б), так и методом “прямоугольник” с помощью программы ZEN Blue (рис. 1В).

На рис. 1 видны корреляции уровня накопления мРНК со значениями относительной флуоресценции, определенными методами “профиль” (рис. 1Б) и “прямоугольник” (рис. 1В). Коэффициенты корреляции между значениями относительной флуоресценции и накоплением мРНК в популяции *GFP*-трансгенов при использовании методов измерения интенсивности флуоресценции “профиль” и “прямоугольник” составили +0,832 и +0,852, соответственно.

Кроме того, из рис. 1 видно, что значения относительной флуоресценции каждой из исследуемых линий *GFP*-трансгенов картофеля, измеренные методом “профиль”, достоверно не отличаются от значений относительной флуоресценции, измеренной методом “прямоугольник” ($p \leq 0,05$). Статистический анализ выявил высокий уровень корреляции значений относительной флуоресценции, полученных методами анализа “профиль” и “прямоугольник” ($r = +0,962$).

Обсуждение результатов

Экспресс-метод был разработан с использованием трансгенных растений картофеля, экспрессирующих модифицированный ген *hGFP*, оптимизированный для экспрессии в клетках млекопитающих [7]. Однако анализ частоты использования кодонов в этом гене близким к картофелю видом *Nicotiana tabacum* не выявил редко используемых этим растением кодонов (http://gcua.schoedl.de/sequential_v2.html), поэтому кодоновый состав этого гена не должен представлять проблемы для его экспрессии в картофеле. Ген находится под контролем сильного и специфичного для зеленых частей растения промотора малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы табака, использованного ранее для экспрессии репортерных генов в растениях [12].

На рис. 3 приведены микрофотографии флуоресценции *GFP* в трансгенных растениях. Видны клеточные ядра, в которых *GFP* локализуется чаще, чем в цитоплазме, что было также замечено другими

исследователями [13]. Несмотря на схожесть результатов измерений флуоресценции методами “профиль” и “прямоугольник”, последний дает более точные значения сигнала флуоресценции, так как сигнал “профиль” зависит от того, как проводится линия профиля. На рис. 2Г показано, что данные измерения интенсивности флуоресценции линейны в широком (по крайней мере, 10-кратном) диапазоне. Это позволяет изучать регулируемую экспрессию *GFP* и детектировать наличие *GFP* в растениях, в которых по каким-то причинам экспрессия *GFP* понижена (например, из-за неоптимального места встройки переносимого фрагмента ДНК агробактерии).

В последние годы все чаще используется автоматизированный анализ тканей трансгенных растений, в которых используется ген *GFP* в качестве репортера. Для того чтобы избежать субъективного влияния оператора на результаты, получение и сбор изображений исследуемых тканей и клеточных структур, а также количественный анализ флуоресценции *GFP* производятся с помощью автоматизированных систем, включающих в себя флуоресцентный микроскоп, “роботизированную платформу” и специализированную компьютерную программу [14]. Несомненно, такой подход может обеспечивать высокую точность данных из-за большего количества автоматизированно исследуемых образцов, однако эти методы являются узкоспециализированными, поэтому использование их для широкого спектра объектов ограничено. Кроме того, эти методы не применимы для анализов сложноорганизованных эксплантатов и целых органов растений.

Предлагаемый нами экспресс-метод анализа флуоресценции листьев не требует каких-либо специализированных систем и дорогостоящего программного обеспечения. Он может быть применим для широкого спектра растительных объектов, его использование возможно практически в любой лаборатории и ограничено лишь наличием флуоресцентного микроскопа хотя бы начального уровня. Кроме того, предлагаемый нами метод может получить применение для использования флуоресцирующего белка в качестве количественного репортера, что особенно актуально при использовании генетических конструкций, в которых целевой ген слит с репортерным геном *GFP*. Так, использование *GFP* позволяет дать оценку новых векторов, предназначенных для гетерологичной экспрессии других белков или для изучения активности промоторов [15, 16].

В практике экспресс-методов наиболее ценным является быстрое получение искомым данных. Предлагаемый нами подход не требует последующей

обработки и графического редактирования микрофотографий, но при этом позволяет с высокой степенью достоверности получить информацию об экспрессии репортерного гена.

Для первичного скрининга растений-регенерантов картофеля после трансформации с использованием маркерных генов — например, *NPTII* — традиционно используется отбор форм, укоренившихся на селективных средах, с последующим применением ПЦР-анализа, Нозерн-гибридизации или ОТ-ПЦР. Процесс размножения и подрастывания регенерантов с целью получить вегетативную массу, достаточную для проведения биохимического анализа, занимает 2–3 месяца, трудоемок и требует материальных затрат на реактивы и обеспечение условий культивирования. Кроме того, после двухмесячного дорастивания регенерантов для получения необходимой биомассы последую-

щая процедура выделения и анализа целевой ДНК и РНК также требует больших затрат труда, времени и реактивов. Таким образом, время, затрачиваемое на скрининг растений-трансформантов, при традиционном методическом подходе может составлять до полугода. Использование предложенного нами экспресс-метода позволяет проводить скрининг линий по флуоресценции белка на стадии первичного регенеранта в пробирочной культуре, не прибегая к сложным молекулярно-биологическим методам, тем самым ускоряя и облегчая создание новых форм (хозяйственно-ценных растений) картофеля с заданными полезными признаками.

Авторы благодарят проф. В.В. Хаусвирта из Университета Флориды за плазмиду pTR-UF2 и канд. биол. наук Г.Н. Ралдугину за предоставление растений табака.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D.W. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells // *Plant J.* 1995. Vol. 8. N 5. P. 777–784.
2. Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R., Boyd A.E., Gross L.A., Tsien R.Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1995. Vol. 20. N 11. P. 448–455.
3. Patterson G.H., Knobel S.M., Sharif W.D., Kain S.R., Piston D.W. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescent microscopy // *Biophys. J.* 1997. Vol. 73. N 5. P. 2782–2790.
4. Shaw S.L., Ehrhardt D.W. Smaller, faster, brighter: advances in optical imaging of living plant cells // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. Vol. 64. P. 351–375.
5. Richards H.A., Halfhill M.D., Millwood R.J., Stewart Jr C.N. Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants // *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 22. P. 117–121.
6. Mazur B.J., Chui C.F. Sequence of a genomic DNA clone for the small subunit of ribulose bis-phosphate carboxylase-oxygenase from tobacco // *Nucleic Acids Res.* 1985. Vol. 13. N 7. P. 2373–2386.
7. Zolotukhin S., Potter M., Hauswirth W.W., Guy J., Muzyczka N. A “humanized” green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells // *J. Virol.* 1996. Vol. 70. N 7. P. 4646–4654.
8. Юрьева Н.О., Егоров Ц.А., Беляев Д.В., Соболюкова Г.И., Деревягина М.К., Рогожин Е.А., Терешонок Д.В., Мелешин А.А., Шелухин П.Г. Способ получения форм картофеля *in vitro*, устойчивых к возбудителям фитофтороза и альтернариоза. Патент РФ № 2524424 от 14.06.2014. Опубликовано: 27.07.2014. Бюл. № 21.
9. Murasige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–497.
10. Moller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues // *Nucleic Acids Res.* 1992. Vol. 20. N 22. P. 6115–6116.
11. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 pp.
12. Herrera-Estrella L., Van den Broeck G., Maenhaut R., Van Montagu M., Schell J., Timko M., Cashmore A. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into *Nicotiana tabacum* using a Ti plasmid vector // *Nature.* 1984. Vol. 310. N 5973. P. 115–120.
13. Chiu W., Niwa Y., Zeng W., Hirano T., Kobayashi H., Sheen J. Engineered GFP as a vital reporter in plants // *J. Curr Biol.* 1996. Vol. 6. N 3. P. 325–330.
14. Finer J.J., Beck S.L., Buenrostro-Nava M.T., Chi Y., Ling P.P. Monitoring gene expression in plant tissues. Using green fluorescent protein with automated image collection and analysis // *Plan tissue culture engineering. Focus on biotechnology*, vol 6 / Eds. S.D. Gupta and Y. Ibaraki. Dordrecht: Springer, 2006. P. 31–46.
15. Haikonen T., Rajamaki M.L., Valkonen J.P. Improved silencing suppression and enhanced heterologous protein expression are achieved using an engineered viral helper component proteinase // *J. Virol. Methods.* 2013. Vol. 193. N 2. P. 687–692.
16. Naylor L.H. Reporter gene technology: the future looks bright // *Biochem. Pharmacol.* 1999. Vol. 58. N. 5. P. 749–757.

Поступила в редакцию
22.12.2018

Принята к печати
21.03.2018

METHODS

AN ASSAY FOR EXPRESS SCREENING OF POTATO TRANSFORMANTS
BY GFP FLUORESCENCE

N.O. Yuorieva^{1,}, A.S. Voronkov^{1,2}, D.V. Tereshonok¹,
E.S. Osipova¹, E.V. Platonova¹, D.V. Belyaev¹*

¹*K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences,
Botanicheskaya ul. 35, Moscow, 127276, Russia;*

²*State Humanitarian-Technological University, Zelenaya ul. 22, Orekhovo-Zuyevo, 142611, Russia
e-mail: yuorieva@mail.ru

An express assay for primary screening of potato transformants by their GFP fluorescence intensities is developed. In comparison to the widely used methods of transgenic plant screening by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-Time RT-PCR) or Northern-blotting, the GFP fluorescence assay needs no expensive reagents and takes less time. This approach may allow to carry out nondestructive screening of the primary transgenic regenerants which can be further grown and used. To prove this assay reliability, the expression of the modified *GFP (hGFP)* gene in the leaves of transgenic potato (cv. "Skoroplodny") plants, determined by its mRNA accumulation, was compared to GFP fluorescence intensity in the micro-samples of aseptic plant leaves. The strong correlation between the results of these two methods is the evidence of positive dependence of GFP fluorescence intensity on the target mRNA content.

Keywords: *GFP, genetic engineering, fluorescence intensity, potato, screening, primary regenerants*

Сведения об авторах

Юрьева Наталия Олеговна — канд. с-х. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-499-678-54-00; e-mail: yuorieva@mail.ru

Воронков Александр Сергеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН; доц. Государственного гуманитарно-технологического университета. Тел.: 8-499-678-53-18; e-mail: voronkov_as@mail.ru

Терешонок Дмитрий Викторович — канд. биол. наук, науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-499-678-53-34; e-mail: diman_ter_vi@mail.ru

Осипова Екатерина Сергеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-499-678-54-00; e-mail: gsc@ippras.ru

Платонова Екатерина Владимировна — мл. науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-499-678-53-02.

Беляев Денис Вадимович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева, РАН. Тел.: 8-499-678-53-02; e-mail: bdv@ippras.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.26

ДИАТОМОВЫЕ ВОДОРΟΣЛИ ИЗ ТОРФЯНОГО ОТЛОЖЕНИЯ ОСТРОВА ШЕМЬЯ
(АЛЕУТСКИЕ ОСТРОВА, США)А.А. Неплюхина¹, Д.А. Чудаев¹, О.А. Крылович², М.А. Гололобова^{1,*}¹*Кафедра микологии и альгологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*²*Институт проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский просп., д. 33
e-mail: gololobovama@mail.ru

Представлены результаты изучения диатомовых водорослей из торфяного отложения голоцена с острова Шемья (Алеутские острова, США). В работе были исследованы торфяные отложения мощностью 385 см (формирование отложения началось более 9500 лет назад). Было обнаружено 67 таксонов диатомовых водорослей, принадлежащих к 31 роду, 17 семействам, 8 порядкам и 3 классам. По результатам таксономического и эколого-географического анализа большинство таксонов принадлежит к порядку Naviculales и семейству Pinnulariaceae, причем относится к бентосным космополитным организмам. Выявлены формы с разной степенью сохранности панцирей, лучше всего в отложении сохраняются представители центрических диатомовых. Особый интерес представляет факт растворения панцирей диатомовых водорослей в водоеме с предположительно пониженным значением pH. Изучены закономерности изменения относительного обилия видов с глубиной отложения, выделено несколько зон с характерными для них комплексами диатомей. Анализ распределения видов диатомовых водорослей в колонке показал, что, вероятно, на месте отложения в прошлом существовал неглубокий олиготрофный водоем с относительно низким значением pH. Уровень воды в водоеме колебался в разные периоды времени, однако трофность водоема не изменялась на всем протяжении его существования.

Ключевые слова: диатомовые, голоцен, диатомовый анализ, Аляска, остров Шемья, торфяное отложение, палеореконструкция

Диатомовые — широко распространенная группа водорослей, представители которой заселяют как водные, так и наземные экосистемы. Разные виды диатомовых водорослей предпочитают определенные экологические параметры среды, что позволяет использовать их в качестве биоиндикаторов. Кроме того, кремнеземные панцири диатомовых сохраняются в донных отложениях различных водоемов. Таким образом, определенная структура и видовой состав диатомового сообщества являются отражением экологических и климатических условий, присущих времени, в котором сообщество сформировалось. Приведенные особенности данной группы водорослей позволяют проводить исследования с целью изучения видового состава сохранившегося в донных отложениях сообщества, а также проводить реконструкции состояния и изменений окружающей среды в прошлом.

В настоящее время диатомовые водоросли северо-запада Америки активно изучаются, однако диатомовые водоросли полуострова Аляски и гряды Алеутских островов недостаточно исследованы. Есть всего несколько работ, в которых приведены данные о видовом составе диатомей для некоторых частей Аляски [1–3]. Стоит отметить, что исследова-

ний современных и ископаемых диатомей острова Шемья до настоящего времени не проводилось. В связи с этим в настоящей работе было изучено таксономическое разнообразие и проведен диатомовый анализ торфяного отложения с острова Шемья.

Материалы и методы

Алеутские острова (США) представляют собой архипелаг на севере Тихого океана, имеющий вулканическое происхождение и разделенный на 6 больших групп островов, которые простираются дугой от побережья полуострова Аляски (США) к основанию полуострова Камчатка (Россия); с севера архипелаг ограничен Беринговым морем. Остров Шемья (52°43' с.ш., 174°07' в.д.) — один из трех островов, входящих в состав группы Алеутских островов, названной Семичи.

Материалом для данного исследования послужила колонка торфа общей мощностью 385 см, отобранная из точки McDonald Point (восточная часть острова Шемья) российскими учеными из ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН под руководством А.Б. Савинецкого. Формирование отложений началось более 9500 лет назад, что подтверждает ра-

диоуглеродная метка (9547 ± 128 лет назад) [4]. Колонка была разделена на слои по 5 см; всего было получено 76 образцов. Очистку образцов от органического содержимого проводили по методике, изложенной в руководстве Келли с соавт. [5].

Для изучения материала при помощи световой микроскопии очищенные панцири диатомовых заключали в анилино-формальдегидную смолу Эляшева; для проведения исследований при помощи электронной микроскопии каплю суспензии с панцирями диатомей высушивали на кусочке алюминиевой фольги, монтировали на алюминиевый столик при помощи двустороннего электропроводного скотча, а затем покрывали тонким слоем Au-Pd или Ag-Pd в ионном распылителе IB-3 (Giko Engineering, Япония). Исследование препаратов проводили с использованием световых микроскопов Leica DM2500 и Leica DM500 (Leica Microsystems, Германия) и электронного сканирующего микроскопа JSM-6380 (Jeol, Япония). Для получения фотографий панцирей в изучаемых препаратах использовались цифровые камеры ICC50 HD и DFC 495 (Leica Microsystems, Германия). Для определения видов диатомовых водорослей был использован ряд зарубежных определителей [6–10]. Оценку частоты встречаемости видов диатомовых водорослей проводили по методике, предложенной Баттерби [11]. Цитирование авторов названий таксонов приведено в соответствии с Международным индексом названий растений [12]. Обработку полученных снимков проводили в программе ImageJ и графическом редакторе Adobe Photoshop 7.0. Построение графика, отражающего послойное относительное обилие видов, проводили в программах Tilia и TGView. Для статистической обработки данных и построения диаграмм использовались программы Microsoft Excel, Statistica (StatSoft) и PAST3. Используемые в работе материалы депонированы в коллекцию диатомовых водорослей кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (пробы № 588–663).

Результаты и обсуждение

Таксономический анализ комплекса диатомовых водорослей из торфяного отложения острова Шемья. В результате исследования во всех 76 образцах было обнаружено 67 таксонов диатомовых водорослей видового и внутривидового рангов (из них 13 таксонов идентифицированы только до уровня рода). Согласно системе, описанной в книге Раунда и соавт. [13], таксоны принадлежат к 31 роду, 17 семействам, 8 порядкам и 3 классам. Из них к центрическим диатомовым водорослям относится 1 род (*Aulacoseira*) с 3 видами; к бесшовным пеннатным — 9 видов и разновидностей, относящихся к 5 родам (*Fragilaria*, *Pseudostaurosira*, *Stauroforma*, *Staurosira* и *Staurosirella*); к шовным пеннатным — 55 таксонов видового и внутривидового рангов, относящихся к 25 родам. Наибольшее число видов и разновидностей относится к классу Bacillariophyceae

(55), порядку Naviculales (35), семейству Pinnulariaceae (12). Анализируя общее число обнаруженных во всех образцах таксонов, мы заключили, что род *Pinnularia* демонстрирует наибольшее видовое богатство (в нем отмечено 11 видов, в том числе был описан один новый для науки вид — *P. arkadii* [14]).

Список таксонов диатомовых водорослей, найденных в изученном отложении. Ниже мы приводим список таксонов в алфавитном порядке: *Amphora* sp., *Aulacoseira canadensis* (Hust.) Simonsen, *A. crassipunctata* Krammer, *A. italica* (Ehrenb.) Simonsen, *Caloneis* sp., *Cavinula cocconeiformis* (Grev.) D.G. Mann & Stickle f. *cocconeiformis*, *C. cocconeiformis* f. *elliptica* (Hust.) Lange-Bert., *C. davisiae* L.Bahls, *C. pseudoscutiformis* (Hust.) D.G. Mann & Stickle, *Chamaepinnularia krookiformis* (Krammer) Lange-Bert. & Krammer, *C. krookii* (Grunow) Lange-Bert. & Krammer, *Cocconeis placentula* Ehrenb. sensu lato, *C. scutellum* Ehrenb. sensu lato, *Cosmioneis pusilla* (W. Sm.) D.G. Mann & Stickle, *Cymbella mexicana* (Ehrenb.) Cleve, *Cymbopileura* sp., *Diadema laevissima* (Cleve) D.G. Mann, *D. mochalovae* M. Potapova, *Diadema* sp., *Diploneis interrupta* (Kütz.) Cleve, *D. krammeri* Lange-Bert. & E. Reichardt, *D. pseudovalis* Hust., *Encyonema minutum* (Hilse) D.G. Mann, *E. silesiacum* (Bleisch) D.G. Mann, *Encyonema* sp., *Encyonopsis* sp., *Epithemia sorex* Kütz., *Eunotia bidens* Ehrenb., *E. curtagrunowii* Nörpel-Schempp & Lange-Bert., *E. diadema* Ehrenb., *E. minor* (Kütz.) Grunow, *E. tetraodon* Ehrenb., *Eunotia* sp., *Fragilaria mesolepta* Rabenh., *Frustulia* sp., *Luticola arctica* Levkov & Metzeltin, *L. gaussii* (Heiden) D.G. Mann, *L. rotunda* Solak & Levkov, *Navicula eidrigiana* J.R. Carter, *N. rhynchocephala* Kütz., *Navicula* sp., *Neidium* sp., *Pinnularia arkadii* Nepliyukhina, Chudaev & Gololobova, *P. borealis* Ehrenb., *P. cf. islandica* Østrup, *P. cf. renata* Krammer, *P. inconstans* Ant.Mayer, *P. intermedia* (Lagerst.) Cleve, *P. lagerstedtii* (Cleve) A.Cleve, *P. lata* (Bréb.) W.Sm., *P. obscura* Krasske, *P. pseudoparva* Krammer & Lange-Bert., *Pinnularia* sp., *Planolithidium frequentissimum* (Lange-Bert.) Lange-Bert., *Platessa lutheri* (Hust.) M.Potapova, *Psammothidium* sp., *Pseudostaurosira brevistriata* (Grunow) D.M.Williams & Round, *Rexlowea navicularis* (Ehrenb.) Kociolek & E.W. Thomas, *Rhopalodia gibba* (Ehrenb.) O. Müll., *Stauroforma exiguiiformis* (Lange-Bert.) Flower, V.J. Jones & Round, *Stauroneis* sp., *Staurosira construens* Ehrenb. var. *construens*, *S. construens* var. *exigua* (W.Sm.) H. Kobayasi, *S. construens* var. *venter* (Ehrenb.) P.B. Hamilton, *Staurosirella lapponica* (Grunow) D.M. Williams & Round, *S. martyi* (Hérub.) E. Morales & Manoylov, *S. minuta* E. Morales & Edlund.

Сохранность диатомовых водорослей из торфяного отложения острова Шемья. Как было сказано выше, в результате исследований было определено 30 родов диатомовых водорослей. Среди них отмечены виды, обладающие разной степенью сохранности панциря, в связи с чем идентификация их до видового уровня сопряжена с определенными сложностями. С одной стороны, выявлены виды

с более тонким панцирем: панцири этих видов преимущественно растворяются, однако подлежат идентификации до рода (например, *Cavinula* (рис. 1А), *Stauroforma*). С другой стороны, отмечены виды, имеющие более грубые панцири, которые, очевидно, претерпевали механическое воздействие среды: эти виды представлены обломками, что также затрудняет их определение до видового уровня (например, многие виды рода *Eunotia*) (рис. 1Б). Оказалось, что наилучшей сохранностью обладают представители центрических диатомовых водорослей (рис. 1В). По-видимому, это может быть объяснено, во-первых, значительно большим содержанием кремнезема в панцире (по сравнению с видами пеннатных диатомей); во-вторых, их аутоэкологией: являясь планктонными формами, они принимают меньшее участие в придонных тафономических процессах. На наш взгляд, интересным фактом является то, что мы наблюдаем растворение панцирей диатомовых водорослей, которые развивались в водоеме с предположительно пониженными значениями pH, тогда как по литературным данным, наоборот, панцири диатомей растворяются при повышенных значениях pH [15–17]. Видимо, этот вопрос требует дальнейшего изучения. Таким образом, на основании полученных данных мы не можем сделать вывод о связи степени сохранности с каким-то конкретным фактором окружающей среды. Вероятно, нужно учитывать комплексное воздействие таких факторов, как показатель кислотности вод, общий уровень минерализации и наличие различных геологических процессов. В целом можно заключить, что створки диатомовых водорослей из исследованного торфяного отложения обладают плохой сохранностью, что во многих случаях затрудняет их точную идентификацию.

Эколого-географический анализ комплекса диатомовых водорослей из торфяного отложения острова Шемья. Были проведены экологический и географический анализы диатомовых водорослей из исследованного отложения на основании литературных данных об экологических предпочтениях и распространении видов [18, 19]. В результате мы сделали вывод, что большинство обнаруженных в отложениях таксонов являются космополитами

по своему распространению, однако выявлены также и бореальные виды. По принадлежности к экологической группе большинство выявленных видов являются бентосными организмами, в то время как планктонные виды встречаются в материале единично: среди бесшовных пеннатных диатомей это *Fragilaria mesolepta* и *Pseudostaurosira brevistriata*, среди центрических — виды рода *Aulacoseira*. Отметим, что все виды, для которых показана наибольшая частота встречаемости, являются бентосными формами. Большинство таксонов относится к видам, предпочитающим среды с пониженным pH (ацидобионтам и ацидофилам) и низкой минерализацией. Среди доминантов это виды родов *Stauroforma*, *Pinnularia*, *Diademsis* и *Eunotia*. В заключение хотелось бы отметить, что в исследованном материале нами единично обнаружен морской вид *Cocconeis scutellum* (в слое 215–220 см). Помимо этого, встретился обломок створки морской центрической диатомеи *Arachnodiscus* sp. Скорее всего, эти единичные заносы морских видов связаны с близостью расположения торфяника к морю. Таким образом, по данным проведенного экологического анализа можно сделать вывод, согласно которому на месте исследованного разреза в раннем голоцене (9550 лет назад), по-видимому, произошло формирование мелководного заболоченного олиготрофного водоема с относительно низким значением pH.

Анализ послойного распределения видов диатомовых водорослей в колонке. Были проведены исследования послойного распределения диатомовых водорослей в колонке торфяного отложения. Наибольшее число видов диатомей было отмечено в слое 300–305 см (26 видов), наименьшее (по 1 виду) — в интервале 210–215 см. В интервале 180–210 см створки диатомовых водорослей не были обнаружены. Анализ относительного обилия видов показал, что наиболее часто встречаемыми таксонами являются роды *Stauroforma*, *Pinnularia*, *Diademsis*, *Eunotia* и *Cocconeis*. Были изучены закономерности изменения относительного обилия видов с изменением глубины торфяного отложения. На основании полученных данных мы выделили несколько зон, отличающихся друг от друга характерными комплексами диатомей.

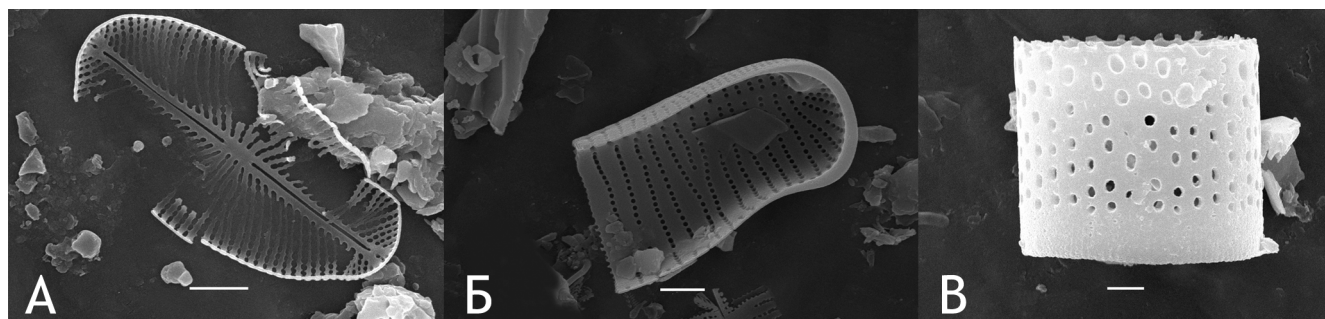


Рис. 1. Панцири диатомовых водорослей разной сохранности. А — сильнорастворенный панцирь *Cavinula cocconeiformes* f. *elliptica* (Hust.) Lange-Bert.; Б — обломок створки *Eunotia* sp.; В — панцирь *Aulacoseira crassipunctata* Krammer хорошей сохранности. Масштабный отрезок равен 2 мкм

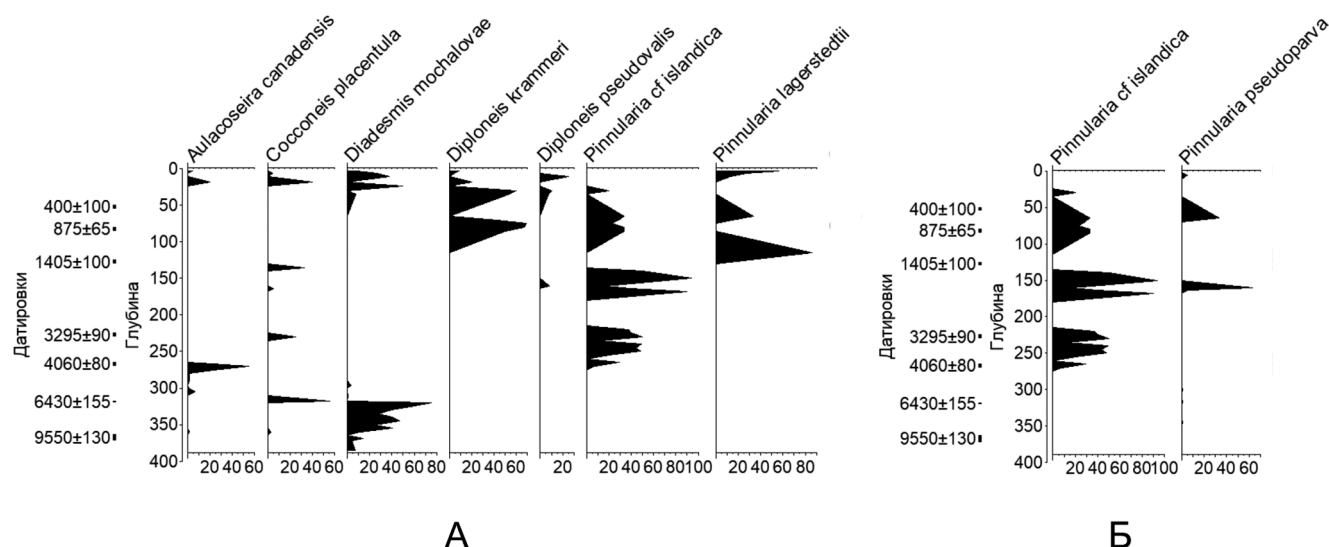


Рис. 2. Относительное обилие доминирующих видов диатомовых водорослей в торфяном отложении McDonald Point (по слоям).

А — первая зона, Б — третья зона.

Ось абсцисс — относительно обилие таксона (%), ось ординат — глубина отложения (см)

В первой зоне (0–80 см, до 700 лет назад) отмечено доминирование таких видов, как *Aulacoseira canadensis*, *Cocconeis placentula*, *Diadismis mochalovae*, *Diploneis krammeri*, *D. pseudovalis*, *Pinnularia* cf. *islandica* и *P. lagerstedtii* (рис. 2А).

Во второй (80–135 см, 700–1400 лет назад) и четвертой (170–220 см, 2125–3000 лет назад) зонах створки диатомей встречаются единично и часто представлены обломками, не поддающимися точной видовой идентификации.

В третьей зоне (135–170 см, 1400–2125 лет назад) наблюдается доминирование видов рода *Pinnularia*, а именно *P. cf. islandica* и *P. pseudoparva* (рис. 2Б).

Для пятой зоны (220–270 см, 3000–3925 лет назад) характерно увеличение числа видов и их относительного обилия. Доминанты представлены видами рода *Pinnularia*; наибольшее относительное обилие характерно для *P. inconstans*, а также целого комплекса других видов этого рода (*P. cf. islandica*, *P. intermedia*, *P. arkadii*) (рис. 3А).

Шестая зона (270–380 см, 3925–9550 лет назад) характеризуется наибольшим видовым богатством и относительным обилием видов. Среди доминантов отмечены *Diadismis laevisima*, *D. mochalovae*, *Eunotia curta-grunowii*, *Pinnularia borealis*, *P. lata*, *Staurosira forma exiguiformis* и виды рода *Staurosira* (рис. 3Б).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что наибольшее видовое разнообразие и наибольшая относительная численность видов наблюдаются на глубине от 250 см до 360 см.

Для выяснения меры разнообразия в исследованном торфяном отложении для всех слоев был рассчитан индекс Шеннона. Оказалось, что значение индекса Шеннона варьирует в диапазоне от 0,23 до 1,90, коэффициент корреляции Пирсона составляет 13%, что меньше критического (26%). Таким образом, никаких закономерностей, связанных с глубиной залегания слоев, выявлено не было. Это говорит о том, что степень равномерности распре-

деления видового разнообразия со временем не изменялась. Следовательно, можно сделать вывод, что существовавший на месте торфяника водоем не подвергался эвтрофикации, а имел постоянную трофность (был олиготрофным) на протяжении всего времени своего существования, что хорошо согласуется с данными проведенного экологического анализа (см. выше).

На основании всего вышесказанного можно предположить, что примерно 9500 лет назад на материнской породе начал формироваться неглубокий олиготрофный водоем. Примерно 6000 лет назад водоем стал более глубоким (судя по обилию планктонных форм, в частности, видов рода *Aulacoseira*, с хорошо развитой растительностью (судя по обилию эпифитных форм, например, *C. placentula* и *S. exiguiformis*), а затем обмелел (примерно 4000 лет назад). Можно предположить, что в промежуток времени примерно 4000–1500 лет назад водоем был относительно мелким, т.к. в этой зоне не наблюдается планктонных и эпифитных форм. В данный период доминировали представители рода *Pinnularia*, многие виды которых развиваются в очень мелких водоемах и на влажных почвах. Примерно 1500 лет назад водоем, по-видимому, стал снова заполняться водой (по крайней мере, стал более глубоководным), т.к. в этом промежутке снова появляются планктонные и эпифитные формы. Видимо, колебание уровня воды водоема было связано с чередованием более сухих и влажных периодов в голоцене, а, возможно, и с колебанием температуры.

Таким образом, в результате исследования диатомовых водорослей торфяного отложения острова Шемья (Алеутские острова, США) обнаружено 67 таксонов диатомовых водорослей видового и внутривидового рангов, относящихся к 31 роду, 17 семействам, 8 порядкам и 3 классам. По данным изучения диатомовых водорослей при помощи сканирующего электронного микроскопа можно сказать, что створки диатомей из исследованного

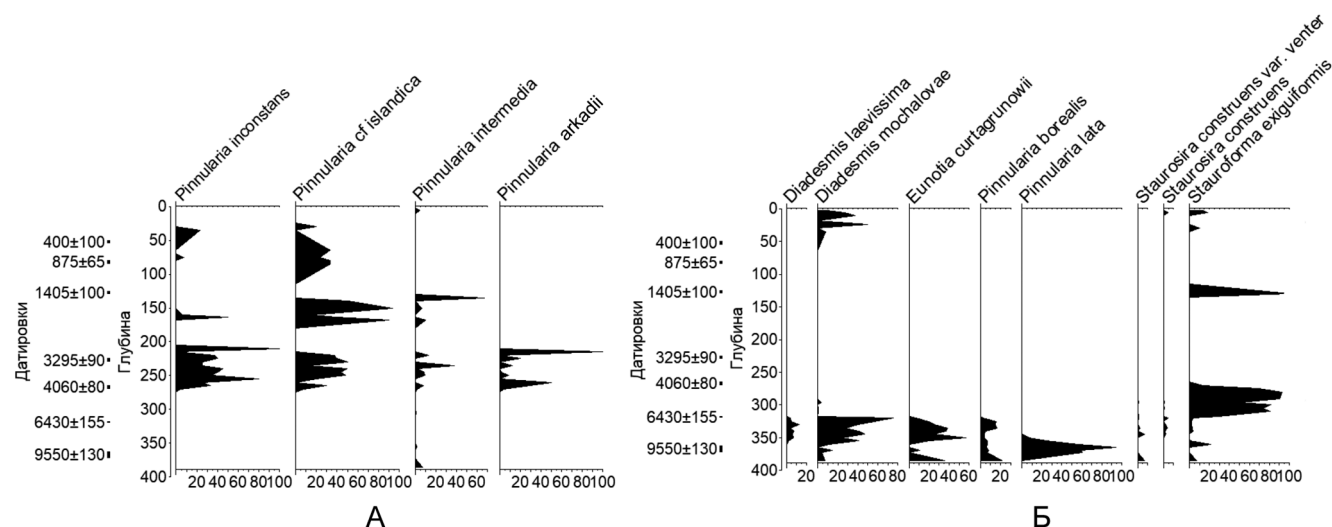


Рис. 3. Относительное обилие доминирующих видов диатомовых водорослей в торфяном отложении McDonald Point (по слоям). А — пятая зона, Б — шестая зона. Ось абсцисс — относительно обилие таксона (%), ось ординат — глубина отложения (см)

торфяного отложения обладают, в целом, плохой сохранностью. Результат географического анализа показал, что большинство таксонов являются космополитами по своему распространению; по результатам экологического анализа большинство отмеченных видов являются бентосными организмами, предпочитающими водоемы с пониженным рН и низкой минерализацией. Анализ послойного распределения видов диатомовых водорослей в колонке позволил предположить, что, по-видимому, на месте отложения в прошлом существовал неглубокий олиготрофный водоем с относительно низким значением рН, причем уровень воды колебался в разные периоды времени; при этом уровень трофности не менялся на всем протяжении существования водоема.

Авторы выражают глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории исторической экологии

Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН, в частности, А.Б. Савинцеву и Б.Ф. Хасанову, за предоставленный материал и дружескую поддержку. Большое спасибо сотруднику кафедры высших растений биологического факультета МГУ Е.Э. Северовой за помощь в освоении программ Tilia и TGView. Выражаем также благодарность сотрудникам центра коллективного пользования (межкафедральная лаборатория электронной микроскопии биологического факультета МГУ) за помощь в работе на сканирующем электронном микроскопе.

Работа Чудаева Д.А., связанная с идентификацией образцов и депонированием материалов в коллекцию, выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029). Остальные работы выполнены в рамках Государственного задания, части 2 п. 01 10 (тема № AAAA-A16-116021660085-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foged N. Diatoms found in a bottom sediment sample from a small deep lake on the northern slope, Alaska // Nova Hedwigia. 1971. Band 21. Heft 1–4. P. 923–1035.
2. Foged N. Diatoms in Alaska. Bibliotheca Phycologica. Band 53. Vaduz: J. Cramer, 1981. 317 pp.
3. Hein M.K. Flora of Adak Island, Alaska: Bacillariophyceae (Diatoms). Bibliotheca Diatomologica. Band 21. Berlin, Stuttgart: J. Cramer, 1990. 133 pp.
4. Savinetsky A.B., Khassanov B.F., West D.L., Kiseleva N.K., Krylovich O.A. Nitrogen isotope composition of peat samples as a proxy for determining human colonization of islands // Arctic Anthropol. 2014. Vol. 51. N 1. P. 78–85.
5. Kelly M.G., Adams C., Graves A.C. The trophic diatom index: A user's manual. Bristol: Environmental Agency, 2001. 135 pp.
6. Hustedt F. Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz mit Berücksichtigung der übrigen Länder

Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. Dr. L. Rabenhorst's Kryptogramen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. 2. Teil. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1959. 845 s.

7. Krammer K. The genus *Pinnularia*. Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats. Vol. 1. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2000. 703 pp.

8. Krammer K., Lange-Bertalot H. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Band 2/3. Stuttgart, Jena: Gustav Fischer Verlag, 1991. 576 s.

9. Lange-Bertalot H. *Navicula* sensu stricto, 10 genera separated from *Navicula* sensu lato, *Frustulia*. Diatoms of Europe: diatoms of the European inland waters and comparable habitats. Vol. 2. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2001. 526 pp.

10. Lange-Bertalot H., Båk M., Witkowski A., Tagliaventi N. *Eunotia* and some related genera. Diatoms of Europe: dia-

toms of the European inland waters and comparable habitats. Vol. 6. Ruggell: A.R.G. Gantner Verlag K.G., 2011. 747 pp.

11. *Battarbee R.W.* Diatom analysis // *Handbook of Holocene palaeoecology and palaeohydrology* / Ed. B.E. Berglund. N.Y., London: John Wiley & Sons Ltd., 1986. P. 527–570.

12. *The International Plant Names Index* [Электронный ресурс]. 2015. Дата обновления: 23.04.2015. URL: <http://www.ipni.org> (дата обращения: 21.02.2018).

13. *Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G.* Diatoms: biology and morphology of the genera. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1990. 747 pp.

14. *Nepluykhina A.A., Chudaev D.A., Gololobova M.A.* *Pinnularia arkadii* sp. nov., a new diatom (Naviculales, Bacillariophyceae) from Shemya Island, Alaska, USA // *Новости сист. низш. раст.* 2018. Т. 52. Ч. 1. P. 83–89.

15. *Barker P., Fontes J.C., Gasse F., Druart J.C.* Experimental dissolution of diatom silica in concentrated salt solutions and implications for paleoenvironmental reconstruction // *Limnol. Oceanogr.* 1994. Vol. 39. N 1. P. 99–110.

16. *Hurd D.C., Theyer F.* Changes in the physical and chemical properties of biogenic silica from the central equatorial Pacific. Part II. Refractive index, density, and water content of acid-cleaned samples // *Am. J. Sci.* 1977. Vol. 277. N 9. P. 1168–1202.

17. *McMinn A.* Comparison of diatom preservation between oxic and anoxic basins in Ellis Fjord, Antarctica // *Diatom Res.* 1995. Vol. 10. N 1. P. 145–151.

18. *Баринаева С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В.* Эколого-географическая картотека водорослей. М.: Природа, 2000. 150 с.

19. *Van Dam H., Mertens A., Sinkeldam J.* A coded checklist and ecological indicator values of freshwater diatoms from the Netherlands // *Netherlands J. Aquatic Ecol.* 1994. Vol. 28. N 1. P. 117–133.

Поступила в редакцию
08.12.2017

Принята к печати
20.03.2018

MYCOLOGY AND ALGOLOGY

DIATOMS OF THE PEATBAG SEDIMENTS FROM SHEMA ISLAND (ALEUTIAN ISLANDS, USA)

A.A. Nepluykhina¹, D.A. Chudaev¹, O.A. Krylovich², M.A. Gololobova^{1,}*

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

²*A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russia, 119071, Moscow, Leninsky Prospekt 33*
**e-mail: gololobovama@mail.ru*

Results of a study of diatoms from Holocene peatbog sediments from Shemya Island (Aleutian Islands, USA) are presented. The column of peat sediments (385 cm depth) was investigated (the formation of peat sediments began more than 9500 years ago). Sixty-seven taxa of 31 genera, 17 families, 8 orders and 3 classes were identified. According to results of taxonomical and ecological analyses most taxa belong to the order Naviculales and family Pinnulariaceae and are benthic organisms with cosmopolitan distribution. Forms with different quality of frustule preservation were revealed. Centric diatoms demonstrate the best preservation in sediment. Of special interest is the dissolution of frustules in water body with presumably low pH value. Pattern of species relative abundance dynamics were studied. Several zones with characteristic diatom complexes are distinguished. Analysis of distribution of diatoms in the column showed that, apparently, in the past there was a shallow oligotrophic reservoir with a relatively low pH. Water level changed occasionally, but trophic level did not change over the period of the reservoir existence.

Keywords: *diatoms, Holocene, diatom analysis, Alaska, Shemya, peatbog sediment, paleo-reconstruction*

Сведения об авторах

Неплюхина Алиса Андреевна — студентка кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: taviliss@gmail.com

Чудаев Дмитрий Алексеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: chudaev@list.ru

Крылович Ольга Александровна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории исторической экологии института проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. Тел.: 8-495-633-1417; e-mail: okrylovich@gmail.com

Гололобова Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64; e-mail: gololobovama@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.32

СОВМЕСТНОЕ ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
ГИСТОНА H1 И НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК
НА СТРУКТУРУ ХРОМАТОСОМЫ: АНАЛИЗ МЕТОДАМИ
МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Т.К. Горковец, Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан*

*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: alex@intbio.org*

Хроматосома, состоящая из нуклеосомного ядра, линкерных участков ДНК и линкерного гистона (ЛГ), является важным структурным элементом хроматина. Существует два экспериментально подтвержденных типа связывания ЛГ с нуклеосомой и линкерной ДНК, которые различаются своей геометрией — связывание “на диаде” и “вне диады”. Показано, что на тип связывания гистона и конформацию хроматосомы влияет аминокислотная последовательность ЛГ. Однако при связывании ЛГ изменяется в том числе и геометрия линкерной ДНК. Взаимовлияние этих факторов и молекулярные основы, определяющие тип связывания ЛГ и нуклеосомы, остаются неясными. В данной статье мы применили методы молекулярного моделирования, включая моделирование по гомологии, анализ атом-атомных взаимодействий и расчет энергии деформации ДНК, для изучения совместного влияния аминокислотной последовательности ЛГ и нуклеотидной последовательности ДНК на конфигурацию хроматосомы. Были проанализированы известные кристаллические и ЯМР-структуры хроматосомы на предмет атом-атомных взаимодействий ЛГ и ДНК, а также энергии деформации ДНК в этих структурах для различных последовательностей ДНК. Для различных вариантов ЛГ H1 анализ проводился с использованием методов моделирования по гомологии. Были обнаружены зависящие от последовательности различия в энергии изгиба линкерной ДНК для двух различных конформаций хроматосомы, а также предложены нуклеотидные последовательности, предпочтительные для этих структур. В результате анализа было показано, что нуклеотидная последовательность ДНК наряду с аминокислотной последовательностью ЛГ оказывает влияние на тип связывания с нуклеосомой. Сформулированы гипотезы для экспериментальной проверки, согласно которым тип связывания ЛГ может меняться при изменении нуклеотидной последовательности ДНК.

Ключевые слова: *хроматосома, нуклеосома, хроматин, линкерный гистон, линкерная ДНК, гибкость ДНК, моделирование по гомологии*

Структурными единицами хроматина являются нуклеосомы — ДНК-белковые комплексы, содержащие гистоны. Ядро нуклеосомы образовано октамером гистонов H2A, H2B, H3 и H4, вокруг которого располагается двойная спираль ДНК длиной около 146 пар оснований [1]. Нуклеосома обладает осью псевдосимметрии второго порядка, называемой также диадной осью (рисунок, А). Эта ось проходит через центр нуклеосомной ДНК, называемый диадой.

Следующим уровнем компактизации является хроматосома [2], образованная при связывании линкерного гистона (ЛГ) H1 и нуклеосомы, включающей линкерные участки ДНК, выходящие за пределы ядра нуклеосомы (рисунок, А). Таким образом, в хроматосому входит октамер гистонов H2A, H2B, H3 и H4, нуклеосомная ДНК, ЛГ и линкерные участки ДНК.

ЛГ представлены во многих эукариотических организмах несколькими вариантами, различающимися длиной аминокислотной последовательности и ее составом [3]. В различных клетках и тканях могут экспрессироваться различные варианты ЛГ. Как правило, у наиболее просто устроенных организмов встречается всего один вариант ЛГ, тогда как, например, у человека известно 11 вариантов [4], некоторые из которых экспрессируются только в половых клетках. Также стоит отметить, что присутствие того или иного варианта ЛГ зависит не только от типа клетки, но и от стадии клеточного цикла, в которой она находится. В дальнейшем под термином “ЛГ” мы будем понимать все линкерные гистоны, не принимая во внимание их принадлежность к конкретному виду или типу.

Большая часть ЛГ содержит около 200 аминокислотных остатков. ЛГ состоят из трех доменов: короткий и неупорядоченный N-конец, за которым

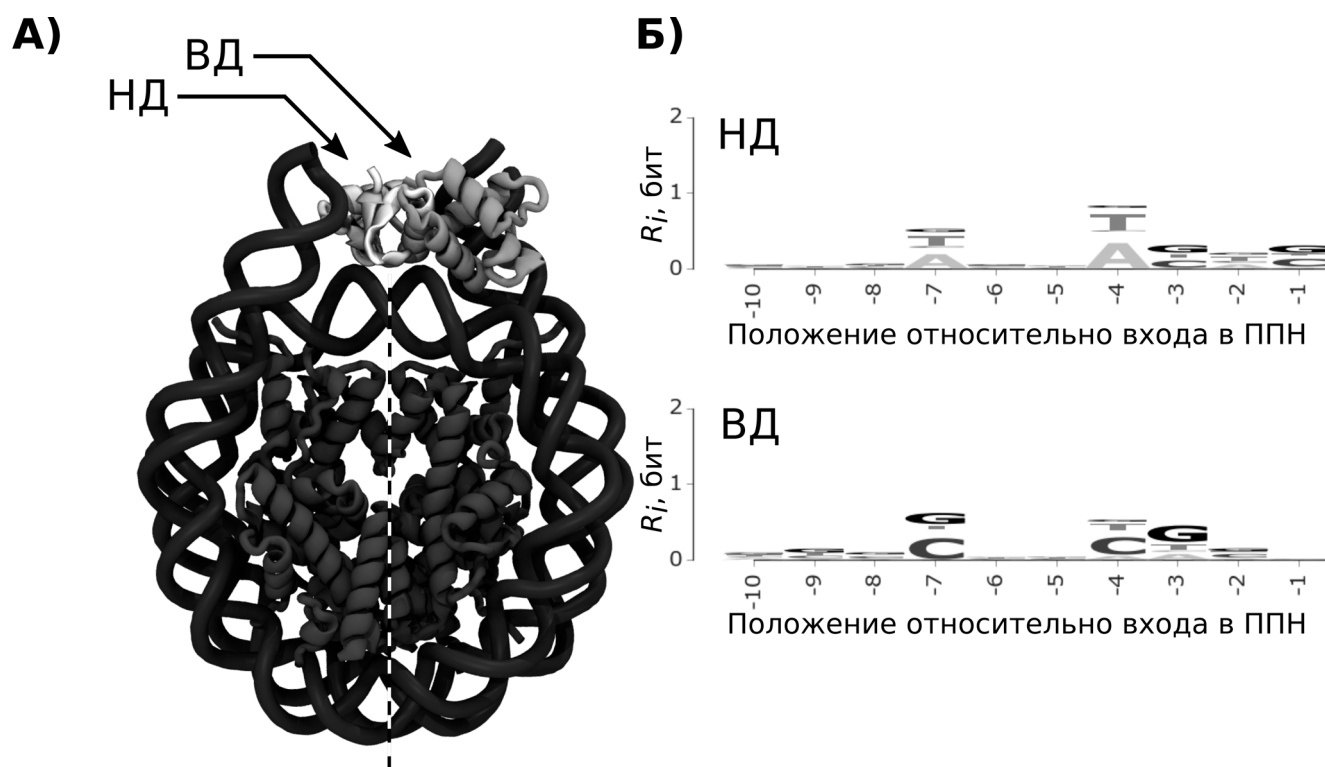


Рисунок. А – Внешний вид структуры хроматосомы. Белок и ДНК показаны в виде отображения вторичной структуры. Линкерные гистоны выделены оттенками серого. Диадная ось показана пунктирной линией. Б – Визуализация частоты встречаемости нуклеотидов для последовательностей, склонных к формированию структуры “на диаде” (НД, “on-dyad”) (сверху) и “вне диады” (ВД, “off-dyad”) (снизу). Визуализация выполнена в виде логотипов последовательностей

идет глобулярный домен, образованный 70–80 аминокислотными остатками и имеющий консервативную третичную структуру, и длинный С-концевой домен из примерно 100 аминокислотных остатков. С-конец является неорганизованным и содержит много остатков лизина. Согласно экспериментальным данным [5], глобулярный домен ЛГ Н1 связывается с нуклеосомой наравне с полноразмерным ЛГ Н1. Ввиду большой степени неупорядоченности концевых доменов отсутствуют кристаллические структуры полноразмерного ЛГ, но существуют кристаллические структуры глобулярного домена [6]. Известно, что ЛГ Н1 содержит ряд аминокислотных остатков, играющих важную роль в формировании контактов с нуклеосомой [7]. Эти остатки выделены в два сайта связывания: первый – Н25, R47, K69, K73, R74, K85, образующий контакты с большой бороздкой ДНК около диады нуклеосомы, и второй – R42, R94, K97, связывающийся с линкерной ДНК.

В данный момент областью для обсуждений является конфигурация связывания ЛГ с нуклеосомой. Ранее существовали различные модели такого связывания, некоторые из них даже предполагали встраивание ЛГ между витками нуклеосомальной ДНК и октамером гистонов [8]. Подобные модели не нашли впоследствии экспериментального подтверждения [5, 9] в отличие от моделей, в которых предполагается связывание ЛГ в области диады нуклеосомы и линкерных участков ДНК.

Имеющиеся на текущий момент экспериментальные данные [10–13] предполагают два возможных расположения ЛГ в хроматосоме, условно называемые как “на диаде” (НД, “on-dyad”) и “вне диады” (ВД, “off-dyad”). На данный момент получена кристаллическая структура хроматосомы с глобулярным доменом ЛГ Н5 *Gallus gallus* (Н5 является историческим названием ЛГ Н1 у *G. gallus*) в конфигурации НД, а также модель структуры хроматосомы с глобулярным доменом ЛГ Н1 *Drosophila melanogaster* в конфигурации ВД [12]. Важно отметить, что структура хроматосомы в конфигурации ВД была построена с помощью методов молекулярного докинга на основании структуры тетра-нуклеосомы (pdb-код 1zbb) с использованием данных ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Глобулярный домен гистона Н5 *G. gallus* продемонстрировал связывание НД с нуклеосомой, тогда как глобулярный домен Н1 *D. melanogaster* – связывание ВД. Анализ их последовательностей показал отличия, вероятно, играющие роль в предпочтительности того или иного типа связывания. Так, глобулярный домен Н5 *G. gallus* содержит положительно заряженные аминокислотные остатки (R47, K55, R74, K97) в позициях, соответствующих нейтрально заряженным аминокислотным остаткам в глобулярном домене Н1 *D. melanogaster* (L68, T76, S96, A119), и нейтрально заряженные аминокислотные остатки (Q51, V80, V87) в позициях, соответствующих положительно заряженным остат-

ками H1 *D. melanogaster* (K72, K102, K109) [12, 13]. Несмотря на то, что некоторые из ключевых остатков не образуют прямых контактов с нуклеосомой, при их замене в глобулярном домене H5 на аминокислотные остатки, характерные для H1, ЛГ показал изменение типа связывания с НД на ВД [13].

Другим фактором, который предположительно может оказывать влияние на конфигурацию хроматосомы, является нуклеотидная последовательность ДНК — как линкерной, так и входящей в состав нуклеосомы. По данным исследования позиционирования нуклеосом выдвигались предположения, что ЛГ предпочтительно связывается с АТ-богатыми участками ДНК [14].

Несмотря на то, что в полученной кристаллической структуре хроматосомы ЛГ H1 показал связывания НД, по данным, полученным методами молекулярного моделирования [15, 16], глобулярный домен ЛГ H5 может также демонстрировать тип связывания ВД. Одним из объяснений может служить тот факт, что нуклеотидные последовательности ДНК, используемые при моделировании, отличались от нуклеотидной последовательности, для которой была разрешена кристаллическая структура НД конформации комплекса нуклеосомы с глобулярным доменом H5 [12].

В описанных выше работах рассматривается связывание ЛГ с одиночной нуклеосомой *in vitro*, тогда как в клетке представлены структуры более высокого уровня компактизации — фибриллы диаметром 30 нм, представляющие собой цепочку из нуклеосом и ЛГ, связанных с линкерной ДНК. Согласно последним данным криоэлектронной микроскопии, в структуре фибриллы диаметром 30 нм, образованной 12 нуклеосомами, ЛГ демонстрирует связывание ВД, что может быть обусловлено геометрией линкерной ДНК в структуре фибриллы [10, 17]. Таким образом, нельзя исключать влияние ДНК, вызванное “узнаванием” ЛГ специфической формы ДНК при связывании [18].

Исходя из вышесказанного, весьма вероятно, что на тип связывания ЛГ с нуклеосомой и линкерной ДНК влияет не только аминокислотная последовательность самого гистона, но и нуклеотидная последовательность ДНК, а также структура хроматиновой фибриллы. Известно также, что при образовании комплекса белок-ДНК на силу и тип связывания оказывают влияние как прямые взаимодействия белка с парами оснований и сахарофосфатным остовом, так и геометрия ДНК за счет энергии ее деформации [18]. Однако, несмотря на наличие структур хроматосомы в различных конфигурациях, совместное влияние этих факторов ранее не изучалось.

В данной работе методами молекулярного моделирования, а именно анализа атом-атомных взаимодействий, моделирования по гомологии и оценки энергии деформации ДНК, было проведено изучение совместного влияния аминокислотной последовательности ЛГ и нуклеотидной последователь-

ности ДНК на тип конфигурации хроматосомы. Проведенный анализ позволил предсказать наиболее предпочтительные для того или иного типа связывания нуклеотидные последовательности линкерной ДНК и сформулировать гипотезы для экспериментальной проверки.

Материалы и методы

Анализ аминокислотных последовательностей различных гистоновых вариантов. В работе были использованы аминокислотные последовательности ЛГ H1, размещенные в базе данных HistoneDB [4]. Выравнивание доступных аминокислотных последовательностей проводилось программой Muscle [19]. Для дальнейшего анализа последовательностей использовался набор инструментов Biopython [20].

Моделирование по гомологии. Моделирование по гомологии осуществлялось в программе MODELLER [21, 22]. В качестве белков-шаблонов использовались кристаллическая структура хроматосомы в конфигурации НД с pdb-кодом 4qlc и модель хроматосомы в конфигурации ВД, полученная на основании данных ЯМР [12]. Для каждого исследуемого гистона с помощью моделирования по гомологии было построено по 10 моделей, из которых на основании DOPEScore были отобраны наилучшие структуры для анализа контактов. Дополнительная оптимизация структур, полученных методом моделирования по гомологии, не проводилась. Анализ контактов проводился с помощью программного пакета Chimera [23].

Расчет энергии деформации ДНК. Расчет зависимости деформационной энергии линкерных участков ДНК от ее последовательности производили в пространстве обобщенных переменных Tilt, Roll, Twist, Shift, Slide, Rise; переход от атомных координат к обобщенным осуществляли при помощи программы 3DNA [24]. Вычисление деформационной энергии участков ДНК производили в соответствии с формулой:

$$E = E_0 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 f_{ij} \Delta \theta_i \Delta \theta_j,$$

где E_0 — минимальная деформационная энергия (не зависит от конформации, принята за 0), суммирование осуществляется по обобщенным переменным для каждых соседних нуклеотидных пар, f_{ij} — коэффициенты жесткости для отклонения обобщенных переменных от равновесной конфигурации. Для расчетов применяли набор упругих коэффициентов и средних значений для нуклеотидных пар, описанный в работе [25].

Деформационную энергию определяли для всех возможных последовательностей ДНК каждого из четырех участков ДНК (по два на каждую модель связывания ЛГ) длиной по 12 н.п. каждый. Участок ДНК, рядом с которым располагается ЛГ в модели ВД, был назван входом в последовательность, позиционирующую нуклеосомы (ППН), противополо-

ложный участок был назван выходом из ППН. Для каждого варианта последовательности была рассчитана разница в деформационной энергии ДНК между моделями НД и ВД. Полученное распределение разниц энергий визуализировали при помощи графического представления консервативности нуклеотидов — логотипа последовательности (sequence logo) для 5% структур с наибольшей (положительной) разницей энергий (предпочтительные для модели НД) и 5% структур с наименьшей (отрицательной) разницей энергий (предпочтительные для модели ВД).

Результаты и обсуждение

Настоящее исследование состояло из нескольких взаимодополняющих компонент. На основе анализа экспериментальных данных были выделены ключевые остатки ЛГ, способствующие тому или иному типу связывания, на основании которых была построена классификационная модель, которая была применена к ЛГ человека: Н1.1, Н1.2, Н1.3, Н1.4, Н1.5, Н1.0 (Н1°), TS Н1.6 (Н1Т), TS Н1.7 (Н1Т2, HANP1), ОО Н1.8 (Н1_{oo}), TS Н1.9 (HILS1), Н1.10, Н1.11, а также к ЛГ Н1 *Xenopus laevis*. В данной модели вероятность того или иного типа связывания для произвольного ЛГ оценивалась следующим образом: (1) проводилось выравнивание последовательности исследуемого ЛГ с последовательностями ЛГ с известным типом связывания, (2) в ключевых для связывания позициях проводился подсчет количества совпадающих типов аминокислотных остатков. Данная модель является предсказательной и не позволяет в полной мере оценить точность предложенной классификационной модели, пока не будет накоплено дополнительных экспериментальных данных.

Для экспериментально определенных структур хроматосомы и структур с различными вариантами ЛГ Н1, построенных с помощью моделирования по гомологии, были проанализированы контакты между ЛГ и ДНК. Был проведен оригинальный анализ конформации ДНК в различных структурах хроматосомы и анализ пространства последовательностей линкерных ДНК с точки зрения энергии их изгиба и контактов с ЛГ.

Определение ключевых остатков ЛГ, влияющих на тип связывания. Аминокислотная последовательность ЛГ Н1 имеет ряд ключевых позиций, мутации в которых приводят к изменению типа связывания [12]. Таким образом, на основании аминокислотных остатков, расположенных в этих позициях, для ЛГ может быть определен предполагаемый тип связывания, что позволяет предложить классификацию ЛГ по типу их связывания с нуклеосомой на основании аминокислотных последовательностей.

В экспериментально определенной структуре хроматосомы в конфигурации НД и ВД присутствуют контакты непосредственно с парами оснований и линкерной ДНК, а также нуклеосомной

ДНК. Данные контакты представлены как водородными связями, так и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями.

Некоторые из аминокислотных остатков, расположенных в ключевых позициях (например, аминокислотные остатки, соответствующие K55, Q51, V87 ЛГ Н5) не образуют прямых контактов с ДНК в известных структурах. Однако, несмотря на отсутствие контактов с ДНК, данные остатки предположительно могут взаимодействовать с ДНК посредством электростатического потенциала, поскольку в гистонах Н1 и Н5 они имеют различные заряды.

Классификация ЛГ на основании наличия ключевых остатков. На основании предложенной выше классификации для 3 ЛГ человека предполагаемый тип связывания был определен как НД, для 7 гистонов человека тип связывания не может быть определен однозначно, поскольку они демонстрируют сходство в ключевых позициях и с гистонами Н5 *G. gallus* (тип связывания НД), и с гистонами Н1 *D. melanogaster* (тип связывания ВД), для 1 гистона человека предполагаемый тип связывания может быть определен однозначно как ВД. Для ЛГ *X. laevis* тип связывания был определен как НД.

Энергия деформации ДНК в различных конфигурациях хроматосомы. Для определения зависимости типа связывания ЛГ от нуклеотидной последовательности линкерной ДНК была рассчитана разница деформационных энергий линкерных участков ДНК между моделями НД и ВД для всех возможных вариантов последовательностей. Также была произведена Z-оценка положения последовательности из оригинальных моделей в распределении рассчитанных деформационных энергий ($Z = 0,75$), исходя из которой оригинальная последовательность, использованная для экспериментального получения структур, склонна к формированию структуры НД.

Как видно из рисунка (Б), большинство позиций в последовательностях нуклеотидов линкерных участков ДНК не значимы для определения геометрии ДНК в рамках моделей НД и ВД, кроме нуклеотидов в позициях –7, –4 и –3. В последовательностях, предпочтительных для модели НД, в этих позициях располагаются А/Т, А/Т, Г/С, в то время как для модели ВД более предпочтительны С/Г, С/Т, Г/Т. Преобладание в линкерной ДНК тимидинов было показано ранее Цуи и Журкин [14].

Также по разнице в деформационных энергиях были найдены предпочтительные (оптимальные) последовательности линкерной ДНК (для которых энергия изгиба максимально способствует той или иной конформации) для моделей НД (CCGTCCCCGTC-ППН-ACGCCGGCGG) и ВД (GACGCCCGAC-ППН-GTGATGCTGC).

Анализ совместного влияния аминокислотной последовательности ЛГ Н1 и нуклеотидной последовательности ДНК. На основании предложенной ранее классификации для различных вариантов

ЛГ H1 с помощью моделирования по гомологии были построены структурные модели хроматосом в конфигурациях НД и ВД. В полученных моделях был проведен анализ контактов между ЛГ H1 и ДНК.

И в тех, и в других моделях присутствуют контакты как между аминокислотными остатками ЛГ H1 и сахаро-фосфатным остовом ДНК, так и непосредственно с азотистыми основаниями, что говорит в пользу предположений о влиянии нуклеотидной последовательности ДНК на тип связывания ЛГ и нуклеосомы за счет эффекта прямого считывания (direct readout) последовательности ДНК белком. Также количество этих контактов изменяется в зависимости от варианта ЛГ, для которого построена модель. Контакты между ЛГ и азотистыми основаниями ДНК могут быть обеспечены за счет образования как водородных связей, так и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Также для ЛГ H1 *D. melanogaster* и H5 *G. gallus* с помощью моделирования по гомологии были построены модели хроматосом в конфигурациях, противоположных экспериментальным: для ЛГ H1 использовалась конфигурация НД, для ЛГ H5 — конфигурация ВД. Данные модели показали уменьшение количества контактов между ЛГ и ДНК, что согласуется с определенными экспериментальными типами связывания.

На основании расчета энергии деформации ДНК были построены модели хроматосомы в конфигурации НД и ВД с предпочтительными (оптимальными) для них последовательностями, определенными по разнице в энергии деформации ДНК, для которых также были проанализированы контакты между ЛГ и ДНК. Анализ показал, что при замене исходной нуклеотидной последовательности в экспериментальных структурах ВН и НД на оптимальные определенные в нашей работе последовательности, способствующие исходному типу связывания, количество контактов ЛГ H1 с парами оснований либо не меняется (для связывания ВД — сохраняется три контакта), либо увеличивается (для связывания НД — увеличивается с двух контактов до трех). В то же время, перекрестное сравнение влияния оптимальных последовательностей ДНК

в НД и ВД структурах показало, что структуры с оптимальными последовательностями ДНК, соответствующими своему типу связывания, имеют такое же или большее число контактов между ЛГ и парами оснований, чем структуры, в которых используется последовательность ДНК, соответствующая альтернативному типу связывания. Таким образом, оптимальные последовательности линкерной ДНК для различных конформаций хроматосомы, предложенные выше, могут достигать своей избирательности как за счет механизмов непрямого считывания (indirect readout) последовательности ДНК белком, так и прямого считывания (direct readout) — взаимодействия белка с парами оснований.

На основании вышесказанного можно сделать предположение, что нуклеотидная последовательность, а также геометрия и жесткость ДНК при изгибе являются важным фактором, определяющим тип конфигурации хроматосомы. Это предположение на данный момент согласуется косвенным образом с экспериментальными данными [10, 17]. Вероятно, аминокислотная последовательность ЛГ не является первостепенным фактором, определяющим тип связывания ЛГ H1 с нуклеосомой.

Таким образом, можно сформулировать гипотезу, согласно которой один и тот же ЛГ, в зависимости от нуклеотидной последовательности ДНК, а также от геометрии линкерной ДНК, может демонстрировать различные типы связывания. Такие пары последовательностей ДНК предложены в данной работе. В дальнейшем эта гипотеза может быть проверена путем оценки расстояний между нуклеотидами, методом измерения эффективности Фёрстеровского переноса энергии (spFRET), с использованием различных нуклеотидных последовательностей для каждого ЛГ.

Авторы выражают благодарность Я. Бай (Y. Bai) за предоставленную модель хроматосомы. Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова [26] при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00031, соглашение №14-24-00031-п).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
2. Simpson R.T. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones // *Biochemistry*. 1978. Vol. 17. N 25. P. 5524–5531.
3. Lyubitelev A.V., Nikitin D.V., Shaytan A.K., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Structure and functions of linker histones // *Biochemistry (Mosc.)*. 2016. Vol. 81. N 3. P. 213–223.
4. El Kennani S., Adrait A., Shaytan A.K., Khochbin S., Bruley C., Panchenko A.R., Landsman D., Pflieger D., Govin J. MS_HistoneDB, a manually curated resource for proteomic

analysis of human and mouse histones // *Epigenetics Chromatin*. 2017. Vol. 10:2.

5. 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. U. S. A.* 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.

6. Ramakrishnan V., Finch J.T., Graziano V., Lee P.L., Sweet R.M. Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding // *Nature*. 1993. Vol. 362. N 6417. P. 219–223.

7. Brown D.T., Izard T., Misteli T. Mapping the interaction surface of linker histone H1(0) with the nucleosome

of native chromatin *in vivo* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. Vol. 13. N 3. P. 250–255.

8. Pruss D., Bartholomew B., Persinger J., Hayes J., Arents G., Moudrianakis E.N., Wolffe A.P. An asymmetric model for the nucleosome: a binding site for linker histones inside the DNA gyres // Science. 1996. Vol. 274. N 5287. P. 614–617.

9. Zhou Y.B., Gerchman S.E., Ramakrishnan V., Travers A., Muyldermans S. Position and orientation of the globular domain of linker histone H5 on the nucleosome // Nature. 1998. Vol. 395. N 6700. P. 402–405.

10. Bednar J., Garcia-Saez I., Boopathi R. et al. Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1 // Mol. Cell. 2017. Vol. 66. N 3. P. 384–397.

11. 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. U. S. A. 2013. Vol. 110. N 48. P. 19390–19395.

12. 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.

13. Zhou B.-R., Feng H., Ghirlando R., Li S., Schwieters C.D., Bai Y. A Small number of residues can determine if linker histones are bound on or off dyad in the chromatosome // J. Mol. Biol. 2016. Vol. 428. N 20. P. 3948–3959.

14. 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.

15. Öztürk M.A., Pachov G.V., Wade R.C., Cojocaru V. Conformational selection and dynamic adaptation upon linker histone binding to the nucleosome // Nucleic Acids Res. 2016. Vol. 44. N 14. P. 6599–6613.

16. Pachov G.V., Gabdoulline R.R., Wade R.C. On the structure and dynamics of the complex of the nucleosome and the linker histone // Nucleic Acids Res. 2011. Vol. 39. N 12. P. 5255–5263.

17. 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.

18. Rohs R., Jin X., West S.M., Joshi R., Honig B., Mann R.S. Origins of specificity in protein-DNA recognition // Annu. Rev. Biochem. 2010. Vol. 79. P. 233–269.

19. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32. N 5. P. 1792–1797.

20. Cock P.A., Antao T., Chang J.T., Chapman B.A., Cox C.J., Dalke A., Friedberg I., Hamelryck T., Kauff F., Wilczynski B., de Hoon M.J.L. Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics // Bioinformatics 2009. Vol. 25. N 11. P. 1422–1423.

21. Webb B., Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER // Curr. Protoc. Bioinformatics. 2016. Vol. 54. P. 5.6.1–5.6.37.

22. Martí-Renom M.A., Stuart A.C., Fiser A., Sánchez R., Melo F., Sali A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000. Vol. 29. P. 291–325.

23. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. UCSF Chimera — a visualization system for exploratory research and analysis // J. Comput. Chem. 2004. Vol. 25. N 13. P. 1605–1612.

24. Lu X., Olson W.K. 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. N 17. P. 5108–5121.

25. Olson W.K., Gorin A.A., Lu X.-J., Hock L.M., Zhurkin V.B. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998. Vol. 95. N 19. P. 11163–11168.

26. Воеводин В., Жуматий С., Соболев С., Антонов А., Брызгалов П., Никитенко Д., Стефанов К., Воеводин В. Практика суперкомпьютера “Ломоносов” // Открытые системы. СУБД. 2012. № 7 (183). С. 36–39.

Поступила в редакцию
21.01.2018

Принята в печать
15.03.2018

MOLECULAR BIOLOGY

JOINT EFFECT OF HISTON H1 AMINO ACID SEQUENCE AND DNA NUCLEOTIDE SEQUENCE ON THE STRUCTURE OF CHROMATOSOMES: ANALYSIS BY MOLECULAR MODELING METHODS

T.K. Gorkovets, G.A. Armeev, K.V. Shaitan, A.K. Shaytan*

Bioengineering Department, Faculty of Biology, Moscow State University,
Russia, 119234, Moscow, 1–12 Leninskie Gory

*e-mail: alex@intbio.org

A chromosome consisting of a nucleosome core, linker DNA and linker histone (LH), is an important structural element of chromatin and plays role in the replication and transcription regulation. There are two experimentally confirmed modes of LH binding to the nucleosome and linker DNA, which differ in their geometry: binding on-dyad and off-dyad. It was shown that the LH amino acid sequence influences the type of histone binding and the conformation of the chromatosome. However, the geometry of linker DNA bound with LH also changes. Thus, the mutual influence of these factors and the molecular basis determining the type of LH binding to nucleosomes remain unclear. In this study, we applied molecular modeling methods, including homology modeling, atom-atom interaction analysis and DNA deformation energy analysis to study the joint effect of the LH amino acid sequence and the DNA nucleotide sequence on the

configuration of the chromatosome. We analyzed the known crystal and NMR structures of the chromatosome for the atom-atom interactions of LH and DNA as well as the energy of DNA deformation in these structures for various DNA sequences. For various LH H1 variants, the analysis was carried out using homology modeling methods. Sequence-dependent differences in the bending energy of the linker DNA for two different conformations of the chromatosome were found, and nucleotide sequences preferred for these structures were also proposed. As a result of the analysis, it was shown that the DNA nucleotide sequence along with the LH amino acid sequence influences the type of binding to the nucleosome. It is assumed that the contribution of the DNA nucleotide sequence and its geometry can be determinative in comparison with the LH amino acid sequence in some cases. Hypotheses for experimental verification have been formulated, according to which the type of LH binding can change with different DNA nucleotide sequences.

Keywords: *chromatosome, nucleosome, chromatin, linker histone, linker DNA, DNA flexibility, homology modeling*

Сведения об авторах

Горковец Татьяна Константиновна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: gorkovets@molsim.org

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: armeev@intbio.org

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

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.218

ДРОЖЖЕВОЙ БЕЛОК NHP6A СВЯЗЫВАЕТСЯ
С КОРОТКИМИ GC-БОГАТЫМИ ГЕНАМИЕ.С. Герасимов¹, Н.С. Герасимова², А.Л. Козлова¹, В.М. Студитский^{2,3,*}¹Кафедра молекулярной биологии и ²кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;³Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA

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

Nhp6A — это небольшой негистоновый хромосомный белок дрожжей, неспецифично связывающий ДНК. Этот белок присутствует во многих промоторных и транскрибируемых областях генома и участвует в регуляции транскрипции. Недавно была показана роль Nhp6A в процессе дестабилизации структуры нуклеосом, что может объяснить его расположение в регуляторных участках. Тем не менее, его функция в кодирующих областях остается неизвестной. В настоящей работе с целью поиска механизма действия Nhp6A нами были изучены гены, связанные с белком по всей длине, включая область открытой рамки считывания. Мы показали, что Nhp6A преимущественно связывается с кодирующими областями коротких GC-богатых генов дрожжей. Наблюдаемое взаимодействие не обусловлено непосредственно высоким содержанием GC-пар в данных локусах ДНК, что позволяет предположить существование специфического для данной группы регуляторного механизма с участием Nhp6A. Так как достаточно много изученных генов сохраняют ряд характерных для предкового бактериального генома черт, мы полагаем, что данная группа скорее относится к “древним”. Таким образом, возможно, обнаруженная особенность распределения Nhp6A связана с сохранением механизмов регуляции транскрипции генов, возникших рано в ходе эволюции.

Ключевые слова: Nhp6A, белки HMG, *Saccharomyces cerevisiae*, связывание ДНК, регуляция транскрипции, эволюционная геномика, GC-состав, предпочтение кодонов

Хранение и реализация заложенной в ДНК генетической информации обеспечиваются действием многочисленных белков. В наибольшем количестве в ядре эукариотических организмов содержатся гистоны — небольшие белки, обеспечивающие компактную укладку ДНК в хроматин [1]. Большое влияние на структуру хроматина и функционирование генов оказывают также различные негистоновые белки. К ним относят внутриядерные ферменты и белковые факторы, необходимые для работы генетического аппарата клетки. В высоких концентрациях в ядрах присутствуют негистоновые белки, которые относят к так называемой группе белков с высокой подвижностью (HMG — high mobility group) [2]. Они быстро перемещаются при электрофорезе в полиакриламидном геле за счёт небольшой молекулярной массы и обладают характерной структурой, называемой HMG-box (HMGB). Суммарное содержание HMG-белков в ядрах клеток примерно в десять раз меньше, чем содержание гистонов.

К таким белкам относится и дрожжевой негистоновый хромосомный белок 6A (non-histone chromosomal protein 6A — Nhp6A) — небольшой полипептид с молекулярной массой 10810 Да, состоящий из 93 аминокислотных остатков [3]. Nhp6A связывается с участками ДНК длиной около 11 п.н. и не

имеет выраженной специфичности к ее последовательности и составу [4–6]. Nhp6A имеет типичную L-образную структуру HMGB-домена: три положительно заряженные альфа-спирали укладываются в малую бороздку ДНК, а неструктурированный N-конец, огибая двойную спираль, укладывается в большую [7].

Ген *NHP6A* имеет один паралог *NHP6B*, кодирующий идентичный ему на 87% белок длиной в 101 аминокислотный остаток [8]. Он представлен в клетках в заметно меньшем количестве, поэтому большинство исследований сфокусировано на основной изоформе.

Nhp6A обнаруживается в составе некоторых мультимолекулярных белковых комплексов и участвует в регуляции транскрипции. Одновременное нокаутирование генов *NHP6A* и *NHP6B* приводит к замедленному росту дрожжей при температуре 30°C и невозможности культивирования клеток при 38°C, что свидетельствует о функциональной значимости изоформ белка для выживания дрожжевых клеток в стрессовых условиях [9]. Важная роль Nhp6A в регуляции экспрессии генов была продемонстрирована в работах по индукции генов, транскрибируемых РНК-полимеразой 2. Так, в штаммах дрожжей с мутациями в *NHP6A* и *NHP6B* наблюдается подавление экспрессии некоторых

генов [10]. Тем не менее, механизмы действия Nhp6 мало изучены.

Полногеномный анализ распределения Nhp6A по дрожжевому геному демонстрирует, что белок присутствует на многих промоторах и транскрибируемых участках генов *in vivo* [11]. Исследования *in vitro* показали, что Nhp6A участвует в процессе дестабилизации структуры нуклеосом. Это может объяснить его расположение в регуляторных участках генома [12]. Нами было показано, что белок может облегчать транскрипцию хроматина *in vitro* [13], однако его функция в кодирующих областях *in vivo* остается неизвестной. С целью поиска механизма влияния Nhp6A на транскрипцию кодирующих областей генома нами были изучены гены, связанные с белком на всей протяженности открытой рамки считывания.

Методы

В работе были использованы данные о связывании белка Nhp6A с участками генома *Saccharomyces cerevisiae*, полученные Дуэлл и соавт. [11], а также геном и аннотация генов *S. cerevisiae* версии R64-1-1, доступные в базе данных Ensembl. Все этапы анализа проводились только для нуклеотидных последовательностей 16 хромосом ядерного генома, содержащих 6692 белок-кодирующих гена. Список генов, с которыми Nhp6A связывается в кодирующей области (далее — Nhp6A⁺-гены), состоял из 176 наименований.

Контрольная выборка генов, распределение длины кодирующей части которых совпадает с таковым для Nhp6A⁺-генов, была получена следующим образом. Гистограмма распределения длины кодирующих участков Nhp6A⁺-генов делилась на равные интервалы длиной 50 п.н., затем определялось число генов k в каждом интервале длин i . Для каждого интервала длин i из всех генов дрожжевого генома, попадающих в заданный интервал по длине, случайным образом отбиралось ровно k_i генов. Размер выборки при таком способе генерации совпадает с количеством Nhp6A⁺-генов. Распределение длины кодирующей части генов из одной такой выборки приведено на рисунке (А). Для исключения влияния отдельных генов было сделано 100 независимых случайных выборок. Результаты были усреднены для 100 выборок.

Исходный код программы на языке Python, использованной для получения выборок, проведения анализа и построения рисунков, доступен на веб-сервисе GitHub по ссылке <https://github.com/jalgard/MUBSB>.

Результаты

Дрожжевой белок Nhp6A связывается с различными участками генома, преимущественно с промоторами и транскрибируемыми участками. Полногеномный анализ связывания Nhp6A в геноме дрожжей показал, что белок связывается с кодиру-

ющими участками некоторых генов (Nhp6A⁺-генов). В работе Дуэлл и соавт. [11] было обнаружено 176 таких открытых рамок считывания.

Нами было показано, что распределение длин кодирующих участков Nhp6A⁺-генов существенно отличается от такового для всех генов ядерного дрожжевого генома (рисунок, А) (р-значение U-критерия Манна-Уитни $7,4 \cdot 10^{-58}$). При этом Nhp6A⁺-гены представляют собой фракцию коротких генов. Так, средняя длина дрожжевого гена (кодирующей области) составляет 1377 п.н. (медиана распределения 1107 п.н.), а средняя длина гена из выборки Nhp6A⁺-генов — 408 п.н. (медиана 345 п.н.).

Для проверки гипотезы о том, что данные гены обладают и другими отличительными свойствами, из всего ядерного генома дрожжей мы получили контрольную выборку коротких генов, похожую по распределению длины на исследуемую группу (производили 100 независимых случайных повторностей, чтобы устранить возможное влияние отдельных случайно взятых генов).

Оказалось, что в отличие от случайно взятых коротких генов дрожжевого генома, Nhp6A⁺-гены имеют более высокое содержание GC-пар. Распределение GC-состава генов для сравниваемых выборок и для генов всего генома приведено на рисунке (Б) из которого хорошо видно, что случайно выбранные короткие гены не сильно отличаются по GC-составу от всех генов генома дрожжей, в отличие от Nhp6A⁺-генов (р-значение U-критерия Манна-Уитни $9,0 \cdot 10^{-16}$ для сравнения Nhp6A⁺-генов со случайной выборкой коротких генов). Среднее значение GC-содержания генома дрожжей — 38% (сплошная горизонтальная линия), тогда как медианное GC-содержание у генов ядерного генома несколько выше и составляет 40%. При этом для генов, связанных с Nhp6A, данное значение существенно выше — 46%. Стоит отметить, что данное свойство не является само по себе фактором, определяющим связывание Nhp6A с кодирующей областью гена. Анализ GC-содержания участков генома, с которыми связывается белок Nhp6A, показал, что среднее значение GC-содержания в них составляет 40,7%, что почти не отличается от такового для генов ядерного генома дрожжей в целом. Кроме того, исследования *in vitro* свидетельствуют в пользу того, что Nhp6A не имеет выраженной специфичности к последовательности и GC-составу ДНК [6].

Интересно, что Nhp6A⁺-гены также находятся в существенно более GC-богатом окружении. Анализ GC-состава прилегающих к генам последовательностей длиной 200 п.н. приведен на рисунке (В). Из рисунка видно, что среднее содержание GC-пар в этих участках соответствует среднему значению для локуса генома, с которым связывается Nhp6A, тогда как среднее содержание GC-пар в областях, непосредственно прилегающих к генам дрожжевого генома, в общем случае существенно ниже.

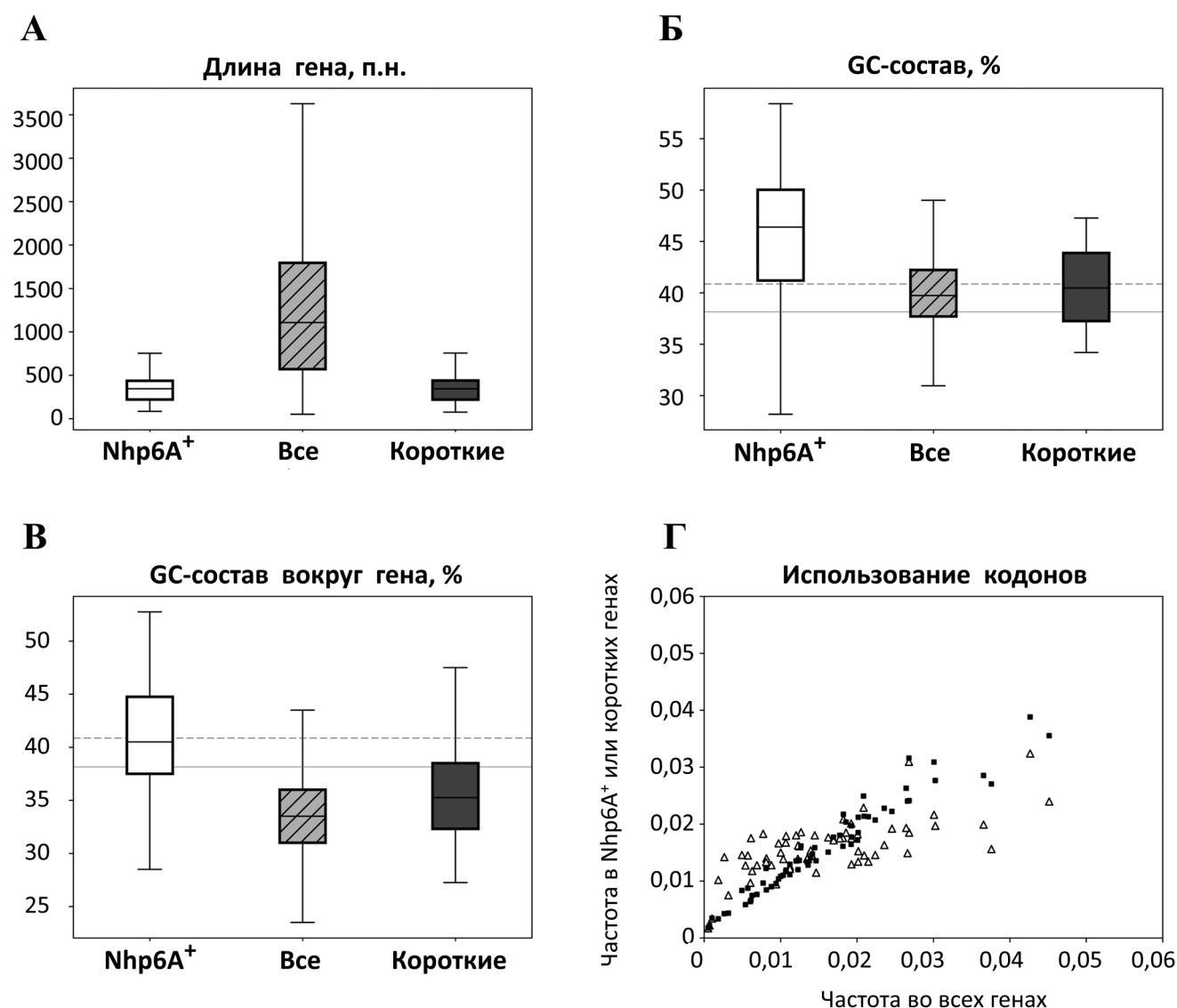


Рисунок. Особенности генов, связанных с дрожжевым белком Nhr6A. Анализ различных параметров генов, для которых показано взаимодействие с Nhr6A на протяжении всей кодирующей области (Nhr6A⁺-гены) [11], всех генов ядерного генома дрожжей ("Все") и соответствующие усредненные данные по 100 независимым выборкам коротких генов ("Короткие"). **А.** Распределение длин генов. **Б.** Распределение содержания GC-пар в кодирующих областях генов. Сплошная горизонтальная линия показывает средний GC-состав 16 хромосом ядерного генома *Saccharomyces cerevisiae*, пунктирная — участков генома, с которыми связывается белок Nhr6A (по данным о связывании белка Nhr6A из [11]). **В.** Распределение содержания GC-пар на участках генома длиной 200 п.н. вокруг генов. **Г.** Частота использования кодонов для Nhr6A⁺-генов (треугольники) и усредненная частота использования кодонов для 100 случайных выборок коротких генов (квадраты). Каждый символ соответствует кодону, координата по оси абсцисс соответствует частоте использования данного кодона во всех генах ядерного генома дрожжей, а координата по оси ординат — частоте использования данного кодона для генов из соответствующей выборки

Одним из наиболее интересных свойств генов, связанных с Nhr6A, является то, что они сильно отличаются по частоте использования кодонов от средних значений для всего генома дрожжей (рисунок, Г). На графике кодоны, которые относительно чаще используются во взятой выборке генов, чем в целом по генам ядерного генома дрожжей, оказываются над диагональю, а кодоны, которые используются относительно реже — под диагональю. Из графика видно, что кодоны для выборки случайных коротких генов расположены в основном на диагонали, тогда как кодоны для выборки Nhr6A⁺-генов — нет. При этом относительно реже

используемые кодоны чаще используются в выборке Nhr6A⁺-генов, а более часто используемые — реже. Аналогичной зависимости не наблюдается, если разделить кодирующую область на триплеты со сдвигом рамки +1 или +2, в таком случае триплеты обеих выборок ведут себя случайным образом (данные не приведены).

Обсуждение

Таким образом, гены, связанные с Nhr6A в кодирующей области, являются короткими, GC-богатыми и имеют отличную от среднего статистику использования кодонов. Ряд исследований пока-

зывает, что гены, имеющие сходный эволюционный “возраст” (например, древние или новые) имеют сходный GC-состав, длину белкового продукта и статистику использования кодонов [14]. Мы предполагаем, что данный сценарий реализуется и с Nhp6A⁺-генами, по-видимому, объединенными также единым механизмом регуляции их экспрессии с участием белка Nhp6A.

Анализ распределения Nhp6A по геному дрожжей показал, что участки генома, связанные с данным белком, имеют лишь немного более высокое содержание GC-пар, тогда как содержание GC-пар в кодирующих областях Nhp6A⁺-генов, а также в прилегающих к ним участках значительно выше. Существуют данные о том, что *in vitro* белок Nhp6A предпочтительно связывается с последовательностями, обогащенными динуклеотидом GT [5], однако в нашем исследовании не было выявлено данного эффекта. По-видимому, наблюдаемое взаимодействие с кодирующей областью генов само по себе не обусловлено высоким содержанием GC-пар в данных локусах ДНК. Можно предположить, что имеет место специфический для данной группы генов регуляторный механизм с участием Nhp6A.

К сожалению, анализ функциональной роли данных генов крайне затруднителен ввиду того,

что больше половины из них аннотированы в базе данных *Saccharomyces* Genome Database (SGD) как рамки считывания с неизвестной функцией. Однако среди генов, для которых известна функция, достаточно много митохондриальных, что может указывать на сохранение этими генами ряда черт, характерных для предкового бактериального генома. Поэтому мы предполагаем, что данная группа генов скорее относится к “древним”.

Нужно отметить, что у самого гена *NHP6A* содержание GC-пар в кодирующей области составляет 46% и он также окружен участками с повышенным GC-содержанием (42%), таким образом, вероятнее всего, относится к той же эволюционной группе генов. При этом его паралог *NHP6B*, определенно относящийся к более “новым” генам, возникшим во время полногеномной дупликации [15], имеет содержание GC-пар в кодирующей области 44% и окружен участками с GC-содержанием 41%. Это наблюдение хорошо согласуется с гипотезой о “древности” группы генов, связывающих Nhp6A в кодирующей области.

Список генов, связанных с Nhp6A в кодирующей области, любезно предоставлен Ноа Доуэлл. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D., Thomas J.O. Chromatin structure; oligomers of the histones // *Science*. 1974. Vol. 184. N 4139. P. 865–868.
2. Reeves R. HMG nuclear proteins: linking chromatin structure to cellular phenotype // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1799. N 1–2. P. 3–14.
3. Stillman D.J. Nhp6: a small but powerful effector of chromatin structure in *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. Vol. 1799. N 1–2. P. 175–180.
4. Ruone S., Rhoades A.R., Formosa T. Multiple Nhp6 molecules are required to recruit Spt16-Pob3 to form yFACT complexes and to reorganize nucleosomes // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278. N 46. P. 45288–45295.
5. Allain F.H., Yen Y.M., Masse J.E., Schultze P., Dieckmann T., Johnson R.C., Feigon J. Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding // *EMBO J*. 1999. Vol. 18. N 9. P. 2563–2579.
6. Coats J.E., Lin Y., Rueter E., Maher L.J., III, Rasnik I. Single-molecule FRET analysis of DNA binding and bending by yeast HMGB protein Nhp6A // *Nucleic Acids Res*. 2013. Vol. 41. N 2. P. 1372–1381.
7. Masse J.E., Wong B., Yen Y.M., Allain F.H., Johnson R.C., Feigon J. The *S. cerevisiae* architectural HMGB protein NHP6A complexed with DNA: DNA and protein conformational changes upon binding // *J. Mol. Biol*. 2002. Vol. 323. N 2. P. 263–284.
8. Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins // *Trends Biochem. Sci*. 2001. Vol. 26. N 3. P. 152–153.
9. Costigan C., Kolodrubetz D., Snyder M. NHP6A and NHP6B, which encode HMG1-like proteins, are candidates for downstream components of the yeast SLT2 mitogen-activated protein kinase pathway // *Mol. Cell Biol*. 1994. Vol. 14. N 4. P. 2391–2403.
10. Yu Y., Eriksson P., Stillman D.J. Architectural transcription factors and the SAGA complex function in parallel pathways to activate transcription // *Mol. Cell Biol*. 2000. Vol. 20. N 7. P. 2350–2357.
11. Dowell N.L., Sperling A.S., Mason M.J., Johnson R.C. Chromatin-dependent binding of the *S. cerevisiae* HMGB protein Nhp6A affects nucleosome dynamics and transcription // *Genes Dev*. 2010. Vol. 24. N 18. P. 2031–2042.
12. Xin H., Takahata S., Blanksma M., McCullough L., Stillman D.J., Formosa T. yFACT induces global accessibility of nucleosomal DNA without H2A-H2B displacement // *Mol. Cell*. 2009. Vol. 35. N 3. P. 365–376.
13. Hsieh F.K., Kozlova A.L., Gerasimova N.S., Kotova E.Yu., Formosa T., Studitsky V.M. Role of the Nhp6 protein in *in vitro* transcription through the nucleosome // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2017. Vol. 72. N 4. P. 218–221.
14. Prat Y., Fromer M., Linial N., Linial M. Codon usage is associated with the evolutionary age of genes in metazoan genomes // *BMC Evol. Biol*. 2009. Vol. 9:285.
15. Wolfe K.H., Shields D.C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome // *Nature*. 1997. Vol. 387. N 6634. P. 708–713.

Поступила в редакцию
16.01.2018

Принята к печати
15.03.2018

MOLECULAR BIOLOGY

YEAST PROTEIN NHP6A BINDS WITH SHORT GC-RICH GENES

E.S. Gerasimov¹, N.S. Gerasimova², A.L. Kozlova¹, V.M. Studitsky^{2,3,}**¹Department of Molecular Biology and ²Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskiye Gory, Moscow, 119234, Russia;**³Cancer Epigenetics Program, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, 19111 Pennsylvania, USA***e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu*

Nhp6A is a small non-histone chromosomal yeast protein that binds DNA nonspecifically. This protein is present at many promoters and transcribed regions of genome and is involved in regulation of transcription. Recently, Nhp6A was shown to participate in destabilization of the nucleosomal structure. This may explain its location in regulatory sites, but its function in the coding regions remains unknown. In the present work, in order to reveal the mechanism of action of Nhp6A, we have studied genes associated with the protein along the entire length, including the open reading frame. We have shown that Nhp6A predominantly binds to the coding regions of short GC-rich yeast genes. The observed interaction is not associated directly with the high content of GC-pairs in these DNA loci, so we can propose a specific regulatory mechanism involving Nhp6A for this group. Since a part of genes retain features of the ancestral bacterial genome, we suggest this group as an “ancient”. Presumably, this genomic distribution of Nhp6 is related to the mechanisms of regulation of gene transcription that appeared early in the course of evolution.

Keywords: *Nhp6A, HMG protein, Saccharomyces cerevisiae, DNA binding, regulation of transcription, evolutionary genomics, GC-content, codon usage bias*

Сведения об авторах

Герасимов Евгений Сергеевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-46-58; e-mail: jalgard@gmail.com

Герасимова Надежда Сергеевна — канд. биол. наук, ассистент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-938-22-91; e-mail: gerasimova@mail.bio.msu.ru

Козлова Анастасия Львовна — студентка кафедры молекулярной биологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: mika.lorens@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

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821

**ЗРИТЕЛЬНЫЕ СТИМУЛЫ ДЛЯ ИНТЕРФЕЙСА МОЗГ-КОМПЬЮТЕР
НА ОСНОВЕ ЗРИТЕЛЬНЫХ ВЫЗВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ:
ЦВЕТ, ФОРМА, ПОДВИЖНОСТЬ****Р.К. Григорян^{1,*}, Е.Ю. Крысанова¹, Д.А. Кирьянов¹, А.Я Каплан^{1,2}**

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

²*Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23
e-mail: grraph.bio@gmail.com

Целью данного исследования была оценка влияния различных отличительных черт стимулов в интерфейсе мозг-компьютер на основе компонента П300 на показатели работы интерфейса и характеристики вызванных потенциалов. Было продемонстрировано, что использование наборов стимулов с большим количеством отличительных признаков позволяет добиться более высокой точности выбора команд. Этот показатель был значимо выше для наборов стимулов, в которых имелись различия по цвету, форме и значению символа. Наилучшие результаты были получены для набора, содержащего наибольшее количество различий между стимулами, а именно, набора из 9 разнообразно окрашенных букв. Этот результат во многом объясняется повышенной амплитудой пика П300 для наборов стимулов, содержащих более разнообразные стимулы. Закономерности, выявленные в ходе работы, могут использоваться для улучшения пользовательского опыта при работе с интерфейсами мозг-компьютер. Движение точки предъявления стимулов по экрану и характер такого движения (линейный или псевдослучайный) не оказывали влияния на показатели работы интерфейса. Этот результат является многообещающим для создания интерфейсов мозг-компьютер с совмещенными в одной позиции стимулами, находящимися на подвижных объектах, таких как мобильные роботы или среды дополненной реальности.

Ключевые слова: интерфейсы мозг-компьютер, электроэнцефалограмма, зрительные вызванные потенциалы, психофизиология, инсульт, нарушения речи

Технологии интерфейсов мозг-компьютер (ИМК) позволяют человеку научиться формировать сигналы для взаимодействия с внешней средой посредством мысленных усилий, приводящих к специфическим изменениям электроэнцефалограммы (ЭЭГ), т.е. без использования речи и движений [1]. Одним из наиболее надежных подходов для построения ИМК является детектирование в реальном времени специфических зрительных вызванных потенциалов (ЗВП) ЭЭГ в ответ на активацию стимулов, на которых сфокусировано внимание испытуемого. Это позволяет без каких-либо мышечных усилий, например, набирать текст по одной букве или выбирать различные команды из представленных на экране [1, 2]. В основе этого подхода лежит известная психофизиологическая парадигма “odd-ball”, заключающаяся в том, что ЗВП в ответ на стимул, привлекающий внимание оператора (целевой стимул), несколько отличается по форме от аналогичных ЗВП в ответ на индифферентные или нецелевые зрительные стимулы. Основное отличие ЗВП, полученных в ответ на предъявление целевых стимулов, проявляется в виде увеличения позитивного компонента П300, возникающего с латентностью

примерно 300 мс после начала подачи зрительного стимула [3].

Обычно зрительные стимулы (буквы, пиктограммы, изображения и др.) для работы в ИМК на основе компонента П300 размещают на экране компьютера в ячейках квадратной матрицы [2, 4]. Это создает пространственное преимущество для целевого стимула, проекция которого попадает на сетчатку в область фовеа, в то время как нецелевые стимулы оказываются на периферии поля зрения, что отражается в различии амплитуд соответствующих ЗВП. Большинство здоровых людей демонстрируют высокую точность работы в ИМК-П300 при кратковременном тестировании [5]. Однако при продолжительной работе с таким ИМК даже здоровых людей, не говоря уже о пациентах с постинсультными и посттравматическими расстройствами, для которых эта технология в первую очередь предназначена, достижение высокой точности работы становится затруднительным, так как требует постоянного привлечения внимания к той или иной позиции матрицы. Следствием утомления является уменьшение компонента П300 и появление в связи с этим ошибок классификации зрительных вызванных потенциалов и выбора команд, так

как компонент П300 как раз и является основным показателем, на который ориентируются алгоритмы классификации ЗВП.

В последние годы в связи с попытками практического использования ИМК-П300 возникает необходимость оптимизации и адаптации стимульной среды в ИМК для работы пользователей в конкретных приложениях [6]. В частности, для длительной работы с ИМК необходимо обеспечить пользователю наименьшие возможные когнитивные нагрузки при сохранении устойчивого внимания к стимулам, например, создавая стимулы с большей привлекательностью, меньшей нагрузкой на зрительный аппарат и т.д. В разных работах для этого использовались подвижные стимулы [7, 8], цветные стимулы [9–11], стимулы разной формы [12] и стимулы, случайным образом перемещающиеся по экрану [13]. Однако ранее все эти параметры стимулов не изучались в одних и тех же условиях. Не проверялась эффективность работы в ИМК стимулов разной модальности и формы, последовательно предъявляемых в одной и той же позиции экрана, что не только облегчает их восприятие, но и расширяет сферу практического применения, например, для размещения стимульного экрана прямо на объекте управления: подвижном роботе или экзоскелетной конструкции [14].

Целью настоящей работы является исследование влияния различных параметров стимулов (цвет, форма и подвижность) на точность классификации и характеристики зрительных вызванных потенциалов, возникающих при работе в ИМК-П300 со стимулами, последовательно предъявляемыми в одной и той же позиции экрана, которая в свою очередь может быть стационарной или подвижной.

Материалы и методы

В исследовании приняли участие 37 здоровых испытуемых в возрасте от 18 лет до 31 года. Перед проведением исследования испытуемые подписывали информированное согласие по форме, утвержденной комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. В исследовании тестировалось два набора условий предъявления стимулов: условия, связанные с характеристиками стимулов, и условия, связанные с их подвижностью. В исследовании условий, связанных с характеристиками стимулов, приняли участие 20 человек (10 женщин и 11 мужчин), в исследовании подвижности — 17 (8 женщин и 9 мужчин).

ЭЭГ записывали монополярно в 25 отведениях (O1, O2, Oz, PO7, PO3, POz, PO4, PO8, P3, P1, Pz, P2, P4, CP3, CPz, CP4, C3, Cz, C4, FC3, FCz, FC4, F3 Fz, F4) с референтным электродом на мочке уха посредством усилителя NVX-52 (“Медицинские компьютерные системы”, Зеленоград, Россия) с гелевыми электродами. Частота дискретизации составляла 500 Гц.

Испытуемый располагался в кресле перед монитором (диагональ 24 дюйма, разрешение 1920×1080, IPS-матрица) на расстоянии примерно 80 см. Во время эксперимента испытуемому рекомендовали воздерживаться от движений, оставаться максимально спокойным, не отвлекаться на посторонние мысли и, по возможности, не моргать.

Стимульная среда предъявлялась на компьютерном мониторе и представляла собой поле серого цвета, в котором демонстрировались стимулы из разных наборов, угловым размером около 2,1 градуса. Предъявление стимулов представляло собой смену одного стимула другим, находящимся в той же точке экрана. Точка демонстрации стимулов могла находиться на одном месте (в центре экрана) в течение всего эксперимента, либо прямолинейно двигаться по экрану (с отражением от краев поля) со скоростью около 5 градусов в секунду, либо двигаться, случайным образом меняя направление движения несколько раз в секунду, что со стороны выглядело как псевдослучайное движение.

В левой части экрана для каждой данной сессии указывался символ-пример, который обозначал целевой стимул. В ходе экспериментальной сессии на экране в случайном порядке предъявлялись стимулы из заданного набора, среди которых испытуемому предлагалось подсчитывать число появлений целевого стимула, а остальные стимулы (нецелевые) игнорировать. Длительность предъявления стимула составляла 50 мс, длительность паузы между идущими подряд стимулами — 150 мс.

Сначала каждый испытуемый участвовал в сессии из десяти циклов с разными целевыми стимулами для построения классификатора реакций ЭЭГ в ответ на целевые и на нецелевые стимулы. В каждом цикле каждый стимул из данного набора, включая целевой, предъявлялся по 10 раз. Таким образом, в выборке для обучения классификатора было 100 ЗВП, полученных в ответ на целевые стимулы.

После завершения настройки и обучения классификатора (вариант алгоритма линейного дискриминанта Фишера) испытуемый участвовал в тестовых сессиях, в которых инструкции для испытуемого были аналогичны инструкциям на стадии обучения. В конце каждого цикла тестовой сессии испытуемому давалась обратная связь: на экран выводился символ, который был определен классификатором как целевой. Этот символ мог оказаться как правильным, т.е. совпадающим с целевым, так и неправильным. Соотношение правильно выбранных классификатором стимулов и их общего числа определяло точность выбора команд в нейроинтерфейсе. Максимальное число циклов ввода в одном режиме составляло 12.

В ходе работы было исследовано два набора условий предъявления стимулов. В первый набор входили 5 типов стимулов, предъявляемых в одной и той же точке экрана и различающихся по цвету и форме заполнения кружков (кириллические буквы или абстрактные символы): 9 кругов разного

цвета; 9 букв разного цвета; 9 букв одинакового цвета (серых); 9 абстрактных символов разного цвета; 9 абстрактных символов (серых). При тестировании набора условий, связанных с движением стимулов, использовалось 2 типа символов, размещаемых в перемещающейся точке экрана: 9 кругов разного цвета; 9 букв разного цвета. Для стимулов, представленных кругами и буквами, был использован один набор цветов. Физическая и воспринимаемая яркость стимулов не отслеживались.

Для каждого типа символов было создано 3 режима их предъявления: стационарный — предъявление стимулов в неподвижной точке в центре экрана; динамический — линейное движение точки предъявления стимулов; псевдослучайный — движение точки предъявления стимулов с псевдослучайными изменениями направления.

В качестве амплитуды пика П300 рассматривали амплитуду локального максимума разности между усредненными целевыми и нецелевыми зрительными вызванными потенциалами, находящегося в диапазоне от 250 до 500 мс после момента начала демонстрации стимула

Обработка результатов проводилась с помощью пакета Statsmodels 0.8.0 [15]. Использовался многофакторный дисперсионный анализ с суммой квадратов типа II. Принадлежность данных к нормальному распределению проверялась с помощью критерия Лиллиефорса; равенство дисперсий в исследуемых группах — с помощью критерия Уайта.

Результаты и обсуждение

Оценка точности классификации при стационарном предъявлении стимулов. Средняя точность классификации, определяемая как отношение числа правильных выборов команд нейроинтерфейса к общему числу попыток ввода, составила в режиме с разноцветными стимулами одной формы 0,59, что несколько превышало точность для одноцветных кружков с абстрактными символами (0,51) и незначительно уступало надежности распознавания одноцветных букв (0,68). В то же время разноцветные абстрактные символы и буквы определялись с заметно большей точностью: 0,75 и 0,82 соответственно (рис. 1А). Для оценки статистической значимости этих данных был применен многофакторный дисперсионный анализ. Была показана статистическая значимость ($F = 6,9$, $p < 0,01$) фактора формы стимула (три градации), тогда как для фактора цвета (две градации) таковая не обнаружилась. Однако последнее могло быть связано с гетерогенностью фактора цвета для оформленных и неоформленных (круги без символов) стимулов. Действительно, сбалансированный дизайн эксперимента (сравнение всех режимов, кроме режима с 9 разноцветными кругами в качестве стимулов), показал статистическую значимость окрашенности стимула ($F = 16,7$, $p < 0,001$), т.е. то, что точность

выбора целевых стимулов выше для режимов с окрашенными стимулами и для стимулов с разными формами (абстрактные символы и буквы). При этом, как видно, самая высокая точность достигается для букв, которые, очевидно, отличаются между собой не только формой, но и смысловым наполнением.

Таким образом, окрашенность и специфическая форма стимулов существенно повышают надежность работы нейроинтерфейсов на основе компонента П300.

Оценка точности классификации стимулов при сравнении подвижных и неподвижных режимов. Как видно из рис. 1Б, для стимулов-кругов разного цвета средняя точность классификации в стационарном режиме (0,64) практически не отличается от соответствующих оценок в динамическом (0,63) и псевдослучайном (0,65) режимах. Та же закономерность характерна и для стимулов-кругов с буквами разного цвета — соответственно 0,79, 0,77, 0,77. Так же, как и в стационарном режиме, с помощью многофакторного дисперсионного анализа была показана значимость фактора типа стимула ($F = 15,6$, $p < 0,001$). Влияние фактора типа движения не было значимым.

Как в стационарном, так и в динамическом режиме, буквенные стимулы оказались значимо более эффективными для распознавания в нейроинтерфейсе. Отсутствие негативного влияния на точность работы нейроинтерфейса движения стимулов является важным для создания нейроинтерфейсов со стимулами, размещаемыми на подвижных объектах: движущихся модулях экзоскелетных конструкций и тренажеров, мобильных роботах.

Анализ зрительных вызванных потенциалов при стационарном предъявлении стимулов. При анализе ЗВП (рис. 2А) использовали показатели максимальной амплитуды П300 и его латентности, то есть времени от момента подачи стимула, за которое потенциал достигает своего максимума. При проведении многофакторного дисперсионного анализа были выделены те же факторы, что и при анализе точности классификации. Фактор типа стимула значимо влияет на амплитуду П300 в отведениях О1, РО3, РО7, Т6. Фактор окрашенности стимула влияет на амплитуду П300 в отведениях О1, О2, РО3, РО4 и на латентность стимула в РО4, РО7, РО8, РОz. Для окрашенных стимулов латентность пика П300 меньше, что говорит о более быстром узнавании разноцветных стимулов. Увеличенная амплитуда ЗВП в ответ на стимулы, отличающиеся большим числом дискриминирующих признаков, скорее всего, свидетельствует о слаженной работе мозговых структур, участвующих в определении значимости стимула по разным каналам.

Анализ зрительных вызванных потенциалов при сравнении подвижных и неподвижных режимов. Фактор типа движения стимула не влияет на характеристики ЗВП. Тип стимула влияет как на амплитуду П300 (отведения О1, О2, Оz, РО7, РО8),

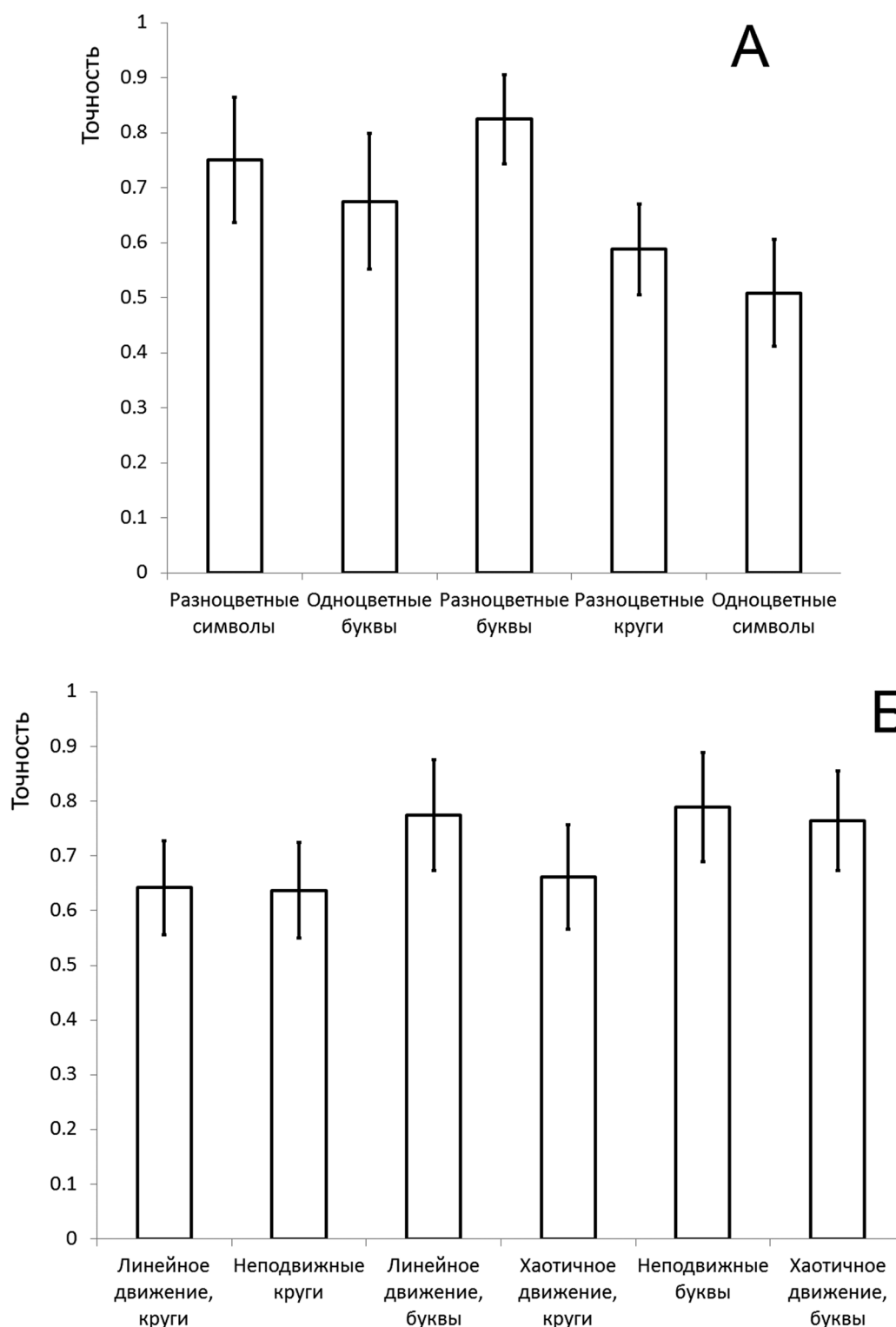


Рис. 1. Точность выбора команд испытуемыми во всех режимах стимуляции. А — исследование характеристик стимулов, Б — исследование характера подвижности стимулов. Указаны стандартные отклонения

так и на их латентность (отведения О1, РО4, РОz). Тенденция к повышению латентности пика П300 в ответ на движущиеся стимулы не значима. Амплитуды пика П300 выше для стимулов-букв, что соотносится с данными в стационарном режиме. Латентность пика оказалась ниже для стимулов-букв, причем различие больше для движущихся стимулов. Зрительные вызванные потенциалы пред-

ставлены на рис. 2Б. Эти данные позволяют сделать предположение о более легком восприятии буквенных стимулов, которое проявляется в более сложной визуальной задаче отслеживания.

Тестирование зависимости эффективности работы ИМК-П300 с предъявляемыми на экране компьютера символами-стимулами от их цвета, формы и подвижности показало, что ИМК-П300

наиболее точно работает со стимулами, во-первых, окрашенными в разные цвета, а во-вторых, различающимися между собой формой. Кроме того, точность распознавания в ИМК-П300 выше для стимулов, имеющих известное испытуемому значение (буквы). В этом есть какая-то теоретическая загадка, так как, если испытуемый подсчитывает случаи появления, к примеру, красной буквы А

среди нецелевых букв, раскрашенных в другие цвета, то ему проще отслеживать только цвет, а не детали буквы. Тем не менее, гомогенный красный круг детектировался в нейроинтерфейсе хуже, чем красная буква или пиктограмма, предъявляемые в таком же круге. По-видимому, сочетание специфичности цвета и структуры в таком целевом мультимодальном стимуле более сильно, чем в мономодальном

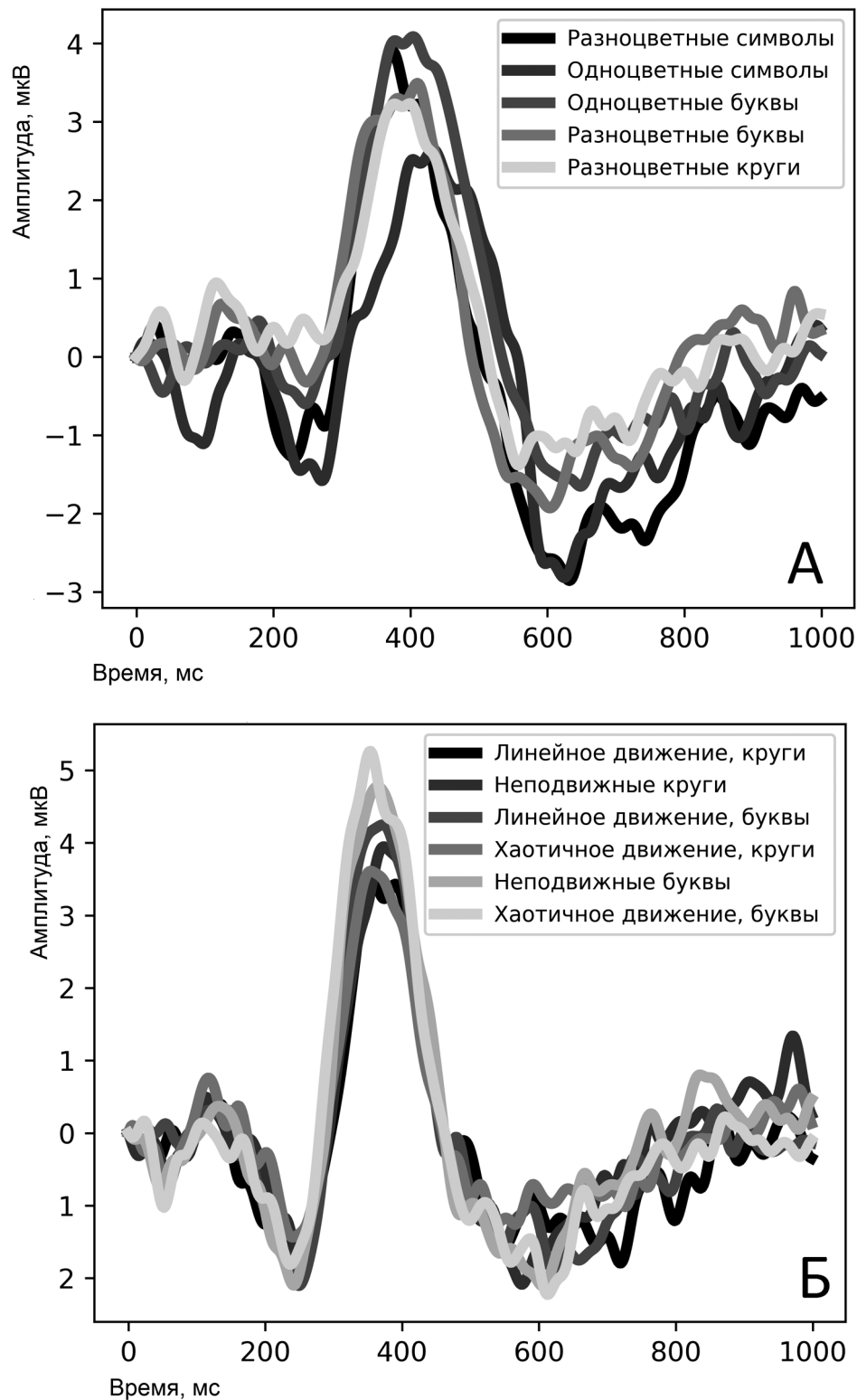


Рис. 2. Разностные зрительные вызванные потенциалы в отведении О1 при исследовании характеристик (А) и подвижности (Б) стимулов

стимуле, активирует процессы восприятия когнитивного уровня, что в конечном итоге приводит к изменению характеристик ЗВП и более надежному срабатыванию ИМК-П300.

Таким образом, полученные при конструировании стимульной среды для ИМК-П300 данные позволяют рекомендовать использование мульти-

модальных стимулов, сочетающих в себе одновременно специфические цветовые и структурные компоненты, что может обеспечить пользователям более комфортную и длительную работу в контуре ИМК-П300.

Работа выполнена при поддержке гранта Фонда содействия инновациям № 11413.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Powers J.C., Bieliaieva K., Wu S., Nam C.S. The human factors and ergonomics of P300-based brain-computer interfaces // *Brain Sci.* 2015. Vol. 5. N 3. P. 318–356.
2. Farwell L.A., Donchin E. Talking off the top of your head: toward a mental prosthesis utilizing event-related brain potentials // *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 1988. Vol. 70. N 6. P. 510–523.
3. Polich J. Updating P300: an integrative theory of P3a and P3b // *Clin. Neurophysiol.* 2007. Vol. 118. N 10. P. 2128–2148.
4. Jin J., Allison B.Z., Kaufmann T., Kübler A., Zhang Y., Wang X., Cichocki A. The changing face of P300 BCIs: a comparison of stimulus changes in a P300 BCI involving faces, emotion, and movement // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 11. e49688.
5. Guger C., Daban S., Sellers E., Holzner C., Krausz G., Carabalona R., Gramatica F., Edlinger G. How many people are able to control a P300-based brain-computer interface (BCI)? // *Neurosci Lett.* 2009. Vol. 462. N 1. P. 94–98.
6. Kaplan A.Ya. Neurophysiological Foundations and Practical Realizations of the Brain-Machine Interfaces the Technology in Neurological Rehabilitation // *Hum. Physiol.* 2016. Vol. 42 N 1 P. 103–110.
7. Jin J., Allison B.Z., Wang X., Neuper C. A combined brain-computer interface based on P300 potentials and motion-onset visual evoked potentials // *J. Neurosci. Methods.* 2012. Vol. 205. N. 2. P. 265–276.
8. Guo F., Hong B., Gao X., Gao S. A brain-computer interface using motion-onset visual evoked potential // *J. Neural Eng.* 2008. Vol. 5. N 4. P. 477–485.
9. Acqualagna L., Treder M.S., Schreuder M., Blankertz B. A novel brain-computer interface based on the rapid serial visual presentation paradigm // *Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), 2010 Annual International Conference of the IEEE.* Buenos Aires: IEEE, 2010. P. 2686–2689.
10. Yeh Y.Y., Lee D.S., Ko Y.H. Color combination and exposure time on legibility and EEG response of icon presented on visual display terminal // *Displays.* 2013. Vol. 34. N 1. P. 33–38.
11. Salvaris M., Cinel C., Citi L., Poli R. Novel protocols for P300-based brain-computer interfaces // *IEEE T. Neur. Sys. Reh.* 2012. Vol. 20. N 1. P. 8–17.
12. Proverbio A.M., Burco F., del Zotto M., Zani A. Blue piglets? Electrophysiological evidence for the primacy of shape over color in object recognition // *Cognitive Brain Res.* 2004. Vol. 18. N 3. P. 288–300.
13. Ganin I.P., Shishkin S.L., Kaplan A.Y. A P300-based brain-computer interface with stimuli on moving objects: four-session single-trial and triple-trial tests with a game-like task design // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 10. e77755.
14. Tang J., Zhou Z., Liu Y. A 3D visual stimuli based P300 brain-computer interface: for a robotic arm control // *Proceedings of the 2017 International Conference on Artificial Intelligence, Automation and Control Technologies.* Wuhan: ACM, 2017, P. 18.
15. Seabold S., Perktold J. Statsmodels: Econometric and statistical modeling with Python // *Proceedings of the 9th Python in Science Conference.* Austin: SciPy society, 2010. Vol. 57. P. 61.

Поступила в редакцию
25.01.2018

Принята к печати
15.03.2018

PHYSIOLOGY

VISUAL STIMULI FOR P300-BASED BRAIN-COMPUTER INTERFACES: COLOR, SHAPE, MOBILITY

R.K. Grigoryan^{1,*}, E.U. Krysanova¹, D.A. Kirjanov¹, A.Ya. Kaplan^{1,2}

¹Department of Human and Animal Physiology, School of Biology,

Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

²Lobachevskii Nizhny Novgorod State University, Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

*e-mail: grraph.bio@gmail.com

The purpose of this study was to identify the impact of different discriminative features of stimuli in P300 brain-computer interface paradigm on overall performance and evoked potentials. It has been shown, that stimuli sets with greater number of discriminative features yield better target selection accuracy. Target selection accuracy was significantly higher for stimuli that differ from each other by color, shape and semantics. Highest performance was achieved with stimuli set containing largest number of discriminative features, namely set of 9 different colored letters. This result is mainly due to higher mean P300 peak amplitude for stimuli sets that contain more discriminative features. The results of the study can be used for designing better user experience in brain-computer interfacing (BCI). Movement of stimuli presentation point and

characteristics of this movement (linear or pseudorandom) didn't have any impact on BCI performance. This result is promising for future BCI designs with rapid serial visual presentation, using mobile robots or augmented reality as stimuli presentation environment.

Keywords: brain-computer interfaces, electroencephalography, visual evoked potentials, psychophysiology, stroke, speech disorders

Сведения об авторах

Григорян Рафаэль Каренович — асп. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: ggraph.bio@gmail.com

Крысанова Екатерина Юрьевна — асп. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: katerinakry@mail.ru

Кириянов Даниил Алексеевич — асп. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: daniel.kirjanov@gmail.com

Каплан Александр Яковлевич — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: akaplan@mail.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. экспер. 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., Gavrillo V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski 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., Борзых 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).

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>.