

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

№ 1 • 2016 • ЯНВАРЬ — МАРТ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

От редакционной коллегии

Моргунова Г.В., Хохлов А.Н., Кирпичников М.П. К 70-летию юбилею журнала “Вестник Московского университета”. Новости от биологов 3

Геронтология

Стефанова Н.А., Колосова Н.Г. Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера 6

Хохлов А.Н. Какое старение у дрожжей “правильное”? 14

Биохимия

Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. Анти-HER2-фототоксин на основе флавопротеида miniSOG вызывает окислительный стресс и некроз HER2-положительных раковых клеток 17

Самуилов В.Д., Киселевский Д.Б. Салицилгидроксамат усиливает НАДН-оксидазную активность пероксидазы в суспензиях митохондрий и хлоропластов гороха 23

Иммунология

Шемчукова О.Б., Дементьева И.Г., Варламов Н.Е., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Алиев Т.К., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Свешников П.Г. Получение и характеристика моноклональных антител против гликопротеина вируса Эболы 29

Молекулярная биология

Армеев Г.А., Горковец Т.К., Ефимова Д.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Моделирование структуры ДНК-белковых комплексов с использованием экспериментальных данных по резонансному переносу энергии и перекисному окислению 35

Волох О.И., Шей Ф.-К., Карлова М.Г., Трифонова Е.С., Студитский В.М., Соколова О.С. Исследование прохождения РНК-полимеразы через нуклеосому методом электронной криомикроскопии 41

Вирусология

Кондакова О.А., Бутенко К.О., Скурат Е.В., Дрыгин Ю.Ф. Молекулярная диагностика инфекций Y-вирусом и вирусом скручивания листьев картофеля методом иммунохроматографии 46

Петрова Е.К., Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Кондакова О.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Изучение сигнала сборки вирусных рибонуклеопротеидов у потексвирусов 52

Биофизика

Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Беленикина Н.С., Рубин А.Б. LOV- и BLUF-флавопротеины: регуляторные фоторецепторы микроорганизмов и фотосенсорные активаторы в оптогенетических системах 57

Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Сарычева Н.Ю., Дружко А.Б., Калихевич В.Н., Каменский А.А. Влияние тетрапептида тафцина на внутриклеточный pH перитонеальных макрофагов мышей 66

Микробиология

Осмоловский А.А., Попова Е.А., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Фибринолитическая и коллагенолитическая активность внеклеточных протеиназ штаммов грибов *Aspergillus ochraceus* L-1 и *Aspergillus ustus* 1 71

CONTENTS

Editorial

- Morgunova G.V., Khokhlov A.N., Kirpichnikov M.P.* To the 70th anniversary of the journal
“Vestnik Moskovskogo universiteta”. News from biologists 3

Gerontology

- Stefanova N.A., Kolosova N.G.* Evolution of understanding of Alzheimer’s disease pathogenesis 6
Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? 14

Biochemistry

- Shilova O.N., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Deyev S.M.* Anti-HER2 phototoxin based on flavoprotein miniSOG causes oxidative stress and necrosis on HER2-positive cancer cells 17
Samuilov V.D., Kiselevsky D.B. Salicylhydroxamic acid accelerates the NADH-oxidase activity of peroxidase in suspensions of pea mitochondria and chloroplasts 23

Immunology

- Schemchukova O.B., Dement’eva I.G., Varlamov N.E., Pozdnyakova L.P., Bokov M.N., Aliev T.K., Panina A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Sveshnikov P.G.* Development and characterization of monoclonal antibodies to Ebola virus glycoprotein 29

Molecular biology

- Armeev G.A., Gorkovets T.K., Efimova D.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K.* Modeling of protein – DNA complexes geometry utilising FRET and footprinting data 35
Volokh O.I., Hsieh F.-K., Karlova M.G., Trifonova E.S., Studitsky V.M., Sokolova O.S. Study of RNA polymerase transcription through nucleosome by cryo-electron microscopy approach 41

Virology

- Kondakova O.A., Butenko K.O., Skurat E.V., Drygin Yu.F.* Molecular diagnostics of potato infections with PVY and PLRV by immunochromatography 46
Petrova E.K., Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kondakova O.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Study of potexvirus ribonucleoproteins’ signal of assembly 52

Biophysics

- Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Belenikina N.S., Rubin A.B.* LOV and BLUF flavoproteins: regulatory photoreceptors of microorganisms and photosensory actuators in optogenetic systems. 57
Pirutin S.K., Turovetsky V.B., Sarycheva N.Y., Druzhko A.B., Kalihevich V.N., Kamensky A.A. Influence of tetrapeptide tuftsin on intracellular pH of mouse peritoneal macrophages 66

Microbiology

- Osmolovskiy A.A., Popova E.A., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S.* Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. 71

ОТ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ

К 70-ЛЕТНЕМУ ЮБИЛЕЮ ЖУРНАЛА “ВЕСТНИК МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА”. НОВОСТИ ОТ БИОЛОГОВ

Г.В. Моргунова, А.Н. Хохлов*, М.П. Кирпичников

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

В сентябре 2016 г. журнал “Вестник Московского университета” отмечает 70-летие со дня выхода в свет своего первого номера. Наше издание по праву можно считать одним из старейших вузовских научных журналов России. Сегодня “Вестник Московского университета” представлен 27 отдельными журналами (“сериями”), среди которых и наш — “Серия 16. Биология” (ВМУ-Б).

На протяжении всего времени существования издания в его структуре происходило очень много изменений. Выделялись самостоятельные серии, менялся их формат, появлялись переводные версии. Но в основном эти журналы публиковали статьи наших сотрудников и аспирантов, обеспечивая информирование мирового научного сообщества о достижениях и успехах ученых МГУ. Однако на сегодняшний день, в условиях появления огромного количества “конкурентов” (число научных журналов за несколько десятилетий увеличилось во много раз) и возрастания роли мировых систем глобального цитирования ситуация начала резко меняться. Практически все научные издания вынуждены идти в ногу со временем и принимать во внимание требования, предъявляемые к ним стандартами, установленными, в частности, такими гигантами в области наукометрического индексирования, как Scopus и Web of Science. Сложилась мировая практика, согласно которой при выделении грантов на научные исследования принимаются во внимание главным образом научные публикации, удовлетворяющие указанным требованиям. Хотя на 100% согласиться с таким подходом нельзя, но игнорировать это обстоятельство в настоящее время просто невозможно.

В 2014 г. ВМУ-Б выиграл Конкурс по государственной поддержке программ развития и продвижению российских научных журналов в международное научно-информационное пространство, организованный Министерством науки РФ и проведенный “Национальным Электронно-Информационным Консорциумом” (НЭИКОН). Обойдя более 500 журналов-конкурентов, ВМУ-Б стал одним из двух победителей в разделе “Биология”, получив финансовую поддержку на 3 года. При этом по условиям гранта мы должны были провести целый ряд реформ нашего издания, в целом соответствующих вышеуказанным требованиям систем глобальных индексов цитирования.

Ориентируясь на такие требования, мы многое изменили в политике и формате ВМУ-Б. Самое главное — сегодня ВМУ-Б открыт для всех ученых независимо от места их работы. Прислать нам свою статью может специалист из любой научной организации, в том числе и зарубежной. Более того, мы теперь сами постоянно заказываем обзоры на актуальные темы ведущим специалистам-биологам, причем не только из России, но и тем, кто работает за границей. В связи с этим на первой странице каждой статьи теперь приводится подробная информация о местах работы авторов с указанием всех адресов и контактных данных. Эта же информация дублируется в англоязычном резюме. Формат статей приведен, по возможности, в соответствие с международными стандартами.

С целью уменьшения “локальности” редколлегии ВМУ-Б, мы создали редакционный совет, в который вошли “внешние” специалисты как из России, так и из-за рубежа. Среди них:

- Анисимов Владимир Николаевич — член-корреспондент РАН, руководитель отдела канцерогенеза и онкогеронтологии НИИ онкологии имени Н.Н. Петрова Министерства здравоохранения РФ (Санкт-Петербург);

- Васецкий Егор Сергеевич — соруководитель лаборатории исследований организации клеточного ядра и моделирования заболеваний Института рака имени Густава Русси (Вильжюиф, Франция);

- Васильев Андрей Валентинович — директор Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН (Москва);

- Колосова Наталья Гориславовна — заведующая сектором молекулярных механизмов старения Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск);

- Наумов Александр Дмитриевич — профессор кафедры радиологии и биофизики Витебской государственной академии ветеринарной медицины (Витебск, Беларусь);

- Недоспасов Сергей Артурович — член-корреспондент РАН, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (Москва);

- Студитский Василий Михайлович — соруководитель лаборатории эпигенетики рака Центра исследований рака Фокс Чейз (Филадельфия, США).

Предполагается, что члены редакционного совета будут принимать активное участие в определении политики ВМУ-Б, периодически публиковать у нас как свои статьи, так и статьи своих коллег, а также оказывать нам помощь в рецензировании поступающих в редакцию рукописей.

Кстати, о рецензировании. За последнее время мы в несколько раз расширили нашу базу рецензентов, привлекая для этой работы все большее число специалистов из других организаций. И, пользуясь случаем, мы хотели бы выразить огромную благодарность нашим коллегам за их неоценимую безвозмездную помощь в отборе, оценке и подготовке статей для ВМУ-Б!

Необходимо подчеркнуть, что строгое независимое “слепое” рецензирование работ позволило нам более объективно подходить к анализу качества поступающих в редакцию рукописей. Это привело к значительному увеличению процента отклоняемых статей (до 50–60%).

С 1 января 2016 г. мы в 1,5 раза увеличили объем нашего издания. Надеемся, что это позволит нам еще больше сократить сроки публикации, которые, впрочем, и сейчас уже составляют лишь 3–6 месяцев.

Благодаря предоставленной нам, как победителям упомянутого Конкурса Министерства науки РФ, поддержке мы смогли с помощью компании НЭИКОН на их платформе Elpub создать двуязычный сайт ВМУ-Б (<http://vestnik-bio-msu.elpub.ru> — на момент написания данной статьи функционирует в тестовом режиме). Он содержит, в том числе, и раздел “Электронная редакция”, который в перспективе должен обеспечить автоматический прием статей от авторов и отслеживание их дальнейшей судьбы. На сайте размещена информация о журнале и редакционной коллегии, требованиях к статьям, редакционной политике, этике научных публикаций и др. Обеспечивается поиск публикаций по ключевым словам.

В 2015 г. был наконец-то создан электронный архив русскоязычных статей ВМУ-Б, пока — глубиной в 14 лет. В ближайшее время планируется дополнить его статьями из более ранних выпусков — вплоть до 1946 г.

В 2015 г. члены редколлегии ВМУ-Б Г.В. Моргунова и А.Н. Хохлов в рамках выполнения наших обязательств по “журнальному” гранту Министерства науки РФ приняли участие в 4-й Международной научно-практической конференции “Научное издание международного уровня — 2015: современные тенденции в мировой практике редактирования, издания и оценки научных публикаций” (Санкт-Петербург, 26–29 мая), на которой выступили с докладом “О некоторых альтернативных подходах к оценке эффективности научных журналов”. В сообщении был предложен модифицированный метод расчета показателя количества скачиваний статей, позволяющий, по мнению ав-

торов, достаточно адекватно оценивать эффективность конкретного научного журнала. Метод был проиллюстрирован на примере анализа количества скачиваний в 2009–2013 гг. с сайта издательства “Шпрингер” англоязычных статей из 44 российских переводных журналов (главным образом — биологической направленности), в том числе и всех переводных “Вестников МГУ”. Был сделан вывод о достаточно слабой корреляции предложенного показателя и стандартного импакт-фактора. Сделано заключение о целесообразности совместного использования обоих индексов при наукометрическом анализе научных изданий.

В рамках того же “журнального” гранта в декабре 2015 г. на биологическом факультете МГУ мы, совместно с НЭИКОН, организовали семинар для сотрудников, аспирантов и студентов университета, посвященный современной ситуации с публикациями научных работ. На этом семинаре специалисты рассказали авторам, как не попасться на удочку “журналов-паразитов”, найти подходящее издание для своей научной публикации, подготовить статью к сдаче в редакцию и как пользоваться электронными ресурсами, которые доступны сотрудникам МГУ. В частности, подробно были рассмотрены вопросы, касающиеся плюсов и минусов публикаций в российских научных изданиях. В семинаре в качестве лекторов приняли участие Ольга Владимировна Кириллова — директор УКЦ “Школа НЭИКОН”, президент российской Ассоциации научных редакторов и издателей, авторизованный эксперт-консультант Scopus, Армен Юрьевич Гаспарян — член Европейской ассоциации научных редакторов и Всемирной ассоциации редакторов медицинских журналов, Татьяна Александровна Калинина — заведующая отделом электронных ресурсов Научной библиотеки МГУ, а также заместитель главного редактора ВМУ-Б Александр Николаевич Хохлов.

На сегодняшний день наш журнал, состоящий из двух версий — русскоязычной “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” и англоязычной “Moscow University Biological Sciences Bulletin”, — входит в список изданий, рекомендованных ВАК, и индексируется целым рядом баз данных — в первую очередь, Scopus. Он также присутствует в Google Scholar, CAB International, Academic OneFile, CAB Abstracts, Gale, Global Health, Health Reference Center Academic, OCLC, SCImago, Summon by ProQuest, Ulrich’s, EBSCO, EastView и РИНЦ.

Хотелось бы также отдельно отметить, что в 2015 г. русскоязычная версия журнала вошла в RSCI (Russian Sciences Citation Index) на платформе Web of Science, так что пользователям самой известной системы индексов глобального цитирования теперь стали доступны статьи из ВМУ-Б.

В прошедшем году на сайтах Scopus и Scimago Journal & Country Rank обновлена информация об

индексируемой ими англоязычной версии нашего издания. Можно видеть, что практически все наши показатели стабильно растут. Согласно данным Scimago Journal & Country Rank журнал “Moscow University Biological Sciences Bulletin” в 2014 г. вошел в третью четверть по всем трем своим зафиксированным в системе областям науки, а именно — “Biochemistry, Genetics and Molecular Biology”, “Environmental Science”, “Agricultural and Biological Sciences”.

Таким образом, к 70-летию юбилею мы подходим с вполне значимыми достижениями. При этом мы, конечно, понимаем, что еще очень много над чем нужно работать. Хотелось бы пригласить наших коллег из самых разных научных организаций к сотрудничеству в качестве как авторов, так и рецензентов или членов редколлегии/редсовета. Будем рады любым рекомендациям, направленным на улучшение ВМУ-Б и повышение его “читабельности” в мировом научном сообществе.

Поступила в редакцию
10.12.2015

**TO THE 70TH ANNIVERSARY OF THE JOURNAL
“VESTNIK MOSCOVSKOGO UNIVERSITETA”. NEWS FROM BIOLOGISTS**

G. V. Morgunova, A. N. Khokhlov*, M. P. Kirpichnikov

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

Сведения об авторах:

Моргунова Галина Васильевна — ответственный секретарь редакционной коллегии журнала “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология”. Тел.: 8-495-938-27-01; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

Хохлов Александр Николаевич — заместитель главного редактора журнала “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология”. Тел.: 8-495-938-27-01; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Кирпичников Михаил Петрович — главный редактор журнала “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология”. Тел.: 8-495-938-27-01; e-mail: kirpichnikov@inbox.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 577.29

**ЭВОЛЮЦИЯ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ
О ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА****Н.А. Стефанова¹, Н.Г. Колосова^{1,2,*}**

¹ Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, СО РАН;
Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

² кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет;
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

* e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Болезнь Альцгеймера (БА) — нейродегенеративное заболевание, которое становится причиной деменции на фоне атрофических изменений мозга. Различают две формы БА: наследственную (НФБА; ~5% всех случаев заболевания, развивается до 65 лет, чаще — до 40–50 лет) и спорадическую (СФБА; ~95% всех случаев заболевания, развивается после 65 лет). Выявление генетических детерминант развития НФБА, доказательство нейротоксического действия пептида бета-амиоида (amyloid beta, A β) как центрального события в каскаде патологических процессов существенно расширили представления о молекулярно-генетических механизмах заболевания. Однако вопрос о том, является ли накопление A β иницирующим фактором развития наиболее распространенной СФБА остается открытым. Растет количество аргументов в пользу того, что гиперпродукция A β становится вторичным, сопутствующим событием патологических процессов БА: синаптической недостаточности, усиленного фосфорилирования тау-белка, нейровоспаления, гибели нейронов и снижения когнитивных функций. Как один из иницирующих факторов риска развития БА рассматривается митохондриальная дисфункция, следствием которой становится снижение синтеза АТФ, развитие окислительного стресса. Однако конкретные молекулярно-генетические механизмы развития БА остаются неясными. Это обусловлено отсутствием адекватных биологических моделей для изучения механизмов заболевания и объективной оценки эффективности патогенетически обоснованных способов профилактики и лечения БА.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, гиперфосфорилирование тау-белка, синапсы, нейровоспаление, митохондриальная дисфункция, обзор.

Болезнь Альцгеймера (БА) — наиболее распространенная сенильная деменция, которая развивается на фоне атрофических изменений мозга [1]. Эффективных способов профилактики и лечения БА нет, заболеваемость растет по мере увеличения продолжительности жизни и старения населения развитых и развивающихся стран. По данным ВОЗ, в мире более 35 млн человек страдают БА, а к 2050 г., по прогнозам, таких больных будет более 115 млн [2]. Принципиальным фактором риска развития БА является пожилой возраст. Проблемы ранней диагностики БА обусловлены, прежде всего, сходством проявлений снижения когнитивных способностей у больных БА и у людей при нормальном старении. Так, незначительные нарушения памяти на недавние события, трудности в запоминании новой информации являются ранними симптомами проявлениями БА. Прогрессирующее ухудшение памяти, интеллекта в течение всего нескольких последующих лет, протекающее у людей с БА на фоне атрофии мозга, приводят к полному распаду личности и фатальному исходу, как правило, от различного рода осложнений, например, пневмонии [3].

Различают две формы БА: наследственную (НФБА), которая развивается до 65 лет, чаще — до 40–50 лет, и спорадическую (СФБА), которая развивается после 65 лет. Ключевыми признаками БА становятся накопление нейротоксических форм пептида бета-амиоида (amyloid beta, A β), приводящее к образованию амилоидных бляшек, гиперфосфорилирование тау-белка и формирование нейрофибриллярных клубков, синаптическая недостаточность, а также гибель нейронов, воспаление, митохондриальная дисфункция и окислительный стресс. В ходе усиленных исследований патогенеза БА в течение последних 20 лет было выдвинуто несколько гипотез её этиологии, определены генетические факторы риска развития заболевания, однако конкретные молекулярно-генетические механизмы заболевания остаются неясными. В условиях прогрессирующего увеличения продолжительности жизни и связанного с ним роста количества людей, страдающих БА, выяснение фундаментальных механизмов заболевания и разработка способов его коррекции приобрели особую актуальность.

Генетические факторы риска болезни Альцгеймера

Генетическая предрасположенность — четко установленный фактор риска БА [4, 5]. Первым выявленным геном, ассоциированным с БА, стал кодирующий белок предшественник бета-амилоида *APP* в локусах 21q21.2–21q21.3 [6]. Обнаружено 25 патогенетических мутаций *APP*, ассоциированных с БА, с которыми связано около 13–16% всех случаев заболеваемости НФБА [4]. Дупликации *APP*, которые становятся причиной НФБА, обнаружены и у людей с синдромом Дауна [7], у которых характерная для БА деменция развивается после 40 лет.

Большинство случаев НФБА (по разным данным от 18 до 70%) связано с мутацией в локусе 14q24.3 гена *PSEN1*, кодирующего белок пресенилин-1, компонента γ -секретазы [4]. На сегодня известно 185 мутаций *PSEN1*, при которых заболевание развивается в среднем в возрасте 45 лет и быстро прогрессирует [4]. У больных НФБА с мутациями *PSEN2* в локусах 1q31–q42 (обнаружено 12 мутаций) заболевание развивается позже (в среднем в 54 года). Такие больные живут дольше и заболевание проявляется с более вариабельной пенетрантностью [8].

Важной вехой в исследовании патогенеза СФБА стало открытие роли гена, кодирующего аполипротеин Е (АпоЕ) [4]. Помимо своей главной функции — транспорта холестерина в центральной нервной системе (ЦНС) — АпоЕ также участвует в метаболизме А β , его агрегации и накоплении. Ген *APOE*, расположенный на 19-й хромосоме, имеет три аллеля: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$. Среди больных СФБА распространенность аллеля $\epsilon 4$ существенно выше, чем среди здоровых людей, что позволило рассматривать его присутствие как значимый фактор риска заболевания [6]. Однако у многих больных аллель $\epsilon 4$ отсутствует и, напротив, имеется у многих здоровых. Полагают, что *APOE* $\epsilon 2$ снижает риск развития БА [4].

Как фактор риска БА рассматривается и мутация в локусах 8p21–p12 кластерина (*CLU*) — другого аполипопротеина, участвующего в процессе клиренса А β [9]. Выявлена корреляция между повышением уровня *CLU* и скоростью снижения когнитивных способностей [10]. Другим геном-кандидатом, ассоциированным с БА, является *ABCA7* [4] — АТФ-связанный переносчик, который участвует в транспорте липидов через клеточную мембрану и может подавлять фагоцитоз. Согласно результатам полногеномного анализа ассоциаций (Genome-wide association studies), идентифицированные генетические факторы риска СФБА функционально можно разделить на три перекрывающиеся группы/пути [11]: 1) клеточно-синаптическое функционирование (*BIN1*, *PICALM*, *CD33* и *SORL1*), 2) иммунная система (*TREM2*, *CR1*, *CD33* и *CLU*) и 3) гены, связанные с метаболизмом липидов (*APOE*,

ABCA7, *CLU*). Непосредственное взаимовлияние этих путей, как и их связь с накоплением А β , определить достаточно трудно, но результаты недавних исследований показали, что развитие А β -патологии ассоциировано с изменением уровня белков, связанных с эндосомально/лизосомальной активностью, активацией микроглии, функциями синапсов [12]. В крайне редких случаях развитие СФБА может быть ассоциировано с мутацией гена, кодирующего белок предшественник бета-амилоида (*APP*) (rs63750847) [4], а также *PSEN1*, *PSEN2* [13]. В ряду крайне редких выделяют также вариант rs75932628 в гене *TREM2*, участвующем в регуляции фагоцитарной активности и/или воспалительного ответа [4, 5].

Таким образом, обнаружение генов-кандидатов, ответственных за развитие БА, создает основу для формирования представлений о природе этого заболевания, однако функциональная роль выявленных мутаций и полиморфизмов в патогенезе БА для большинства генов остается неизвестной.

Патогенез болезни Альцгеймера

Накопление А β как центральное событие в патогенезе болезни Альцгеймера

На основании исследований генетических форм БА и синдрома Дауна, а также выявленных нейротоксических эффектов А $\beta 42$, в начале 90-х гг. была сформулирована гипотеза «амилоидного каскада» [12], которая доминирует и сегодня. Согласно этой гипотезе, накопление в результате нарушения процессинга *APP* токсического А β -пептида прямо или опосредованно запускает каскад патологических процессов: нарушение функций синапсов и клеточной коммуникации, активацию клеток глии, нарушения ионного гомеостаза, окислительные повреждения, дисфункцию митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, образование нейрофибриллярных клубков и, в конечном счете, развитие деменции [2, 14].

А β -пептиды длиной 36–43 аминокислоты — естественные продукты метаболизма *APP*, представителя семейства крупных трансмембранных белков [7]. В отличие от *APP*, остальные в высокой степени гомологичные с *APP* представители этого семейства белков — *APLP1* и *APLP2* — не содержат последовательности А β . В нейронах *APP* секретируется в больших количествах и метаболизируется крайне быстро [6]. Протеолиз *APP* осуществляется по двум альтернативным путям, по одному из которых генерируется А β . Не амилоидный путь инициируется α -секретазой, которая расщепляет *APP* на большой внеклеточный домен *APP* (sAPP α) и концевой фрагмент С83, который затем расщепляется γ -секретазой на внеклеточный белок р3 и амилоидный внутриклеточный домен (AICD). Амилоидный путь инициируется β -секретазой, которая

расщепляет APP на короткий внеклеточный домен sAPP β и концевой фрагмент C99, который также под воздействием γ -секретазы образует A β и AICD. После расщепления α - и β -секретазами sAPP α и sAPP β , соответственно, секретируются фрагменты APP [1, 4].

APP синтезируется и гликолизуется в эндоплазматическом ретикулуме, затем переносится в комплекс Гольджи для созревания перед транспортом к клеточной поверхности. Молекула APP сразу после синтеза может активно фосфорилироваться и затем продвигается к мембране, где от нее отщепляются A β -пептиды, среди которых преобладают мономеры A β 40 [4, 6]. Предполагается, что в физиологических условиях A β участвует в модуляции ионных каналов, активации киназ, регуляции транспорта холестерина, защищает другие белки от окислительных повреждений, участвует в процессах обучения и памяти [7]. Нарушение баланса между продукцией и клиренсом A β приводит к его усиленному накоплению в мозге. A β спонтанно агрегируется в несколько физических форм. Одна из них состоит из олигомеров (от 2 до 6 пептидов), которые объединяются в промежуточные группы [15]. Также A β может образовывать фибриллы, которые собираются в β -листы, состоящие из нерастворимых тяжелей, и накапливаться, формируя бляшки, на стенках церебральных сосудов и в паренхиме головного мозга. В настоящее время растворимые олигомеры и промежуточные амилоиды рассматриваются как наиболее нейротоксические формы A β [16].

Чрезвычайная токсичность A β для нейронов впервые была показана в работах *in vitro* [7] и подтверждена в исследованиях *in vivo*. Так, показано, что гиперэкспрессия мутантного человеческого APP у мышей вызывает к возрасту 4–6 мес. развитие деструктивных изменений нейронов и протекает на фоне накопления A β -пептида, дисфункции синапсов [17] и воспалительных процессов [18]. Регуляция уровня A β осуществляется инсулиновой протеазой и неприлизин-подобной протеазой. Инсулиновая протеаза участвует в процессах деградации небольших пептидов, таких как инсулин и мономеры A β [19]. Неприлизин — заякоренная в мембране эндопептидаза цинка — участвует в процессах деградации мономеров и олигомеров A β [20]. Снижение уровня неприлизина рассматривается как причина накопления A β в мозге и гибели нейронов, которую связывают с активацией олигомерными формами A β кальциевых каналов и облегченным входом Ca²⁺ в нейроны через NMDA-рецепторы и, соответственно, активацией свободнорадикального окисления липидов мембран нейронов [21]. По другим данным, гибель нейронов может быть следствием активации APP и A β пептидами экспрессии генов-индукторов апоптоза [22].

Токсическое накопление A β как иницирующий фактор развития болезни Альцгеймера: аргументы за и против

Доказательство нейротоксического действия A β , обусловленного его способностью напрямую или опосредованно запускать различные внутриклеточные сигнальные каскады [7], послужило весомым основанием считать накопление A β центральным событием в патогенезе БА. Закономерно, что были предприняты масштабные исследования, направленные на поиск препаратов, способных вызывать снижение уровня A β и содержания амилоидных бляшек в мозге [7]. Они существенно расширили представления о молекулярно-генетических механизмах заболевания, но ожиданий не оправдали и поставили на повестку дня вопрос о том, является ли накопление A β иницирующим фактором развития БА. Действительно, в последние годы растет количество аргументов в пользу того, что гиперпродукция A β не становится пусковым моментом в развитии наиболее распространенной СФБА [3, 23]. В этой связи далее мы остановимся на результатах исследований, поддерживающих различные представления о патогенезе заболевания.

Диффузные и фибриллярные бляшки, состоящие в основном из пептида A β , и нейрофибриллярные клубки — конечные продукты гиперфосфорилирования тау-белка — основные нейропатологические проявления БА [12], роль которых в патогенезе БА широко обсуждается. Ещё в ранних работах была показана корреляция между наличием амилоидных бляшек и когнитивными нарушениями [24]. Но позднее было установлено, что снижение когнитивных способностей в большей степени коррелирует с увеличением количества нейрофибриллярных клубков, уменьшением плотности синапсов и гибелью нейронов [25]. Действительно, токсическое действие агрегированных и олигомерных форм тау-белка на нейроны доказано в исследованиях *in vitro* [26]. Тем не менее, накапливается все больше свидетельств того, что образование нейрофибриллярных клубков в нейронах становится лишь маркерным событием в нейродегенеративных процессах [25]. Все больше подтверждений находит и представление о том, что амилоидные бляшки не являются причиной гибели нейронов и синапсов, как это считалось ранее [3]. Так, в пользу этих заключений свидетельствуют результаты исследования 97 пожилых людей без клинических симптомов БА (средний возраст 84 года) [27]. В зависимости от использованного критерия у 20–40% когнитивно полноценных пожилых людей были выявлены амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубки. С возрастом у них росло количество нейрофибриллярных клубков, но связи между формированием бляшек и возрастом выявлено не было.

Формирование нейрофибриллярных клубков характерно и для других типов таупатий, но принято считать, что их наличие вкупе с амилоидными

бляшками является обязательным нейрпатологическим маркером БА [12]. При этом опосредованная Аβ патология по времени предшествует развитию тау-ассоциированной нейрпатологии. Аβ может контролировать расщепление, фосфорилирование тау-белка и, соответственно, принимать непосредственное участие в генерации нейрофибриллярных клубков. Фосфорилирование тау регулируется рядом киназ, включая циклинзависимую киназу 5 (Cdk5) и изоформу киназы гликогенсинтазу-b (GSK3b), при этом обе киназы могут быть активированы Аβ-пептидом [6]. Стимуляция расщепления тау растворимыми формами Аβ-пептида может происходить путем активации каспазы 3, каспазы 9 и кальпаина [6]. В то же время предполагается, что активация каспаз может быть ответной реакцией на токсические уровни гиперфосфорилированного тау-белка [28]. Эти результаты послужили основанием считать тау-белок важным медиатором нейротоксических эффектов Аβ.

В норме тау-белок обеспечивает стабильность микротрубочек, участвует в транспорте клеточных органелл и везикул, регулирует рост аксонов и дендритов [25]. N-концевой фрагмент тау-белка взаимодействует с плазматической мембраной и цитоскелетными белками нейрона, принимает участие в сигнальной трансдукции. Подобно олигомерам пептида Аβ, нерастворимые формы гиперфосфорилированного тау-белка агрегируются, что приводит к структурным нарушениям микротрубочек и их дезорганизации [26]. Следствием этого становится развитие транспортного коллапса, блокада транспортных путей в нейроне и, в конечном счете, гибель клетки. Окислительный стресс, нарушение фолдинга и деградации поврежденных белков, регуляции клеточного цикла — типичные проявления старения мозга — способствуют усиленному накоплению Аβ- и тау-белка при БА [23].

Синаптическая недостаточность и гибель нейронов становятся одними из наиболее ранних событий при развитии БА [25]. По мере прогрессирования заболевания плотность синапсов диспропорционально снижается относительно нейронов, и её снижение коррелирует с развитием деменции [29]. В нано- и микромолярных концентрациях Аβ вызывает нарушение возбуждающей синаптической передачи сигнала, ингибирует долговременную потенцию [7, 17]. Эффекты Аβ могут быть обусловлены его токсическим действием на рецепторы глутаматергических нейромедиаторов. Аβ облегчает эндоцитоз рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAr) и α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионовой кислоты (AMPAr), что приводит к нарушению баланса между долговременной потенцией и долговременной депрессией [1, 25]. Нарушение активности рецепторов глутамата приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция, который, в свою очередь, активирует кальцийейрин [30]. На животных — моделях с гиперэкспрессией APP — показано, что

снижение плотности синапсов и их дисфункция могут быть обусловлены нарушением динамики митохондрий в синапсах, их транспорта и функций [31]. Примечательно, что эти механизмы — кальциевая дисрегуляция, дисфункция митохондрий, регуляция Cdk5 киназы [32] и активация каспаз [33] — физиологически взаимосвязаны и могут быть опосредованы эффектами тау-белка.

Окислительный стресс и дисфункция митохондрий в патогенезе болезни Альцгеймера

В качестве одного из фундаментальных молекулярных механизмов патогенеза возраст-зависимых заболеваний, в том числе БА, рассматривается окислительный стресс — нарушение баланса в системах генерации и детоксикации активных форм кислорода (АФК). Митохондрии — основные источники АФК — становятся центральным звеном в цепи событий, приводящих к запуску окислительного стресса. Усиление генерации АФК при этом приводит к активации путей внутриклеточной передачи сигналов, ответственных за запуск программы адаптивного ответа клетки, который обеспечивается через индукцию или репрессию разных сочетаний редокс-зависимых генов [34]. Как показывают исследования последних лет, нарушения координации в редокс-зависимых сигнальных путях могут вносить больший вклад в старение, чем накопление окислительных повреждений макромолекул [35].

В последние годы становится очевидным, что дисфункция митохондрий может быть одним из ключевых факторов, инициирующих развитие БА [4]. Согласно гипотезе «митохондриального каскада» [36], снижение синтеза АТФ, нарушение баланса генерации и детоксикации АФК приводят к чрезмерной продукции Аβ, который, в свою очередь, может напрямую оказывать токсическое действие на митохондрии, усугубляя нейродегенеративные процессы. Запуск «порочного круга» нейродегенерации способствует гиперфосфорилированию тау-белка, дисфункции синапсов и апоптозу. Следствием митохондриальной дисфункции становится подавление энергоемких процессов в нейронах, повреждение свободными радикалами мембранных структур клеток, нейровоспаление, нарушение синаптической передачи сигналов, увеличение высвобождения глутамата из пресинаптических терминалей, снижение пластичности синаптических контактов и, в конечном счете, гибель нейронов [37, 38]. Усугубляет нейродегенеративные процессы способность Аβ запускать различные внутриклеточные сигнальные каскады. Так, в мозге больных БА Аβ накапливается в митохондриях и нарушает активность ферментов гликолиза и цикла Кребса, активизирует продукцию АФК [22]. Предполагается, что на начальных стадиях развития БА накопление Аβ и гиперфосфорилирование тау-белка может быть вызвано защитной реакцией клетки на окислительный стресс [39].

Примечательно, что тау-белок и Аβ действуют синергично, приводя к нарушению окислительного фосфорилирования, при этом на регуляцию активности комплекса I влияет тау-белок, а комплекса IV — Аβ [25]. Следствием прямого связывания Аβ и APP с митохондриальной мембраной становится нарушение энергетического метаболизма [22]. При этом APP накапливается преимущественно на каналах импорта белков из цитозоля в митохондриальный матрикс. Взаимодействуя с митохондриальной мембраной, APP формирует стабильные комплексы с транслоказой TOM40 и комплексы с TOM40/TIM23 (транслоказами внешней и внутренней митохондриальной мембран) [40]. Это обуславливает подавление импорта в митохондрии кодируемых ядерным геном белков: субъединиц IV и Vb цитохром-оксидазы, что приводит к увеличению продукции митохондриями перекиси водорода [40]. Связывание гема пептидом Аβ приводит к его дефициту в клетке, что способствует развитию нарушений в гем-содержащем IV комплексе дыхательной цепи митохондрий [41].

Окислительные повреждения, а также изменения структуры митохондриальных белков в результате накопления мутаций в мтДНК при развитии БА приводят к существенному снижению эффективности переноса электронов по дыхательной цепи и синтеза АТФ, к увеличению вероятности образования АФК и энергетическому дефициту [22]. В этих условиях интенсифицируются процессы перекисного окисления липидов, ведущие к нарушению структурной организации липидного бислоя мембран и дальнейшему нарушению важнейших клеточных функций, росту внутриклеточной концентрации ионов кальция, активации протеолитических ферментов, вызывающих деградацию белков цитоскелета. Все это способствует запуску апоптоза и снижению плотности нейронов. Активации высвобождения митохондриальных апоптотических факторов способствует и Аβ за счет прямого или опосредованного воздействия на регуляторные белки: p53, Akt, Bad, Bax, Bcl-x(L) и др. [42]. Увеличение интенсивности воздействия суицидных сигналов на митохондрии способствует снижению митохондриального трансмембранного потенциала, гиперпродукции АФК и высвобождению из митохондрий факторов, инициирующих механизмы реализации апоптоза.

Негативное влияние на функции митохондрий оказывают также и нарушения внутриклеточной динамики митохондрий, процессов их деления и слияния [25]. В тканях мозга больных БА обнаружено, что олигомерные формы Аβ взаимодействуют с динамин-подобным белком-1 (Drp1), ключевым белком, участвующим в процессе деления митохондрий [43]. Выявлены изменения экспрессии генов, вовлеченных в процессы деления митохондрий (DRP1 и FIS1) и их слияния (MFN1, MFN2, OPA1 и TOM40) [22, 43]. Ассоциированная с БА высокая активность митофагии в нейронах, как и ослабление

элиминации митохондрий со структурно-функциональными нарушениями, способствует смещению баланса между функционально полноценными и дефектными митохондриями в пользу последних.

Механизмы, инициирующие нарушение функций митохондрий, причинно-следственная связь между дисфункцией митохондрий и активацией токсического Аβ, гиперфосфорилированием тау-белка остаются недостаточно изученными. Такая ситуация обусловлена невозможностью исследовать эти вопросы на людях, тем более — на ранних доклинических стадиях развития у них БА, а также отсутствием адекватных биологических моделей. Работа по созданию моделей активно ведется с момента выявления генетических факторов БА (с 90-х гг. XX в.). Среди них доминируют моногенные: это или трансгенные животные, или животные с нокаутом генов, или животные с определенными мутациями [2]. Такой подход позволяет приблизиться к пониманию вклада конкретного гена в развитие признака, но не воспроизводит все фенотипические проявления такого заболевания полигенной природы как БА. Более того, все эти модели отличают повышение экспрессии генов и мутации, характерные для НФБА, на которую приходится лишь около 5% всех случаев заболевания. Создание новых моделей, воспроизводящих наиболее распространенную спорадическую форму БА — сложная задача, но именно такой подход представляется оптимальным для поиска и испытания новых способов терапии и профилактики.

Перспективной моделью СФБА может служить созданная в ИЦиГ СО РАН линия крыс OXYS, ускоренное старение мозга которых ассоциировано с развитием ключевых патогенетических и «клинических» признаков СФБА [44–50]. Их последовательность: дисфункция митохондрий, гиперфосфорилирование тау-белка, синаптическая недостаточность, деструктивные изменения нейронов, нарушения поведения и снижение когнитивных функций на ранних стадиях и их прогрессия на фоне повышения уровня APP, усиленного накопления Аβ и образование амилоидных бляшек в мозге — соответствует современным представлениям о патогенезе СФБА у людей. Отсутствие в геноме крыс OXYS характерных для ранней формы БА мутаций в генах *App*, *Psen1* и *Psen2* [49] дает возможность заключить, что исследования на этой уникальной модели СФБА позволят получить новые фундаментальные знания о молекулярно-генетических предпосылках развития заболевания, выявить его предикторы и проводить поиск новых потенциальных молекулярных мишеней для терапевтических воздействий, направленных на профилактику и, возможно, лечение заболевания.

Работа поддержана бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН VI.53.2.4, грантом Правительства Российской Федерации 14.B25.31.0033 и грантами РФФИ (15-04-01938 и 15-04-06066).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Querfurth H.W., LaFerla F.M.* Alzheimer's disease // *N. Engl. J. Med.* 2010. Vol. 362. N 4. P. 329–344.
2. *Morley J.E., Armbrecht 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.
3. *Drachman D.A.* The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement.* 2014. Vol. 10. N 3. P. 372–380.
4. *Ridge P.G., Ebbert M.T., Kauwe J.S.* Genetics of Alzheimer's disease // *Biomed. Res. Int.* 2013. Vol. 2013. Article ID 254954.
5. *Guerreiro R., Bras J., Toombs J., Heslegrave J., Hardy J., Zetterberg H.* Genetic variants and related biomarkers in sporadic Alzheimer's disease // *Curr. Genet. Med. Rep.* 2015. Vol. 3. N 1. P. 19–25.
6. *O'Brien R.J., Wong P.C.* Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease // *Annu. Rev. Neurosci.* 2011. Vol. 34. P. 185–204.
7. *Puzzo D., Arancio O.* Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? // *J. Alzheimers Dis.* 2013. Vol. 33. N S1. P. S111–S120.
8. *Jayadev S., Leverenz J.B., Steinbart E., Stahl J., Klunk W., Yu C.E., Bird T.D.* Alzheimer's disease phenotypes and genotypes associated with mutations in presenilin 2 // *Brain.* 2010. Vol. 133. N 4. P. 1143–1154.
9. *DeMattos R.B., Cirrito J.R., Parsadanian M., May P.C., O'Dell M.A., Taylor J.W., Harmony J.A., Aronow B.J., Bales K.R., Paul S.M., Holtzman D.M.* ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo // *Neuron.* 2004. Vol. 41. N 2. P. 193–202.
10. *Thambisetty M., An Y., Kinsey A., Koka D., Saleem M., Güntert A., Kraut M., Ferrucci L., Davatzikos C., Lovestone S., Resnick S.M.* Plasma clusterin concentration is associated with longitudinal brain atrophy in mild cognitive impairment // *Neuroimage.* 2012. Vol. 59. N 1. P. 212–217.
11. *Jones L., Holmans P.A., Hamshere M.L. et al.* Genetic evidence implicates the immune system and cholesterol metabolism in the aetiology of Alzheimer's disease // *PLoS One.* 2010. Vol. 5. N 11. e13950.
12. *Armstrong R.A.* The pathogenesis of Alzheimer's disease: a reevaluation of the "amyloid cascade hypothesis" // *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011. Vol. 2011. Article ID 630865.
13. *Cruchaga C., Chakraverty S., Mayo K. et al.* Rare variants in APP, PSEN1 and PSEN2 increase risk for AD in late-onset Alzheimer's disease families // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 2. e31039.
14. *Hardy J., Selkoe D.J.* The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // *Science.* 2002. Vol. 297. N 5580. P. 353–356.
15. *Kayed R., Head E., Thompson J.L., McIntire T.M., Milton S.C., Cotman C.W., Glabe C.G.* Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis // *Science.* 2003. Vol. 300. N 5618. P. 486–489.
16. *Walsh D.M., Selkoe D.J.* A beta oligomers — a decade of discovery // *J. Neurochem.* 2007. Vol. 101. N 5. P. 1172–1184.
17. *Shankar G.M., Li S., Mehta T.H., Garcia-Munoz A., Shepardson N.E., Smith I., Brett F.M., Farrell M.A., Rowan M.J., Lemere C.A., Regan C.M., Walsh D.M., Sabatini B.L., Selkoe D.J.* Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory // *Nat. Med.* 2008. Vol. 14. N 8. P. 837–842.
18. *El Khoury J., Toft M., Hickman S.E., Means T.K., Terada K., Geula C., Luster A.D.* Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13. N 4. P. 432–438.
19. *Qiu W.Q., Walsh D.M., Ye Z., Vekrellis K., Zhang J., Podlisny M.B., Rosner M.R., Safavi A., Hersch L.B., Selkoe D.J.* Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273. N 49. P. 32730–32738.
20. *Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H.* Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form // *Neurosci. Lett.* 2003. Vol. 350. N 2. P. 113–116.
21. *Szabò I., Lanza L., Gulbins E., Zoratti M.* Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria // *Pflugers Arch.* 2012. Vol. 463. N 2. P. 231–246.
22. *Chaturvedi R.K., Flint Beal M.* Mitochondrial diseases of the brain // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. Vol. 63. P. 1–29.
23. *Krstic D., Knuesel I.* Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. Vol. 9. N 1. P. 25–34.
24. *Roth M., Tomlinson B.E., Blessed G.* Correlation between scores for dementia and counts of 'senile plaques' in cerebral grey matter of elderly subjects // *Nature.* 1966. Vol. 209. N 5018. P. 109–110.
25. *Spires-Jones T.L., Hyman B.T.* The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease // *Neuron.* 2014. Vol. 82. N 4. P. 756–771.
26. *Khlistunova I., Biernat J., Wang Y., Pickhardt M., von Bergen M., Gazova Z., Mandelkow E., Mandelkow E.M.* Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. N 2. P. 1205–1214.
27. *Price J.L., McKeel Jr. D.W., Buckles V.D. et al.* Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease // *Neurobiol. Aging.* 2009. Vol. 30. N 7. P. 1026–1036.
28. *Spires-Jones T.L., Stoothoff W.H., de Calignon A., Jones P.B., Hyman B.T.* Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue // *Trends Neurosci.* 2009. Vol. 32. N 3. P. 150–159.
29. *Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A., Katzman R.* Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // *Ann. Neurol.* 1991. Vol. 30. N 4. P. 572–580.
30. *Wu H.Y., Hudry E., Hashimoto T., Kuchibhotla K., Rozkalne A., Fan Z., Spires-Jones T., Xie H., Arbel-Ornath M., Grosskreutz C.L., Bacskai B.J., Hyman B.T.* Amyloid beta induces the morphological neurodegenerative triad of spine loss, dendritic simplification, and neuritic dystrophies through calcineurin activation // *J. Neurosci.* 2010. Vol. 30. N 7. P. 2636–2649.
31. *Balietti M., Giorgetti B., Casoli T., Solazzi M., Tammagnini F., Burattini C., Aicardi G., Fattoretti P.* Early selective vulnerability of synapses and synaptic mitochondria in the hippocampal CA1 region of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2013. Vol. 34. N 4. P. 887–896.
32. *Qu J., Nakamura T., Cao G., Holland E.A., McKercher S.R., Lipton S.A.* S-Nitrosylation activates Cdk5 and

contributes to synaptic spine loss induced by beta-amyloid peptide // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. Vol. 108. N 34. P. 14330–14335.

33. D'Amelio M., Cavallucci V., Middei S. et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease // *Nat. Neurosci.* 2011. Vol. 14. N 1. P. 69–76.

34. Kregel K.C., Zhang H.J. An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. Vol. 292. N 1. P. 18–36.

35. Reczek C.R., Chandel N.S. ROS-dependent signal transduction // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2015. Vol. 33. P. 8–13.

36. Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1842. N 8. P. 1219–1231.

37. Sierra A., Gottfried-Blackmore A.C., McEwen B.S., Bulloch K. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile // *Glia*. 2007. Vol. 55. N 4. P. 412–424.

38. Kilbride S.M., Telford J.E., Tipton K.F., Davey G.P. Partial inhibition of complex I activity increases Ca^{2+} -independent glutamate release rates from depolarized synaptosomes // *J. Neurochem.* 2008. Vol. 106. N 2. P. 826–834.

39. Moreira P.I., Honda K., Liu Q., Santos M.S., Oliveira C.R., Aliev G., Nunomura A., Zhu X., Smith M.A., Perry G. Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology // *Curr. Alzheimer Res.* 2005. Vol. 2. N 4. P. 403–408.

40. Devi L., Prabhu B.M., Galati D.F., Avadhani N.G., Anandatheerthavarada H.K. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26. N 35. P. 9057–9068.

41. Atamna H., Boyle K. Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103. N 9. P. 3381–3386.

42. Cardoso S.M., Oliveira C.R. The role of calcineurin in amyloid-beta-peptides-mediated cell death // *Brain Res.* 2005. Vol. 1050. N 1–2. P. 1–7.

43. Manczak M., Calkins M.J., Reddy P.H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage // *Hum. Mol. Genet.* 2011. Vol. 20. N 13. P. 2495–2509.

44. 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.

45. Rudnitskaya E.A., Maksimova K.Y., Muraleva N.A., Logvinov S.V., Yanshole L.V., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Beneficial effects of melatonin in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // *Biogerontology*. 2015. Vol. 16. N 3. P. 303–316.

46. Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Kolosova N.G., Stefanova N.A. Melatonin attenuates memory impairment, amyloid- β accumulation, and neurodegeneration in a rat model of sporadic Alzheimer's disease // *J. Alzheimers Dis.* 2015. Vol. 47. P. 103–116.

47. Stefanova N.A., Kozhevnikova O.S., Vitovtov A.O., Maksimova K.Y., Logvinov S.V., Rudnitskaya E.A., Korbolina E.E., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Senescence-accelerated OXYS rats: a model of age-related cognitive decline with relevance to abnormalities in Alzheimer disease // *Cell Cycle*. 2014. Vol. 13. N 6. P. 898–909.

48. Stefanova N.A., Maksimova K.Y., Kiseleva E., Rudnitskaya E.A., Muraleva N.A., Kolosova N.G. Melatonin attenuates impairments of structural hippocampal neuroplasticity in OXYS rats during active progression of Alzheimer's disease-like pathology // *J. Pineal. Res.* 2015. Vol. 59. N 2. P. 163–177.

49. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Korbolina E.E., Kiseleva E., Maksimova K.Y., Kolosova N.G. Amyloid accumulation is a late event in sporadic Alzheimer's disease-like pathology in nontransgenic rats // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6. N 3. P. 1396–1413.

50. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Skulachev V.P., Kolosova N.G. Alzheimer's disease-like pathology in senescence-accelerated OXYS rats can be partially retarded with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 // *J. Alzheimers Dis.* 2014. Vol. 38. N 3. P. 681–694.

Поступила в редакцию
29.09.2015

EVOLUTION OF UNDERSTANDING OF ALZHEIMER'S DISEASE PATHOGENESIS

N.A. Stefanova¹, N.G. Kolosova^{1,2,*}

¹ Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;

² Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia;

*e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder and is a cause of dementia that is linked to atrophic changes in the brain. There are two forms of AD: familial early-onset form of AD (FAD, which accounts for ~5% of all cases) and sporadic late-onset AD (SAD, which accounts for ~95% of all cases). Identification of genetic determinants of FAD and proof of the neurotoxic effects of amyloid-beta peptide (A β) as a central event in the cascade of pathological processes significantly expanded understanding of the molecular and genetic mechanisms of the disease. However, the question of whether the accumulation of A β triggering factor for the most common SAD remain poorly understood. It is assumed that A β overproduction apparently becomes the secondary event of pathological processes of AD: synaptic failure, hyperphosphorylation of tau protein, neuroinflammation, neuronal loss and cognitive decline.

As one of the risk factors for development of AD is mitochondrial dysfunction, a consequence of which becomes a decrease of ATP synthesis and oxidative stress. However, the specific molecular and genetic mechanisms of AD remain unclear. A major problem in AD research is the lack of an animal model that accurately replicates the human disease. This shortage makes it difficult to study the underlying mechanisms and to explore additional risk factors and therapeutic approaches to AD.

Key words: *Alzheimer's disease, amyloid-beta, hyperphosphorylation of tau protein, synapses, neuroinflammation, mitochondrial dysfunction, review.*

Сведения об авторах:

Стефанова Наталья Анатольевна — канд. биол. наук, научный сотрудник сектора молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80; e-mail: stefanovan@bionet.nsc.ru

Колосова Наталья Гориславовна — докт. биол. наук, проф., зав. сектором молекулярных механизмов старения ИЦиГ СО РАН. Тел.: 8-383-363-49-80; e-mail: kolosova@bionet.nsc.ru

ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

КАКОЕ СТАРЕНИЕ У ДРОЖЖЕЙ “ПРАВИЛЬНОЕ”?

А.Н. Хохлов

Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Рассмотрены две модельные системы — “репликативное старение” и “хронологическое старение” (ХС), используемые для геронтологических исследований на дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*. В первом случае анализируют количество дочерних клеток, которое может дать одна материнская до необратимой остановки клеточных делений. Это делает данную модель сходной с широко известной моделью Хейфлика. В случае ХС изучают выживание популяции дрожжевых клеток, находящихся в стационарной фазе роста. Отмечается сходство второй модельной системы с моделью “стационарного старения”, используемой в лаборатории автора для цитогеронтологических экспериментов на клетках животных и человека. Предполагается, что концепция ограничения клеточной пролиферации как основной причины накопления с возрастом в клетках многоклеточных организмов макромолекулярных повреждений (главным образом, повреждений ДНК), приводящих к ухудшению функционирования тканей и органов и, как следствие, к увеличению вероятности смерти, позволяет объяснить, как происходит старение практически любых живых организмов. По-видимому, во всех случаях этот процесс запускается появлением медленно размножающихся или вообще не размножающихся клеток, что приводит к прекращению “разбавления” с помощью новых клеток накапливающихся на уровне клеточной популяции макромолекулярных дефектов. Заключается, что данные, полученные при испытании на модели ХС дрожжей различных факторов на предмет их геропротекторной или геропротекторной активности, с высокой степенью надежности могут быть использованы для понимания механизмов старения и долголетия у человека.

Ключевые слова: дрожжи, хронологическое старение, репликативное старение, “стационарное старение”, цитогеронтология, обзор.

Исследования возможной геропротекторной или геропротекторной активности химических соединений или физических факторов (излучений) проводятся, как правило, на различных моделях, так как такие работы на людях и животных либо невозможны по этическим причинам, либо занимают очень много времени. Поэтому часто выбор делается в пользу модельных систем, основанных на использовании культивируемых клеток или популяций одноклеточных организмов. Это позволяет во много раз ускорить процесс тестирования, однако создает методологическую проблему, связанную с недостаточной четкостью определения для таких моделей термина “старение”. Если для человека и животных это определение звучит как “совокупность возрастных изменений организма, приводящих к увеличению вероятности его смерти”, то для клеточных культур существует большое количество таких определений, причем часто они даже принципиально различаются по смыслу. Данный вопрос уже неоднократно затрагивался нами ранее в соответствующих публикациях [1–5]. Кроме того, процедура получения и поддержания нормальных клеток, которым свойствен феномен Хей-

флика, все-таки достаточно трудоемка, время же существования непрерывно пересеваемой культуры таких клеток обычно не превышает 6–7 мес., а создание значительного запаса клеток, замороженных на определенном пассаже, также является не очень простой задачей и, к тому же, вносит дополнительный разброс в получаемые на размороженных клетках данные.

В связи с этим в последние годы получили широкое распространение геронтологические исследования на дрожжах — одноклеточных эукариотических организмах, многие генетические и биохимические особенности которых сходны с таковыми для клеток высших организмов [6]. Как правило, такие работы проводят на *Saccharomyces cerevisiae*, для которых существуют две основные модельные системы, обеспечивающие проведение геронтологических экспериментов [7]. Первая — так называемое “репликативное старение”, основанное на феномене ограниченного количества дочерних клеток, которое может дать одна материнская. Эта модель очень похожа на модель Хейфлика, в основе которой лежит ограниченная способность нормальных клеток человека или животных к пролиферации.

Однако надо заметить, что в отличие от ситуации с культивируемыми клетками человека и животных, у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* дочерняя клетка (которая обычно гораздо меньше материнской) образуется в результате асимметричного почкования. При этом материнская клетка теряет способность к такому почкованию через определенное количество делений, после чего претерпевает деградацию и лизис, а дочерние “рождаются совсем юными”. Этот процесс похож на старение пула стволовых клеток у высших организмов [8].

Вторая модельная система — “хронологическое старение” (ХС), которое претерпевает популяция дрожжевых клеток в стационарной фазе роста, когда их размножение остановлено тем или иным способом [9]. При этом жизнеспособность клеток оценивается, как правило, по их способности к образованию колоний в свежей ростовой среде [6]. Аналогом этой модели является модель “стационарного старения” (СС), используемая для цитогеронтологических экспериментов на самых разных культивируемых клетках многоклеточных организмов [3, 10–12]. Надо заметить, что в случае дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, у которых две одинаковые дочерние клетки образуются путем симметричного деления (fission) одной материнской, “работает” лишь вторая модель [13].

Как при ХС, так и при СС размножение клеток прекращается либо из-за истощения питательной среды, либо из-за значительного понижения pH, либо из-за контактного торможения при достижении насыщающей плотности культуры [14]. После этого начинается “старение” клеток, выражающееся, во-первых, в появлении на самых разных уровнях организации повреждений, сходных с повреждениями клеток стареющего многоклеточного организма, а во-вторых, в экспоненциальном снижении жизнеспособности, определяемой теми или иными методами [11, 12].

Хотелось бы подчеркнуть, что выбор определенной модельной системы для исследований зависит не только от удобства использования, но и от той концепции старения, которой придерживается конкретный исследователь. При этом очень желательно, чтобы такая концепция могла объяснить, каким образом стареют различные организмы, начиная с примитивных одноклеточных и кончая самыми сложными многоклеточными типа человека. Кроме того, было бы неплохо, если бы эта теория еще и помогла понять, каким образом некоторые организмы вообще избегают старения [15–17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J. Teaching cytogerontology in Russia and China // Adv. Gerontol. 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.

К сожалению, феномен ограниченной способности нормальных клеток к пролиферации, связанный с укорочением их теломер при каждом делении, не может объяснить старение высокоорганизованных организмов, у которых этот процесс, по-видимому, определяется в основном возрастными изменениями органов и тканей, состоящих из постмитотических (неделяющихся) клеток. Очевидно, что даже если мы обеспечим увеличение митотического потенциала таких клеток с помощью тех или иных воздействий, это никак не отразится на старении и продолжительности жизни многоклеточного организма. Сходным образом, “дрожжевая” модель репликативного старения, на наш взгляд, не дает ответа на многие вопросы об общих механизмах старения живых существ.

Нам представляется, что концепция ограничения клеточной пролиферации как основной причины накопления с возрастом в клетках многоклеточных организмов макромолекулярных повреждений (главным образом, повреждений ДНК), приводящих к ухудшению функционирования тканей и органов и, как следствие, к увеличению вероятности смерти, позволяет объяснить, как происходит старение практически любых живых организмов [3, 10, 15, 18–21]. По-видимому, во всех случаях этот процесс запускается появлением медленно размножающихся или вообще не размножающихся клеток, что приводит к прекращению “разбавления” с помощью новых клеток накапливающихся на уровне клеточной популяции макромолекулярных дефектов. Если же все клетки тела непрерывно обновляются, как у пресноводной гидры [17, 22], то мы имеем так называемый “бессмертный” организм, вероятность гибели которого остается на пренебрежимо малом уровне в течение практически неограниченного времени. Можно полагать, что по этой же причине виды с неограниченным ростом стареют гораздо медленнее тех, рост которых останавливается по завершении развития.

Если все сказанное верно, то выбор между двумя моделями для геронтологических исследований на дрожжах становится очевидным: модель ХС (как, по-видимому, и модель СС животных клеток) является оптимальной как для изучения механизмов старения, так и для тестирования различных факторов, представляющих интерес в качестве потенциальных геропротекторов и геропротекторов.

Автор признателен Г.В. Моргуновой за помощь в работе над рукописью статьи.

3. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
4. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological re-

search // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.

5. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.

6. Aging research in yeast: Subcell. Biochem. Vol. 57 / Eds. M. Breitenbach, S.M. Jazwinski, and P. Laun. Springer Netherlands, 2012. 368 pp.

7. Longo V.D., Shadel G.S., Kaerberlein M., Kennedy B. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* // Cell Metab. 2012. Vol. 16. N 1. P. 18–31.

8. Laun P., Bruschi C.V., Dickinson J.R., Rinnerthaler M., Heeren G., Schwimbersky R., Rid R., Breitenbach M. Yeast mother cell-specific ageing, genetic (in)stability, and the somatic mutation theory of ageing // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35. N 22. P. 7514–7526.

9. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // Aging Cell. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.

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

11. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.

12. 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.

13. Roux A.E., Quissac A., Chartrand P., Ferbeyre G., Rokeach L.A. Regulation of chronological aging in *Schizo-*

saccharomyces pombe by the protein kinases Pka1 and Sck2 // Aging Cell. 2006. Vol. 5. N 4. P. 345–357.

14. Конев С.В., Мажуль В.М. Межклеточные контакты. Минск: Наука и техника, 1977. 312 с.

15. Khokhlov A.N. Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochastics? // Russ. J. Dev. Biol. 2013. Vol. 44. N 6. P. 336–341.

16. Jones O.R., Scheuerlein A., Salguero-Gómez R., Camarda C.G., Schaible R., Casper B.B., Dahlgren J.P., Ehrlén J., García M.B., Menges E.S., Quintana-Ascencio P.F., Caswell H., Baudisch A., Vaupel J.W. Diversity of ageing across the tree of life // Nature. 2014. Vol. 505. N 7482. P. 169–173.

17. Khokhlov A.N. On the immortal hydra. Again // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 4. P. 153–157.

18. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР. Серия “Общие проблемы физико-химической биологии”. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.

19. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.

20. Khokhlov A.N. Does aging need an own program or the existing development program is more than enough? // Russ. J. Gen. Chem. 2010. Vol. 80. N 7. P. 1507–1513.

21. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.

22. Martínez D.E., Bridge D. Hydra, the everlasting embryo, confronts aging // Int. J. Dev. Biol. 2012. Vol. 56. N 6–8. P. 479–487.

Поступила в редакцию
25.11.15

WHICH AGING IN YEAST IS “TRUE”?

A.N. Khokhlov

Evolutionary Cytogerontology Sector, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

Two model systems — “replicative aging” and “chronological aging” (CA), used for gerontological research on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are compared. In the first case the number of daughter cells generated by an individual mother cell before cell propagation irreversibly stops is analyzed. This makes the model very similar to the well-known Hayflick model. In case of CA the survival of yeast cell population in the stationary phase of growth is studied. It is noted that the second model is pretty similar to the “stationary phase aging” model used in the author’s laboratory for cytogerontological studies on animal and human cells. It is considered that the conception of cell proliferation restriction as the main reason of age-related accumulation in the cells of multicellular organisms of macromolecular defects (mainly — DNA damage) leading to deterioration of tissue and organ functioning and, as a result, to the increase of death probability allows to explain how the aging process proceeds in almost any living organisms. Apparently, in all cases the process is initiated by appearance of slow propagating (or not propagating at all) cells which leads to the stopping “dilution”, with the help of new cells, of macromolecular defects accumulating at the level of whole cell population. It is concluded that data obtained in testing on the yeast CA model of various factors for their geroprotector or geroprotector activity can be with high reliability used for understanding mechanisms of human aging and longevity.

Key words: yeast, chronological aging, replicative aging, stationary phase aging, cytogerontology, review.

Сведения об авторе:

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

БИОХИМИЯ

УДК 57.042

**АНТИ-HER2-ФОТОТОКСИН НА ОСНОВЕ ФЛАВОПРОТЕИДА miniSOG
ВЫЗЫВАЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС
И НЕКРОЗ HER2-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ РАКОВЫХ КЛЕТОК****О.Н. Шилова¹, Г.М. Прошкина^{1,*}, А.В. Рябова², С.М. Деев^{1,3}**¹ *Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН;
Россия, 117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;*² *Институт общей физики имени А.М. Прохорова, РАН,
Россия, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 38;*³ *кафедра иммунологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12** *e-mail: gmb@ibch.ru*

Разработка и функциональная характеристика новых высокоаффинных белковых соединений, способных селективно уничтожать раковые клетки человека, является актуальной задачей современных биомедицинских исследований. В работе изучена цитотоксичность рекомбинантного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека. Установлено, что адресный фототоксин DARPIn-miniSOG специфически взаимодействует с рецептором HER2 и вызывает фотоиндуцированную гибель HER2-положительных клеток по механизму некроза. Облучение клеток в присутствии аскорбиновой кислоты элиминирует фотоиндуцированную цитотоксичность DARPIn-miniSOG, что доказывает прооксидантный механизм действия фототоксина.

Ключевые слова: адресный фототоксин, рецептор HER2, гипоплоидная ДНК, окислительный стресс.

Рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2, Human epidermal growth factor receptor-2) — тирозинкиназный рецептор, в норме присутствующий на всех типах эпителиальных тканей человека с плотностью несколько тысяч молекул на клетку. При злокачественной трансформации клетки происходит амплификация гена *HER2*, приводящая к суперэкспрессии кодируемого им рецептора. При этом концентрация HER2 на поверхности раковой клетки резко возрастает — до нескольких миллионов молекул на клетку. Известно, что 15–20% опухолей молочной железы человека характеризуется суперпродукцией онкомаркера HER2 [1, 2]. Именно поэтому онкомаркер HER2 является важной мишенью в диагностике и терапии онкозаболеваний. Иммунотерапия с применением адресных анти-HER2-антител, таких как Трастузумаб и Пертузумаб, широко используется в современной медицинской практике для лечения HER2-положительных опухолей молочной железы.

Несколько лет назад в лаборатории проф. А. Плюктуна был разработан новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы на основе искусственных белков с анкириновыми повторами — DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins) [3]. DARPins отличаются высоким уровнем

экспрессии в бактериальной системе, термодинамически стабильны и являются мономерами в растворе. Кроме того, этот новый класс белковых молекул характеризуется высокой устойчивостью к протеазам [4–6].

В работе в качестве адресного модуля мы использовали DARPIn_9-29, узнающий рецептор HER2 с высокой аффинностью ($K_D = 3,8$ нМ) [7], в качестве цитотоксического модуля — фототоксичный флавопротеид miniSOG [8]. miniSOG сконструирован на основе фототропина 2 *Arabidopsis thaliana* и содержит флавиномононуклеотид (ФМН) в качестве кофактора. Благодаря наличию ФМН в своей структуре, miniSOG способен генерировать активные формы кислорода под действием синего света.

Результаты работы доказывают, что фототоксин DARPIn-miniSOG обладает специфической фотоиндуцированной цитотоксичностью в отношении HER2-положительных раковых клеток (IC_{50} 800 нМ), вызывая некроз облученных клеток. Присутствие антиоксиданта снижает токсичность фотосенсибилизатора DARPIn-miniSOG для клеток SK-BR-3, что подтверждает механизм действия белка, связанный с индукцией окислительного стресса.

Материалы и методы

Клеточные линии и условия культивирования.

Культивируемые клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, гиперэкспрессирующие рецептор HER2, и клетки яйчников китайского хомячка CHO выращивали в среде McCoy's 5A (Life technologies, США) с 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота ("HyClone", Бельгия) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Получение белка DARPIn-miniSOG. Получение плазмиды pDARP-mSOG и выделение белка DARPIn-miniSOG описано в работе [9]. Коротко, кодирующую последовательность адресного модуля DARPIn-9_29 амплифицировали с плазмиды pCG-Hnse-DARPIn-d18-9-29 (любезно предоставлена проф. А. Плюктуном, Университет Цюриха). ПЦР-фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *HindIII* и лигировали с вектором pET22b, предварительно обработанным этими же рестриктазами. Кодирующую последовательность цитотоксического модуля miniSOG амплифицировали с плазмиды pSD-4D5scFv-miniSOG [8], обрабатывали рестриктазами *HindIII* и *XhoI* и клонировали в вектор pET22b в одну рамку считывания с кодирующей последовательностью DARPIn-9_29. В результате экспрессионная кассета содержала индуцибельный промотор фага T7, кодирующие последовательности DARPIn-9_29, miniSOG и гексагистидиновой метки.

Экспрессию целевого белка DARPIn-miniSOG проводили в клетках *E. coli* штамма BL21(DE3), индукцию осуществляли 1 mM IPTG при достижении культурой оптической плотности OD₆₀₀ 0,5–0,7. После индукции биомассу растили при 25°C в течение 8 ч. Белок DARPIn-miniSOG выделяли из растворимой фракции с использованием металло-аффинной хроматографии согласно протоколу производителя.

Проточная цитофлуориметрия. Опыты по проточной цитофлуориметрии выполняли на проточном цитометре BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США). Адгезивные клетки снимали с подложки раствором версена (ПанЭко, Россия) и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS, ПанЭко, Россия). Для определения субпопуляций живых и мертвых клеток в образце пробу инкубировали в 100 мкл PBS с йодидом пропидия (конечная концентрация 2,5 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) в темноте на льду в течение 5 мин. При измерении последовательно выделяли популяции одиночных клеток, затем живых клеток (неокрашенных йодидом пропидия). При выполнении опыта использовали следующие параметры: напряжение на лазере 20 мВт и фильтр детекции 585/40 (FL2 канал) для измерения флуоресценции йодида пропидия. Полученные данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6.

Оценка цитотоксического действия фототоксина *in vitro*. Цитотоксичность генетически кодируемого адресного фотосенсибилизатора опреде-

ляли с помощью МТТ-теста [10]. Клетки SK-BR-3 в количестве 35000 клеток/мл среды и CHO в количестве 20000 клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в течение ночи. Затем среду удаляли, клетки промывали PBS и в лунки добавляли по 100 мкл PBS (отрицательный контроль) или PBS, содержащего DARPIn-miniSOG в концентрациях от 125 нМ до 3 мкМ. Планшет помещали на термостатируемую платформу и облучали в течение 20 мин светом с длиной волны 460 нм интенсивностью 55 мВт/см² при температуре 37°C. После завершения облучения в лунки добавляли питательную среду с 10% сыворотки и инкубировали 48 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Затем среду удаляли и в лунки вносили по 100 мкл раствора бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, ПанЭко) (0,5 мг/мл), приготовленного на среде McCoy's 5A, и инкубировали 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. После этого раствор МТТ удаляли и к содержимому лунок добавляли по 100 мкл ДМСО, планшет встряхивали на шейкере до полного растворения кристаллов формазана. Измерение оптического поглощения содержимого каждой лунки проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) на двух длинах волн: 570 нм (рабочая) и 650 нм (сравнение). Эксперименты были выполнены в трех повторностях. Выживание клеток после инкубации с DARPIn-miniSOG оценивали по количеству формазана, образовавшегося в результате восстановления клетками раствора МТТ и растворенного в ДМСО (количество формазана пропорционально числу живых клеток). Кривые роста получали с помощью программного обеспечения GraphPrism 6. Значение IC₅₀ рассчитывали с помощью нелинейного регрессионного анализа.

Подтверждение прооксидантного механизма токсичности DARPIn-miniSOG. Для подтверждения механизма цитотоксичности рекомбинантного белка за счет генерации активных форм кислорода проводили облучение клеток описанным выше способом в присутствии аскорбиновой кислоты, выступавшей в роли антиоксиданта. Для установления концентрации аскорбиновой кислоты, которая не будет оказывать токсического влияния сама по себе, клетки рассеивали в 96-луночные планшеты как описано выше, и инкубировали 90 мин с PBS, содержащим аскорбиновую кислоту в концентрациях от 2 нМ до 2 мкМ. Максимальная концентрация аскорбиновой кислоты, не оказывавшая заметного цитотоксического влияния на клетки SK-BR-3, составила 60 нМ. Именно эта концентрация использовалась в дальнейшем при облучении клеток. Жизнеспособность клеток, облученных в присутствии аскорбиновой кислоты и без нее, также сравнивали по способности клеток восстанавливать бромид тетразолия.

Определение фракции гипоплоидной ДНК. Долю клеток с фрагментированной ДНК определяли при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого клетки линии SK-BR-3 снимали с культового пластика при помощи раствора версена, разделяли на пробы по 10^5 клеток, центрифугировали, отделяли от супернатанта и ресуспендировали в PBS, содержащем DAPI-miniSOG в концентрации 0,5 мкМ, и облучали синим светом (465 нм, 55 мВт/см²) 30 мин при 37°C. После облучения к клеткам добавляли 1 мл среды и инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение суток. В качестве отрицательного контроля апоптоза использовали клетки, инкубированные в тех же условия без белка. В качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки, инкубированные 17 ч в растворе 500 мМ стауроспорина в питательной среде с 10% сыворотки. После завершения инкубации клетки дважды промывали PBS, добавляли к каждой пробе по 1 мл 70% этанола для пермеабилзации клеточной мембраны, инкубировали на льду 30 мин. После этого клетки центрифугировали 5 мин при 1000 g и температуре 4°C, супернатант сливали, а клетки ресуспендировали в 1 мл PBS, содержащем 50 мкг пропидия йодида и 0,2 мг РНКазы А, и инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темноте. Полученные пробы анализировали на проточном цитометре BD Accuri C6.

Результаты и обсуждение

Для изучения механизма цитотоксического действия адресного фототоксина DAPI-miniSOG была выбрана клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, которая характеризуется суперпродукцией поверхностного клеточного рецептора HER2.

В качестве возможных механизмов клеточной гибели рассматривали два наиболее вероятных для клеток, культивируемых *in vitro*: апоптоз и некроз.

В качестве критериев их отличия были выбраны наличие или отсутствие фрагментации ДНК, а также морфология погибающих клеток.

При наблюдении в микроскоп за клетками аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, подвергшимися обработке фототоксином DAPI-miniSOG и последующему облучению синим светом, было замечено, что через 1,5–2 ч после прекращения облучения в клетках происходят морфологические изменения, характерные для некроза (рис. 1): клетки увеличивались в размере, происходило набухание и вакуолизация цитоплазмы, появлялась заметная гранулярность, клетки теряли характерную фибробластоподобную форму, при этом в большинстве клеток не наблюдалось формирование апоптотических телец. Кроме того, наблюдалась потеря целостности плазматической мембраны, что было доказано при окрашивании клеток йодидом пропидия (рис. 1).

Измерение количества ДНК в клетках и постклеточных элементах после облучения клеток линии SK-BR-3 в присутствии DAPI-miniSOG показывает, что в большинстве клеток остается исходное количество ДНК, а фракция subG₁ остается на уровне отрицательного контроля (рис. 2). Таким образом, токсическое действие белка DAPI-miniSOG не приводит к фрагментации ДНК и уменьшению ее содержания в постклеточных структурах, а значит не связано с индукцией апоптоза.

Для изучения цитотоксического действия DAPI-miniSOG *in vitro*, клетки SK-BR-3 (HER2-положительный контроль) и CHO (HER2-отрицательный контроль) инкубировали с белком DAPI-miniSOG в различных концентрациях (125 нМ — 3 мкМ) и подвергали воздействию синего света. Рисунок 3А наглядно иллюстрирует, что снижение жизнеспособности клеток SK-BR-3 наблюдалось после их обработки белком DAPI-miniSOG с последующим облучением. IC₅₀ в этом случае составила 800 нМ. В то же время, клетки CHO, не гиперэкс-

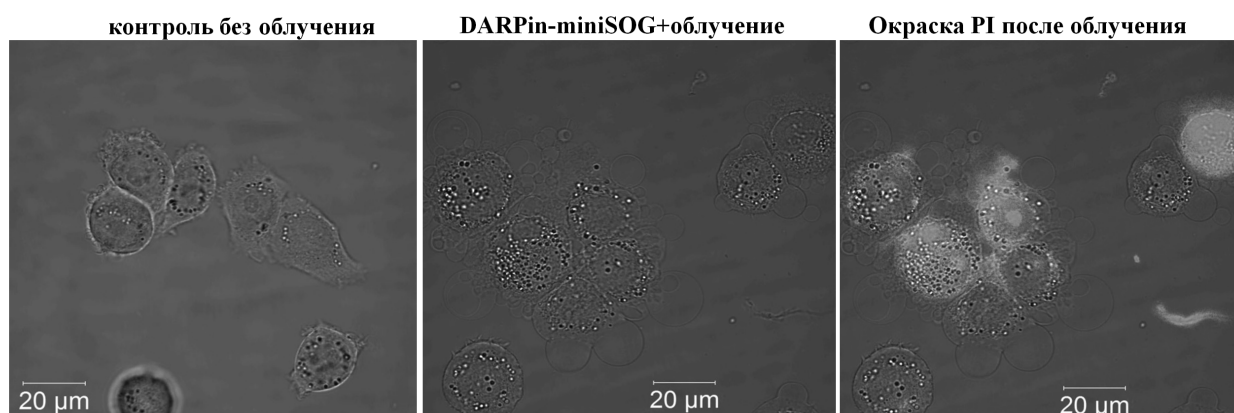


Рис. 1. Морфологические изменения HER2-положительных клеток SK-BR-3 под действием адресного фототоксина DAPI-miniSOG и облучения синим светом. Фотографии клеток сделаны с помощью лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM-710-NLO (Германия) в проходящем белом свете и в красном канале флуоресценции.

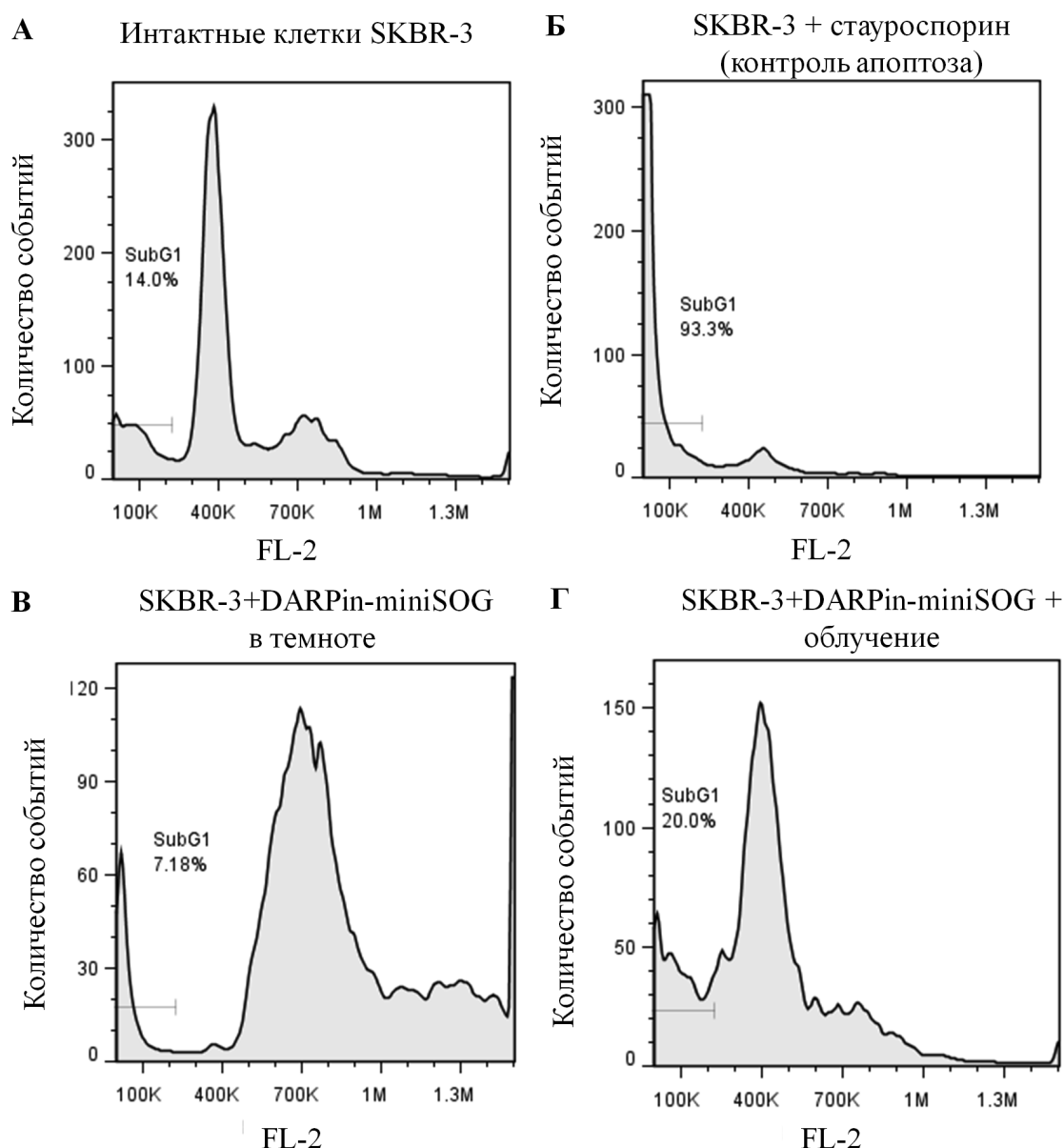


Рис. 2. Цитометрическое определение гипоплоидной ДНК в популяции клеток SK-BR-3. **А** — клетки SK-BR-3, обработанные буфером PBS (контроль некротических клеток). **Б** — клетки SK-BR-3, обработанные стауроспорином (контроль апоптоза). **В** — клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG без облучения. **Г** — клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG и подвергнутые облучению

прессирующие HER2, не снижали жизнеспособность при подобной обработке (рис. 3А).

Благодаря наличию кофактора ФМН в составе белковой глобулы, miniSOG вырабатывает активные формы кислорода (АФК), индуцирующие клеточную гибель [11, 12].

Хорошо известно, что аскорбиновая кислота является неферментативным антиоксидантом, способным защищать клетки от длительного воздействия АФК. Показано, что в качестве антиоксиданта аскорбиновая кислота эффективна в отношении супероксид-аниона, перекиси водорода, гидроксил-радикалов и синглетного кислорода [13]. Изучив влияние различных концентраций аскорбиновой кислоты на раковые клетки линии SK-BR-3, мы

установили, что аскорбиновая кислота в концентрации до 100 нМ не влияет на жизнеспособность клеток (рис. 3Б). Как показано на рис. 3А, облучение клеток в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты предотвращает фотоиндуцированное цитотоксическое действие DARPin-miniSOG, повышая IC_{50} DARPin-miniSOG с 800 нМ до 7 мкМ (почти в 9 раз).

Наибольшего цитотоксического эффекта можно ожидать, когда фототоксин располагается на клеточной мембране. Хорошо известно, что ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в большом количестве в плазматической мембране, являются главной мишенью активных форм кислорода [14]. Дополнительным фактором, вносящим вклад в фо-

тоиндуцированное повреждение липидов, является наличие молекулярного кислорода, который хорошо растворим в липидах. Таким образом, в липидном окружении фотосенсибилизатор имеет больше шансов, чем в водном, встретиться с молекулярным кислородом и выработать АФК. Кроме того, если АФК производятся внутри клетки, в клетке существует множество путей, как ферментативных, так и неферментативных, для поддержания внутриклеточного редокс-гомеостаза и защиты клетки от различных оксидантов [15]. Наши эксперименты с DARPin-miniSOG и аскорбиновой кислотой подтверждают эту гипотезу: будучи хорошим антиоксидантом для различных форм АФК, аскорбиновая кислота эффективно предотвращает окисление липидов, ингибируя цитотоксичность DARPin-miniSOG.

Таким образом, в работе изучены фотоиндуцированная цитотоксичность и механизм клеточной гибели, вызываемой фототоксином DARPin-miniSOG, на клетках аденокарциномы молочной железы человека. Наличие фрагментированной хромосомной ДНК, а также характерные морфологические изменения, которые проявляют клетки после воздействия адресного фототоксина, позволяют сделать вывод, что DARPin-miniSOG вызывает некроз раковых клеток. Клетки SK-BR-3, обработанные DARPin-miniSOG и подвергнутые облучению синим светом в присутствии аскорбиновой кислоты, сохраняют жизнеспособность, что подтверждает прооксидантный механизм действия фототоксина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №14-24-00106 — опыты по цитотоксичности и микроскопии; проект №14-14-00813 — опыты по проточной цитометрии).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. 1987. Vol. 235. N 4785. P. 177–182.
2. Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer // *J. Clin. Oncol.* 1992. Vol. 10. N 7. P. 1049–1056.
3. Binz H.K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M.T., Briand C., Forrer P., Grutter M.G., Plückthun A. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22. N 5. P. 575–582.
4. Interlandi G., Wetzel S.K., Settanni G., Plückthun A., Caflisch A. Characterization and further stabilization of designed ankyrin repeat proteins by combining molecular dynamics simulations and experiments // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 375. N 3. P. 837–854.
5. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., Plückthun A. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size // *Cancer Res.* 2010. Vol. 70. N 4. P. 1595–1605.

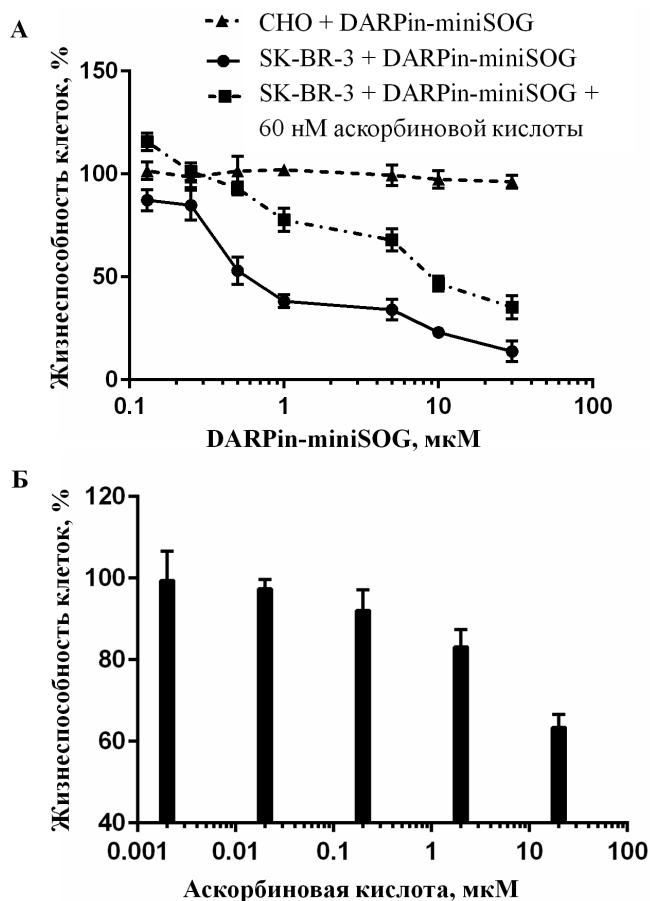


Рис. 3. Оценка цитотоксического действия адресного фототоксина DARPin-miniSOG *in vitro*. А. Зависимость жизнеспособности HER2-положительных клеток SK-BR-3 и HER2-отрицательных клеток CHO от концентрации фототоксина под действием облучения, а также зависимость жизнеспособности клеток SK-BR-3 в присутствии 60 нМ аскорбиновой кислоты. Б. Чувствительность клеток SK-BR-3 к различным концентрациям аскорбиновой кислоты.

6. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. Man-made antibodies and immunoconjugates with desired properties: function optimization using structural engineering // *Rus. Chem. Rev.* 2015. Vol. 84. N 1. P. 1–26.
7. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display // *J. Mol. Biol.* 2008. Vol. 382. N 5. P. 1211–1227.
8. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms // *PLoS Biol.* 2011. Vol. 9. N 4. e1001041.
9. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебедево Е.Н., Деев С.М. // Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксического белка DARPin-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. 2015. *Acta Naturae*. №3. С. 79–86.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods*. 1983. Vol. 65. N 1–2. P. 55–63.

11. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. Flavoprotein miniSOG as a genetically encoded photosensitizer for cancer cells // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1830. N 11. P. 5059–5067.

12. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro // Theranostics. 2013. Vol. 3. N 11. P. 831–840.

13. Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview // Arch. Toxicol. 2012. Vol. 86. N 3. P. 345–391.

14. Girotti A.W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms // J. Photochem. Photobiol. 2001. Vol. 63. N 1-3. P. 103–113.

15. Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species // J. Cell. Biol. 2011. Vol. 194. N 1. P. 7–15.

Поступила в редакцию

06.07.15

ANTI-HER2 PHOTOTOXIN BASED ON FLAVOPROTEIN MINISOG CAUSES OXIDATIVE STRESS AND NECROSIS ON HER2-POSITIVE CANCER CELLS

O.N. Shilova¹, G.M. Proshkina^{1,*}, A.V. Ryabova², S.M. Deyev^{1,3}

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, GSP-7, Moscow, 117997, Russia;

² Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Vavilov ul. 38, Moscow, 119991, Russia;

³ Department of Immunology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

*e-mail: gmb@ibch.ru

Development and functional characterization of novel high-affinity protein compounds that can selectively kill human cancer cells, is an important task of modern biomedical research. In this work the cytotoxicity of recombinant phototoxic protein DARPin-miniSOG on HER2-positive breast adenocarcinoma human cells has been studied. It was determined that targeted phototoxin DARPin-miniSOG specifically interacts with HER2 receptor and causes necrotic death of HER2-positive cells induced by illumination. Treatment of the cells with DARPin-miniSOG in the presence of ascorbic acid eliminates the light-induced cytotoxic action of the protein that confirmed the mechanism of action of the protein through oxidative stress.

Key words: DNA hypoploid fraction, HER2 receptor, oxidative stress, targeted phototoxin.

Сведения об авторах:

Шилова Ольга Николаевна — инженер лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-63-92; e-mail: olchernykh@yandex.ru.

Прошкина Галина Михайловна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-63-92; e-mail: gmb@ibch.ru.

Рябова Анастасия Владимировна — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаборатории лазерной биоспектроскопии института общей физики им. А.М. Прохорова РАН. Тел.: 8-499-503-81-11; e-mail: nastya.ryabova@gmail.com.

Деев Сергей Михайлович — докт. биол. наук, проф. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией молекулярной иммунологии института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-499-724-71-88; e-mail: deyev@ibch.ru.

БИОХИМИЯ

УДК 577.15

САЛИЦИЛГИДРОКСАМАТ УСИЛИВАЕТ НАДН-ОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРОКСИДАЗЫ В СУСПЕНЗИЯХ МИТОХОНДРИЙ И ХЛОРОПЛАСТОВ ГОРОХА

В.Д. Самуилов*, Д.Б. Киселевский

Кафедра иммунологии, биологический факультет,
 Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
 Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
 *e-mail: vdsamuilov@mail.ru

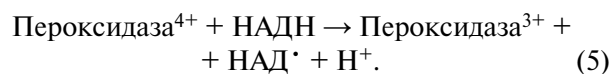
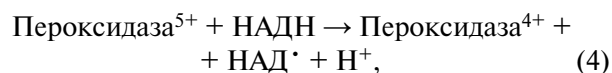
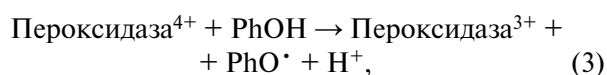
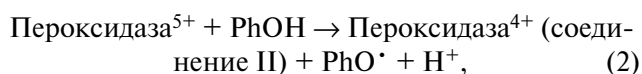
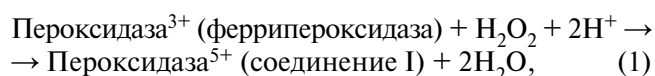
Салицилгидроксамат (СГ), ингибитор альтернативной оксидазы митохондрий растений, усиливает НАДН-оксидазную активность в суспензиях митохондрий и хлоропластов, полученных при их выделении из корней или листьев гороха, соответственно. Реакция подавляется при отмывании митохондрий и хлоропластов и проявляется в надосадочных растворах, полученных при их удалении центрифугированием. Реакция чувствительна к CN^- и антиоксиданту пропилгаллату. Окисление НАДН, наряду с СГ, стимулируется 2,4-дихлорфенолом или фенолом, но не салициловой кислотой. Ускорение окисления НАДН фенольными соединениями наблюдается с коммерческой пероксидазой хрена, оно связано с участием этих соединений в НАДН-зависимой пероксидазной реакции. 2,4-Дихлорфенол и СГ значительно усиливают разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха, вызванное образованием активных форм кислорода при окислении добавленного НАДН с участием апопластной пероксидазы.

Ключевые слова: дыхательная цепь, альтернативная оксидаза, пероксидазная активность, митохондрии, хлоропласты, пероксидаза хрена, фенольные соединения, салицилгидроксамат.

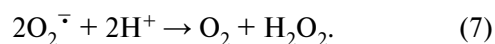
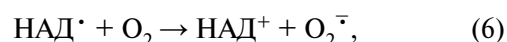
Убихинон в митохондриях животных и растений восстанавливается НАДН с помощью комплекса I или сукцинатом с помощью комплекса II дыхательной цепи. В митохондриях растений имеются дополнительные пути восстановления убихинона: внутри- и немитохондриальными НАДН и НАДФН посредством соответствующих (четырех) дегидрогеназ, устойчивых к ротенону и не генерирующих $\Delta\mu$ — трансмембранную разность электрохимических потенциалов H^+ . Окисление убихинола в митохондриях растений происходит через цитохромный путь (комплексы III и IV дыхательной цепи) и с помощью альтернативной оксидазы, не генерирующей $\Delta\mu$, устойчивой к CN^- и чувствительной к гидроксидам (салицилгидроксамату или бензилгидроксамату) и пропилгаллату (рис. 1, а, см. обзоры [1, 2]). Пропилгаллат — антиоксидант, нашедший применение в защите пищевых продуктов от окислительной порчи.

Добавленный НАДН окисляется через главный (цитохромный) путь дыхательной цепи, минуя альтернативную оксидазу [1], поэтому процесс полностью ингибируется KCN [3]. Салицилгидроксамат тормозит окисление сукцината, но ускоряет окисление НАДН [3]. Возникают вопросы о том, как добавленный НАДН окисляется O_2 , минуя альтернативную оксидазу, почему окисление НАДН стимулируется салицилгидроксаматом, каков механизм наблюдаемой оксидазной реакции.

Оксидазные реакции свойственны не только дыхательным цепям, но и пероксидазам. Пероксидазная реакция в присутствии H_2O_2 и доноров электронов, например, фенола, фенольных соединений или НАДН, включает следующие стадии (цифры при пероксидазе отражают степень окисления фермента — подробнее см. [4–8], PhOH — фенол или фенольные соединения):

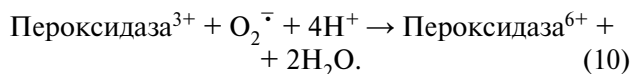
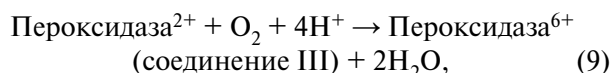
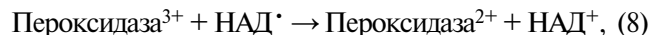


Радикал $\text{НАД}^\bullet$, реагируя с O_2 , дает $\text{O}_2^{\cdot -}$, который в супероксиддисмутазной реакции превращается в H_2O_2 :

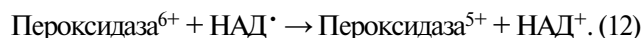


В оксидазных реакциях, называемых пероксидазно-оксидазными, пригодны немногие доноры

электронов: НАДН, дигидроксифумарат, индол-3-ацетат или нафтогидрохиноны [4, 9]. Фермент участвует в формах пероксидазы²⁺ (ферропероксидаза) и пероксидазы³⁺:



Пероксидаза⁶⁺ — каталитически неактивная форма фермента. Фенольные соединения в сочетании с НАДН переводят пероксидазу в активную форму [5–7] и ведут также, продуцируя радикал НАД[•], к образованию O₂^{•-} и H₂O₂ (см. уравнения 6, 7):



Цель настоящей работы — выяснить, какой фермент осуществляет НАДН-зависимую оксидазную реакцию, которая стимулируется салицилгидроксаматом и наблюдается в изолированных митохондриях или хлоропластах. Наряду с салицилгидроксаматом, испытаны фенол и другие фенольные соединения: 2,4-дихлорфенол и салициловая кислота, представленные на рис. 1, б.

Материалы и методы

Проростки гороха (*Pisum sativum* L. сорта Альфа) выращивали 7–15 сут при периодическом освещении светом металлогалогеновой лампы ДРИЗ (250 Вт) интенсивностью ~100 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ (свет — 16 ч, темнота — 8 ч) при 20–24 °С.

Хлоропласты выделяли, как описано ранее [10], из листьев проростков растиранием в фарфоровой ступке в среде, содержащей 50 мМ трицин–КОН, рН 7,8, 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂, центрифугированием при 500 g в течение 5 мин при 4 °С. Хлоропласты осаждали из полученной надосадочной жидкости центрифугированием при 2000 g 5 мин и суспендировали в той же среде. Митохондрии выделяли, руководствуясь описанием в работе [11]. Корни проростков гороха растирали в ступке в среде того же состава, что и для хлоропластов. Полученный гомогенат центрифугировали при 5000 g 5 мин при 4 °С. Из надосадочной жидкости митохондрии осаждали центрифугированием при 15000 g 15 мин при 4 °С. При необходимости хлоропласты и митохондрии отмывали раствором 50 мМ трицин–КОН, рН 7,8, 35 мМ NaCl, 0,4 М сахарозы и 1 мМ MgCl₂ и осаждали центрифугированием в тех же условиях. Хлоропласты и митохондрии хранили в среде того же состава при 4 °С и использовали в течение 3–4 ч после выделения. Содержание белка в хлоропластах, митохондриях

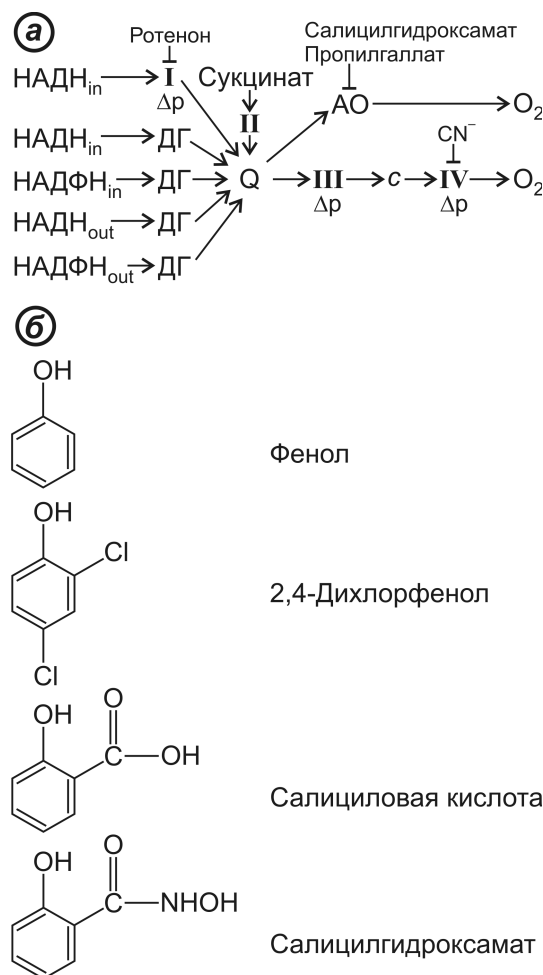


Рис. 1. Дыхательная цепь митохондрий растений (а) и структура испытанных соединений (б). а — НАДН_{in} и НАДФН_{in}, внутримитохондриальные НАДН и НАДФН; НАДН_{out} и НАДФН_{out}, внемитохондриальные НАДН и НАДФН; I–IV, комплексы дыхательной цепи; Q, убихинон; с, цитохром с; ДГ, дегидрогеназы; АО, альтернативная оксидаза; Δр, протондвижущая сила, равная сумме трансмембранной разности электрических потенциалов (ΔΨ) и трансмембранной разности рН (ΔрН)

и надосадочной жидкости от них определяли с помощью бицинхониновой кислоты и сульфата меди [12]. Разрушение ядер устьичных клеток в пленках эпидермиса, изолированных с нижней поверхности листьев гороха, регистрировали, как описано ранее [8].

НАДН-оксидазную активность хлоропластов, митохондрий и надосадочной жидкости от них, а также активность коммерческой пероксидазы хрена (ICN Biomedicals Inc., США) определяли оксиметрически по поглощению O₂ в расчете мкмоль O₂/ч на 1 мг белка.

Гибель клеток регистрировали по разрушению клеточных ядер. Определяли долю клеток с разрушенными ядрами и лишенных ядер в расчете на 250–600 обследованных клеток (в 2–3 пленках эпидермиса) в каждом из вариантов опыта. Приведены доверительные интервалы (α = 0,05).

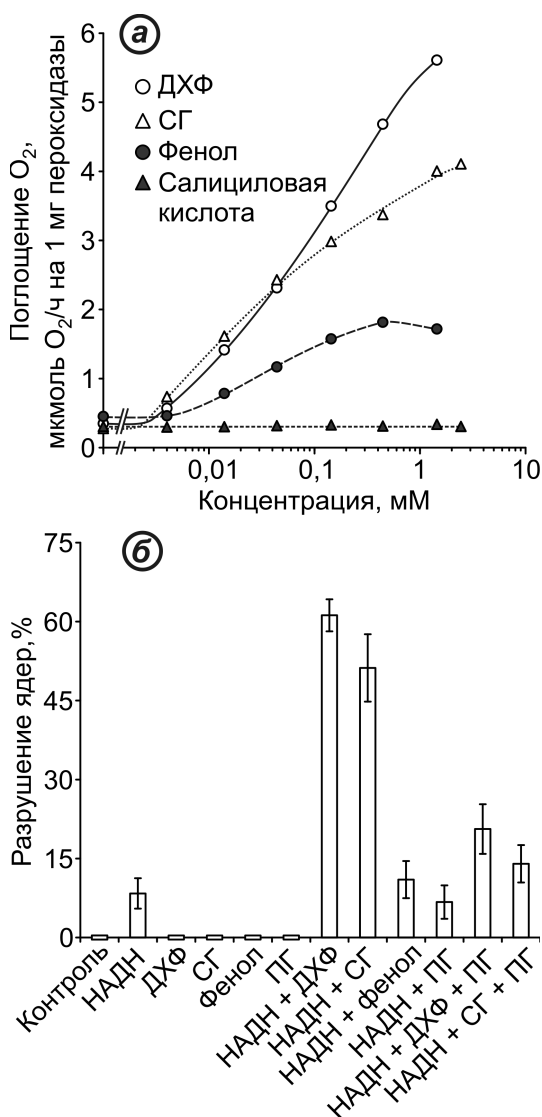


Рис. 3. НАДН-оксидазная активность пероксидазы как функция концентрации ДХФ, СГ, фенола и салициловой кислоты (а) и разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха в условиях НАДН-оксидазной реакции пероксидазы (б). а — Условия инкубации, как на рис. 2. Добавки: 40 ед. активности/мл пероксидазы хрена, 1 мМ НАДН, ДХФ, СГ, фенол и салициловая кислота. б — К пленкам эпидермиса, инкубируемым в дистиллированной воде, добавляли 1 мМ НАДН, 1 мМ ДХФ, 2 мМ СГ и 0,1 мМ ПГ, инкубировали 23 ч в темноте

каталазой, т.е. зависит от H_2O_2 , и подавляется антиоксидантом ПГ, который также ингибирует альтернативную оксидазу митохондрий растений [1, 2]. Полученные результаты согласуются с данными литературы: СГ в концентрациях ниже 15 мМ стимулировал поглощение O_2 корнями гороха, которое, по-видимому, не было обусловлено взаимодействием СГ с компонентами дыхательной цепи митохондрий, в частности, стимуляцией ее цитохромной ветви, и связано с СГ-зависимой активацией пероксидазы [13, 14].

Данные рис. 2, и–н иллюстрируют НАДН-оксидазную активность пероксидазы хрена. Реакция

активируется СГ и подавляется CN^- (рис. 2, и) или ПГ (рис. 2, к). СГ может быть заменен на фенол (рис. 2, л) или ДХФ (рис. 2, м), в обоих вариантах реакция чувствительна к ПГ. В отличие от НАДН, сукцинат не влияет на пероксидазную активность (рис. 2, н). Активность пероксидазы хрена зависит от природы субстрата и снижается в ряду: ДХФ, СГ, фенол (рис. 3, а). Салициловая кислота не поддерживает реакцию. Известно, что пероксидаза хрена, находясь в форме соединения III (Per^{6+}), быстро и необратимо инактивируется салициловой кислотой в присутствии H_2O_2 , превращаясь в вердогеомпротейн [15].

Как поставщик активных форм кислорода апопластная пероксидаза участвует в реализации гиперчувствительного ответа — локальной гибели клеток растений на воздействие инфекционных возбудителей или их сигнальных соединений — элиситоров [16]. Активные формы кислорода вызывают гибель клеток в эпидермисе листьев, регистрируемую по разрушению ядер устьичных и эпидермальных клеток [17]. Данные на рис. 3, б демонстрируют разрушение ядер устьичных клеток в эпидермисе из листьев гороха. Разрушение ядер, вызванное НАДН, возрастает при добавлении ДХФ или СГ, практически не меняется при добавлении фенола и подавляется ПГ (рис. 3, б).

Ускорение окисления НАДН в митохондриях посредством СГ ([3], рис. 2, а, б) связано с его участием в НАДН-зависимой пероксидазной реакции. Уравнения, представленные во введении, позволяют объяснить стимуляцию окисления НАДН фенольными соединениями с участием пероксидазы. Пероксидаза²⁺ и пероксидаза³⁺, реагируя с O_2 и O_2^- (реакции 9 и 10), окисляются до пероксидазы⁶⁺. Радикал $СГ^*$, образующийся в реакциях 2 и 3, восстанавливается НАДН с образованием радикала $НАД^*$ (реакция 11), окисляющегося O_2 (реакция 6). Таким образом, СГ через реакции 2, 3 и 11 стимулирует поглощение O_2 через образование $НАД^*$. Судя по данным рис. 2 и 3, а, стимулирующее действие СГ на поглощение O_2 связано с реакциями 11 и 6, но не 9 и 10, поскольку скорость поглощения O_2 в отсутствие СГ мала. Образование радикала $НАД^*$ возможно также в реакциях 4 и 5, но поглощение O_2 с НАДН значительно усиливается СГ (рис. 2 и 3, а): пероксидаза⁵⁺, по-видимому, предпочитает восстанавливаться СГ (реакции 2 и 3), но не НАДН (реакции 4 и 5). Будучи ингибитором альтернативной оксидазы, СГ тормозит окисление сукцината [3], который не пригоден как субстрат оксидазной реакции с пероксидазой (рис. 2, н).

Полученные результаты показывают, что ингибиторы альтернативной оксидазы митохондрий растений, являющиеся производными фенола, оказывают противоположное действие на пероксидазу: СГ, подобно ДХФ и фенолу, ускоряет НАДН-оксидазную реакцию, ПГ ингибирует ее. Наблюдаемая

НАДН-оксидазная активность ведет к образованию активных форм кислорода, вызывающих разрушение клеточных ядер и гибель клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moore A.L., Siedow J.N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1059. N 2. P. 121–140.
2. Rasmussen A.G., Soole K.L., Elthon T.E. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. Vol. 55. P. 23–39.
3. Samuilov V.D., Kiselevsky D.B. Effect of cationic plastoquinone SkQ1 on electron transfer reactions in chloroplasts and mitochondria from pea seedlings // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. Vol. 80. N 4. P. 417–423.
4. Yamazaki I., Yokota K. Oxidation states of peroxidase // *Mol. Cell. Biochem.* 1973. Vol. 2. N 1. P. 39–52.
5. Halliwell B. Lignin synthesis: The generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols // *Planta*. 1978. Vol. 140. N 1. P. 81–88.
6. Bronnikova T.V., Fed'kina V.R., Schaffer W.M., Olsen L.F. Period-doubling bifurcations and chaos in a detailed model of the peroxidase-oxidase reaction // *J. Phys. Chem.* 1995. Vol. 99. N 23. P. 9309–9312.
7. Hauser M.J.B., Olsen L.F. The role of naturally occurring phenols in inducing oscillations in the peroxidase-oxidase reaction // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37. N 8. P. 2458–2469.
8. Samuilov V.D., Vasil'ev L.A., Dzyubinskaya E.V., Kiselevsky D.B., Nesov A.V. Programmed cell death in plants: protective effect of phenolic compounds against chitosan and H₂O₂ // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. Vol. 75. N 2. P. 257–263.
9. Yokota K., Yamazaki I. Analysis and computer simulation of aerobic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide catalyzed by horseradish peroxidase // *Biochemistry*. 1977. Vol. 16. N 9. P. 1913–1920.
10. Барский Е.Л., Губанова О.Н., Самуилов В.Д. Ингибирование фотосинтетического переноса электронов в хлоропластах м-хлоркарбонилицианидфенилгидразоном // *Биохимия*. 1991. Т. 56. № 3. С. 434–438.
11. Millenaar F.F., Benschop J.J., Wagner A.M., Lambers H. The role of the alternative oxidase in stabilizing the in vivo reduction state of the ubiquinone pool and the activation state of the alternative oxidase // *Plant Physiol.* 1998. Vol. 118. N 2. P. 599–607.
12. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid // *Anal. Biochem.* 1985. Vol. 150. N 1. P. 76–85.
13. de Visser R., Blacqui re T. Inhibition and stimulation of root respiration in *Pisum* and *Plantago* by hydroxamate: its consequences for the assessment of alternative path activity // *Plant Physiol.* 1984. Vol. 75. N 3. P. 813–817.
14. Brouwer K.S., van Valen T., Day D.A., Lambers H. Hydroxamate-stimulated O₂ uptake in roots of *Pisum sativum* and *Zea mays*, mediated by a peroxidase: its consequences for respiration measurements // *Plant Physiol.* 1986. Vol. 82. N 1. P. 236–240.
15. Kawano T., Muto S., Adachi M., Hosoya H., Lapeyrie F. Spectroscopic evidence that salicylic acid converts a temporally inactivated form of horseradish peroxidase (compound III) to the irreversibly inactivated verdohemoprotein (P-670) // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. Vol. 66. N 3. P. 646–650.
16. Allan A.C., Fluhr R. Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells // *Plant Cell*. 1997. Vol. 9. N 9. P. 1559–1572.
17. Samuilov V.D., Lagunova E.M., Beshta O.E., Kitashov A.V. CN[−]-Induced degradation of nuclei in cells of pea leaves // *Biochemistry (Mosc.)*. 2000. Vol. 65. N 6. P. 696–702.

Поступила в редакцию
20.10.15

SALICYLHYDROXAMIC ACID ACCELERATES THE NADH OXIDASE ACTIVITY OF PEROXIDASE IN SUSPENSIONS OF PEA MITOCHONDRIA AND CHLOROPLASTS

V.D. Samuilov*, D.B. Kiselevsky

Department of Immunology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

*e-mail: vdsamuilov@mail.ru

Salicylhydroxamic acid (SHAM), an inhibitor of the alternative oxidase in plant mitochondria, accelerated the NADH-oxidase activity in suspensions of mitochondria and chloroplasts, obtained by their isolation from the roots or leaves of pea, respectively. The reaction was suppressed by washing mitochondria and chloroplasts. It also proceeded in supernatants where the organelles were removed by centrifugation. The reaction was sensitive to CN[−] and propyl gallate, an antioxidant. In addition to SHAM, NADH oxidation was stimulated by 2,4-dichlorophenol or phenol, but not by salicylic acid. The acceleration of NADH oxidation by the phenolic compounds occurred in the presence of commercial horseradish peroxidase. It is due to the involvement of these compounds in the NADH-dependent peroxidase reaction. 2,4-Dichlorophenol and SHAM enhanced significantly destruction of nuclei in guard cells of the epidermis from pea

leaves induced by generation of reactive oxygen species under oxidation of exogenous NADH by means of the apoplastic peroxidase.

Key words: *respiratory chain, alternative oxidase, peroxidase activity, mitochondria, chloroplasts, horseradish peroxidase, phenolic compounds, salicylhydroxamate.*

Сведения об авторах:

Самуилов Виталий Дмитриевич — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: vdsamuilov@mail.ru

Киселевский Дмитрий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры иммунологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-56; e-mail: dkiselevs@mail.ru

ИММУНОЛОГИЯ

УДК 57.083.3

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ ГЛИКОПРОТЕИНА ВИРУСА ЭБОЛЫ

О.Б. Шемчукова¹, И.Г. Дементьева¹, Н.Е. Варламов¹, Л.П. Позднякова¹, М.Н. Боков¹,
Т.К. Алиев^{2,*}, А.А. Панина³, Д.А. Долгих⁴, М.П. Кирпичников⁴, П.Г. Свешников¹

¹ *Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения;*

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

² *кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;*

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

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

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

⁴ *кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;*
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

** e-mail: ta12345@list.ru*

Проведена иммунизация мышей BALB/c рекомбинантным гликопротеином вируса Эбола. В результате селекции и клонирования мышинных гибридом получено пять генетически стабильных клонов моноклональных антител GPE118 (IgG), GPE274 (IgM), GPE325 (IgM), GPE463 (IgM) и GPE534 (IgG). Проведены выделение и очистка указанных антител из асцитной жидкости мышей линии BALB/c с использованием аффинной хроматографии на сорбенте белок G-сефарозе (для IgG) и методом преципитации эуглобулинов (для IgM). Проведен иммунохимический анализ эпитопной специфичности выделенных антител с целью отбора не менее трех из них в качестве компонентов комбинированного терапевтического средства для профилактики и лечения геморрагической лихорадки. Из данных иммуноблоттинга и сэндвич-ИФА следует, что эпитоп, узнаваемый GPE 534, отличается от эпитопов, узнаваемых моноклональными антителами GPE 118 и GPE 325. Последние два антитела также различаются по эпитопной специфичности, о чем свидетельствуют данные иммуноблоттинга и характер взаимодействия указанных антител с интактным и окисленным (частично дегликозилированным) рекомбинантным гликопротеином. Для исследования биологической активности и разработки на их основе рекомбинантных продуктов выбраны три кандидатных высокоаффинных моноклональных антитела — GPE 534, GPE 118 и GPE 325.

Ключевые слова: вирус Эбола, гликопротеин вируса Эбола, гибридома, моноклональные антитела, мыши линии BALB/c, не прямой ИФА, сэндвич-ИФА, иммуноблоттинг.

Впервые вирус Эбола (EBOV) появился в 1976 г. в Судане и Демократической республике Конго (в то время — Заир). Первоначальные вспышки не были массовыми, но привлекли к себе внимание из-за высокого уровня смертности, достигающего до 90%. Новый вариант вируса Эбола появился весной 2014 г. в Гвинее, где ранее такого заболевания не наблюдалось [1]. Несмотря на усилия международных организаций, эпидемия лихорадки Эбола распространилась на Сьерра-Леоне, Либерию и Нигерию.

В течение последних 10 лет было предложено несколько подходов для лечения лихорадки Эбола. Внутривенное введение ингибиторов коагуляции крови, таких как рекомбинантный человеческий активированный белок С [2], повышает выживаемость на 18%. Другим подходом является использование синтетических антисмысловых аналогов олигонуклеотидов, образующих дуплексы со специфическими РНК вирусов [3]. Внутривенное вве-

дение малых интерферирующих РНК привело к повышению выживаемости в интервале от 66 до 100% в зависимости от количества инъекций [4]. Однако необходимо подчеркнуть, что все вышеописанные методы будут эффективны, только если лечение начнется в течение первых 30–60 мин от момента заражения.

Разработка средств антителотерапии в отношении вируса Эбола проводится с 1990-х гг. Из восьми белков вируса ключевой мишенью для средств иммунотерапии является вирусный гликопротеин (GP), являющийся решающим фактором патогенности. Этот белок находится на поверхности вирусного капсида и служит для прикрепления вируса и слияния с мембраной. GP подвергается пост-трансляционному расщеплению и образует две субъединицы, связанные дисульфидной связью: GP1 и GP2. Субъединица GP1 отвечает за прикрепление вируса к клеткам хозяина, а GP2 влияет на слияние мембран вируса и клетки [5]. GP является центральным

компонентом вакцин, а также мишенью для нейтрализующих антител и ингибиторов присоединения и слияния [6].

Использование отдельных моноклональных антител (МоАт) или антител, полученных из крови выживших больных, давало неустойчивые результаты [7–9]. Вместе с тем, в опытах на приматах было показано, что в отличие от использования различных неспецифических средств антивирусной терапии пассивная иммунизация антителами позволяет добиться терапевтического эффекта при введении через 24 ч после инфицирования [10, 11]. В процессе получения и исследования на модельных животных различных МоАт против GP росло понимание того, что только комбинация антител, специфичных к различным эпитопам, может обеспечить защитный эффект и снизить летальность. Значительный прорыв был достигнут в результате создания “антительного коктейля” ZMapp [12]. В экспериментах на морских свинках и макаках-резус были испытаны различные комбинации трех химерных антител, специфичных к GP. Макаки разделили на три группы по шесть животных, которым вводили три дозы препарата в количестве 50 мг/кг на 3-й, 4-й и 5-е сут после инфицирования летальными дозами вируса, соответственно. Сформированный в результате предварительных испытаний препарат ZMapp обеспечил 100%-ую выживаемость у всех 18 обезьян.

Целью настоящей работы стало получение новых оригинальных МоАт против рекомбинантного GP, их иммунохимическая характеристика и отбор на основе данных аффинности и кросс-специфичности кандидатных МоАт, прототипов рекомбинантных антител для комбинированной терапии заболеваний, вызванных EBOV.

Материалы и методы

Для получения МоАт использовали очищенный рекомбинантный гликопротеин вирусной оболочки (GP EBOV rGPdTM, IBT Bioservices, США, Кат. № 0501-016, лот № 1409002) штамма Заир без трансмембранного домена, экспрессированный в бакуловирусе. Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали конъюгат EBOV rGPdTM и белка теплового шока HSP65 из *M. tuberculosis*, который получали, как описано в работе [13]. Одной партии мышей вводили конъюгат в подушечки задних лапок, другой — внутрибрюшинно. В обоих случаях иммунизация проводилась двукратно с интервалом в 14 сут с использованием полного (первичная иммунизация) и неполного (вторичная иммунизация) адъюванта Фройнда. Для гибридизации были использованы лимфоциты подколенных лимфоузлов и спленоциты мыши. Полученные лимфоциты гибридизировали с клетками миеломы SP2/0 по стандартной методике с использованием 50% ПЭГ 4000 [14]. Тестирование супернатантов гибридом проводили методом непрямого иммуноферментного

анализа (ИФА) с использованием биотинилированного EBOV rGPdTM. Биотинилирование гликопротеина проводили при помощи активированного эфира биотина в соотношении биотин к GP в реакционной смеси равном 15:1. МоАт нарабатывали в асцитных жидкостях мышей линии BALB/c. Асцитные жидкости получали введением 1 млн гибридных клеток в перитонеальную полость мышей линии BALB/c. Мышам предварительно за неделю до введения клеток внутрибрюшинно вводили пристан по 0,5 мл на мышь. Через 11–14 сут после введения клеток собирали асцитную жидкость. Субизотипы антител определяли методом ИФА с использованием коммерческих антисывороток в соответствии с рекомендациями производителя (набор для изотипирования Mouse Typer Isotyping Panel #1722055, Bio-Rad, США). МоАт, принадлежащие к изотипу IgG, выделяли методом аффинной хроматографии на белок G-сефарозе (GE Healthcare, США) и переводили диализом в фосфатно-солевой буфер. МоАт, принадлежащие к изотипу IgM, выделяли методом осаждения эуглобулинов путем диализа асцитной жидкости против трех смен дистиллированной воды на холоду. Полученный преципитат отделяли центрифугированием и растворяли в фосфатно-солевом буфере [15]. Степень чистоты МоАт контролировали при помощи электрофореза в 10%-ом полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) и β -меркаптоэтанола в ступенчатой буферной системе Лэммли (SDS-PAGE), а также при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе “AKTA explorer/purifier/basic” (GE Healthcare, США) в режиме гель-фильтрации с использованием колонки Superdex 200 (1 × 40 см).

Деструкцию гликанов EBOV rGPdTM проводили путем окисления белка в растворе, содержащем 5,33 мМ NaIO₄ [16]. Сравнительный не прямой ИФА исходного (интактного) и окисленного гликопротеина проводили, сорбируя 1 мкг/мл антигена EBOV rGPdTM на поверхности планшета. Антитела вносили в разведении от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. В качестве вторичных антител использовали анти-мышинный козий иммуноглобулин, конъюгированный с пероксидазой хрена, в рабочем разведении 1:50000.

Для подтверждения специфичности новой панели МоАт использовали метод иммуноблоттинга. На первом этапе проводили электрофоретическое разделение антигена GP вируса Эбола в 12%-ом полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану. Перенесенные белки выявляли с антивидовым пероксидазным конъюгатом антител против IgG мыши в течение 1 ч при 37°C.

Сэндвич-ИФА проводили с использованием полученного по методу Накане [17] конъюгата МоАт GPE534 с пероксидазой хрена.

Все значения оптической плотности по данным ИФА усреднены по результатам трех измерений.

Результаты и обсуждение

Для получения МоАт, специфичных к гликопротеину EBOV, было решено использовать рекомбинантный EBOV rGPdTM, конъюгированный с белком теплового шока HSP65 из *M. tuberculosis*. Конъюгирование рекомбинантных антигенов с микобактериальными белками теплового шока существенно повышает их иммуногенность и позволяет получать высокоаффинные МоАт против эпитопов природных белков [13]. В результате иммунизации, гибридизации с клетками миеломы SP2/0 и последующих процедур скрининга и селекции было отобрано пять групп клонов — потомков одной первичной культуры, состоящих в совокупности из 35 субклонов. Для каждого из субклонов были получены асцитные жидкости, из которых были выделены МоАт. По результатам непрямого ИФА с использованием биотинилированного EBOV rGPdTM были отобраны пять антител для дальнейшего иммунохимического анализа, из которых два МоАт принадлежали к IgG-, а три МоАт к IgM-подклассу. Результаты титрования отобранных антител представлены в табл. 1.

Набор антител ZMapp, показавший наибольшую активность в доклинических исследованиях, состоит из МоАт 13C6 и 4G7, направленных против N-концевого и муцин-подобного доменов во

фрагменте гликопротеина GP1 и МоАт 2G4 против фрагмента GP2 [18]. Оба фрагмента являются компонентами зрелого белка GP и образуются в результате расщепления белка-предшественника под действием фурина. Для проведения обоснованного отбора трех или более кандидатных МоАт анти-Эбола в первую очередь требовалось доказать, что МоАт взаимодействуют с тремя неперекрывающимися эпитопами GP. Для решения данной задачи было решено провести сравнительный анализ полученных МоАт методами иммуноблоттинга, непрямого ИФА с иммобилизованными окисленным и интактным EBOV rGPdTM, а также с помощью сэндвич-ИФА.

Рекомбинантный GP представляет собой белок с теоретической молекулярной массой ~68 кДа, без учета массы гликозидных остатков. Вследствие высокой степени гликозилирования интактный белок при электрофорезе в полиакриламидном геле мигрирует в области ~94 кДа. При условии полного восстановления дисульфидных связей GP мигрирует в полиакриламидном геле в виде двух размытых полос ~67 кДа и ~20 кДа. По данным результата иммуноблоттинга (рисунок) все МоАт интенсивно окрашивают полосу, соответствующую полноразмерной молекуле GP.

Кроме того, МоАт GPE 118, GPE 325 и GPE 534 взаимодействуют с белком с молекулярной массой ~67 кДа, а МоАт GPE 534 дополнительно выявляет полосу с молекулярной массой ~20 кДа. Эти результаты являются убедительным доказательством специфичности новой панели МоАт к GP, а также свидетельствуют о том, что по крайней мере МоАт GPE 534 отличается по эпитопной специфичности от МоАт GPE 118 и GPE 325.

Гликопротеин EBOV содержит множество сайтов гликозилирования для присоединения N- и O-гликанов, которые составляют приблизительно 1/3 молекулярной массы зрелого GP. В этой связи представляло интерес выяснить, как влияет целостность углеводных остатков GP на связывание исследуемых МоАт с модифицированным и интактным гликопротеином. С этой целью мы провели деградацию гликанов путем окисления NaIO_4 , которое приводит к удалению приблизительно 50% углеводов, включая всю фукозу, сиаловую кислоту и 2-ацетамидо-2-дезоксигалактозу [16]. Окисленный и интактный EBOV rGPdTM использовали в качестве антигена захвата в непрямом ИФА с исследуемыми МоАт. Из представленных в табл. 2 данных следует, что окисление углеводных остатков rGPdTM по-разному влияет на связывание МоАт. В большинстве случаев происходит усиление связывания (GPE 118, GPE 274, GPE 463), а для МоАт GPE 325 и GPE 534 характер связывания не изменяется. Этот результат свидетельствует о том, что анализируемые МоАт, скорее всего, направлены против разных детерминант GP.

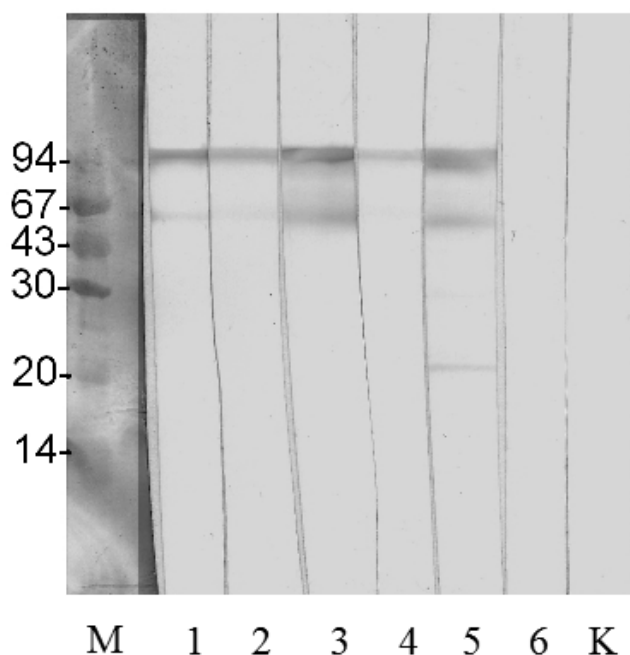


Рисунок. Иммуноблот антигена rGPdTM вируса Эбола в восстанавливающих условиях после SDS-PAGE с моноклональными антителами GPE118 (дорожка 1), GPE274 (дорожка 2), GPE325 (дорожка 3), GPE463 (дорожка 4), GPE534 (дорожка 5), Ru52 — МоАт против вируса краснухи — отрицательный контроль (дорожка 6), контроль антивидового пероксидазного конъюгата (дорожка К). М — стандарты молекулярной массы, кДа

Таблица 1

Результаты титрования биотинилированного EBOV rGPdTM в непрямом ИФА (приведены значения OD₄₅₀) с иммобилизованными антителами

rGPdTM — биотин, нг/мл	GPE118	GPE274	GPE325	GPE463	GPE534
1000	2,937	2,617	2,919	2,754	2,959
300	2,591	1,235	1,309	1,364	2,824
100	1,158	0,500	0,458	0,556	1,315
30	0,428	0,180	0,206	0,211	0,519
10	0,170	0,083	0,063	0,088	0,205
3	0,077	0,044	0,042	0,042	0,090
1	0,035	0,019	0,023	0,020	0,031
0,3	0,023	0,019	0,021	0,016	0,020

Таблица 2

Результаты титрования МоАт в непрямом ИФА (приведены значения OD₄₅₀) с иммобилизованными окисленным и интактным EBOV rGPdTM

Концентрация МоАт, нг/мл	Сорбированный антиген									
	Окисленный GP (+NaIO ₄)					Интактный GP				
	GPE 118	GPE 274	GPE 325	GPE 463	GPE 534	GPE 118	GPE 274	GPE 325	GPE 463	GPE 534
10000	1,053	1,028	1,994	0,971	1,454	0,562	0,499	1,872	0,491	1,462
3000	0,776	0,681	1,723	0,645	1,204	0,498	0,394	1,851	0,403	1,276
1000	0,607	0,491	1,529	0,484	1,019	0,377	0,324	1,811	0,326	1,202
300	0,499	0,346	0,858	0,353	0,743	0,279	0,256	1,238	0,269	1,067
100	0,366	0,214	0,447	0,202	0,532	0,178	0,208	0,657	0,248	0,898
30	0,180	0,080	0,154	0,095	0,284	0,114	0,137	0,326	0,144	0,561
10	0,053	0,029	0,053	0,026	0,110	0,051	0,073	0,171	0,080	0,258

Окончательный вывод об эпитопной специфичности был сделан на основании данных сэндвич-ИФА. При проведении твердофазного сэндвич-ИФА для детекции мономерных антигенов антитело захвата иммобилизуют на твердую фазу, затем добавляют антиген и после формирования иммунного комплекса на твердой фазе вносят второе антитело, меченное ферментом. Если каждое МоАт в паре направлено против разных (неперекрывающихся) эпитопов, то происходит образование тройного комплекса: антитело захвата — антиген — конъюгат.

Сэндвич-ИФА проводили в двух режимах: в присутствии (+Ag) и в отсутствие (–Ag) антигена EBOV rGPdTM. Титрование конъюгата в отсутствие антигена позволяло оценить вклад неспецифического связывания. По результатам титрования пероксидазного конъюгата МоАт GPE534 в сэндвич-ИФА (табл. 3) наблюдается, что при разведении конъюгата 27000 и 81000 значения оптической плотности OD₄₅₀ (выделены полужирным

шрифтом) в присутствии антигена превышают значения контроля (–Ag). Это может свидетельствовать о том, что МоАт 534 образует тройной комплекс как с МоАт GPE 118, так и с МоАт GPE 325.

В результате проведения иммунохимического анализа двух антител IgG- и трех антител IgM-изотипа против гликопротеина вируса Эбола было идентифицировано три кандидатных МоАт, взаимодействующих с различными эпитопами антигена. Так, из данных иммуноблота и сэндвич-ИФА следует, что эпитоп, узнаваемый МоАт GPE 534, отличается от эпитопов МоАт GPE 118 и GPE 325. Последние два антитела также различаются по эпитопной специфичности, о чем свидетельствуют данные иммуноблоттинга и характер взаимодействия указанных антител с интактным и окисленным EBOV rGPdTM.

МоАт GPE 534, GPE 118 и GPE 325 представляют собой высокоаффинные антитела (табл. 1),

Таблица 3

Результаты титрования конъюгата МоАт GPE534 с пероксидазой (приведены значения OD₄₅₀) в сэндвич-ИФА с использованием каждого из антител в качестве сорбента и антигена EBOV rGPdTM в концентрации 50 нг/мл (+Ag) и 0 нг/мл (–Ag)

Разведение конъюгата GPE534-HRP	GPE118		GPE274		GPE325		GPE463		GPE534	
	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag	+Ag	–Ag
3000	3,267	3,141	2,429	2,208	3,168	2,922	2,399	2,322	2,674	2,765
9000	3,222	3,133	1,774	1,556	3,160	2,029	1,814	1,632	1,743	1,740
27000	3,197	1,756	0,930	0,772	2,291	1,076	0,986	0,855	0,803	0,866
81000	2,430	0,969	0,402	0,330	1,088	0,453	0,432	0,356	0,323	0,325

специфичные к разным детерминантам ГР. Данная совокупность свойств является весомой предпосылкой для проведения тестирования указанных антител или их рекомбинантных производных на животных, инфицированных вирусом Эбола.

Работа выполнена с использованием средств субсидии (Соглашение № 14.607.21.0096), выделя-

емой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы” (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baize S., Pannetier D., Oestereich L. et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea // N. Engl. J. Med. 2014. Vol. 371. N 15. P. 1418–1425.

2. Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever: overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event // J. Infect. Dis. 2003. Vol. 188. N 11. P. 1618–1629.

3. Geisbert T.W., Hensley L.E., Jahrling P.B., Larsen T., Geisbert J.B., Paragas J., Young H.A., Fredeking T.M., Rote W.E., Vlasuk G.P. Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor: a study in rhesus monkeys // Lancet. 2003. Vol. 362. N 9400. P. 1953–1958.

4. Warren T.K., Warfield K.L., Wells J., Swenson D.L., Donner K.S., Van Tongeren S.A., Garza N.L., Dong L., Mourich D.V., Crumley S., Nichols D.K., Iversen P.L., Bavari S. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections // Nat. Med. 2010. Vol. 16. N 9. P. 991–994.

5. Volchkov V.E., Feldmann H., Volchkova V.A., Klenk H.D. Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. N 10. P. 5762–5767.

6. Lee J.E., Saphire E.O. Ebolavirus glycoprotein structure and mechanism of entry // Future Virol. 2009. Vol. 4. N 6. P. 621–635.

7. Jahrling P.B., Geisbert J.B., Swarengen J.R., Larsen T., Geisbert T.W. Ebola hemorrhagic fever: evaluation of passive immunotherapy in nonhuman primates // J. Infect. Dis. 2007. Vol. 196. Suppl. 2. P. S400–S403.

8. Parren P.W., Geisbert T.W., Maruyama T., Jahrling P.B., Burton D.R. Pre- and postexposure prophylaxis of Ebola virus infection in an animal model by passive transfer of a neutralizing human antibody // J. Virol. 2002. Vol. 76. N 12. P. 6408–6412.

9. Oswald W.B., Geisbert T.W., Davis K.J., Geisbert J.B., Sullivan N.J., Jahrling P.B., Parren P.W., Burton D.R. Neutralizing antibody fails to impact the course of Ebola virus infection in monkeys // PLoS Pathog. 2007. Vol. 3. N 1. e9.

10. Olinger G.G., Pettitt J., Kim D. et al. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. N 44. P. 18030–18035.

11. Qiu X., Audet J., Wong G. et al. Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies // Sci. Transl. Med. 2012. Vol. 4. N 138. P. 138–181.

12. Qiu X., Wong G., Audet J. et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with Zmapp // Nature. 2014. Vol. 514. N 7520. P. 47–53.

13. Sveshnikov P., Kiselev V. Methods, kits and compositions for the development and use of monoclonal antibodies specific to antigens of low immunogenicity. PCT/RU2004/000373, Filing date : 24.09.2004.

14. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. 1975. Vol. 256. N 5517. P. 495–497.

15. García-González M., Bettinger S., Ott S., Olivier P., Kadouche J., Pouletty P. Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation // J. Immunol. Methods. 1988. Vol. 111. N 1. P. 17–23.

16. Westwood J., Thomas P. Studies on the structure and immunological activity of carcinoembryonic antigen — the role of disulphide bonds // Br. J. Cancer. 1975. Vol. 32. N 6. P. 708.

17. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // J. Histochem. Cytochem. 1974. Vol. 22. N 12. P. 1084–1091.

18. Ponomarenko J., Vaughan K., Sette A., Maurer-Stroh S. Conservancy of mAb epitopes in Ebolavirus glycoproteins of previous and 2014 outbreaks // PloS Curr. 2014. Vol. 6.

Поступила в редакцию
02.09.2015

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO EBOLA VIRUS GLYCOPROTEIN

O.B. Schemchukova¹, I.G. Dement'yeva¹, N.E. Varlamov¹, L.P. Pozdnyakova¹, M.N. Bokov¹, T.K. Aliev^{2,}, A.A. Panina³, D.A. Dolgikh⁴, M.P. Kirpichnikov⁴, P.G. Sveshnikov¹*

¹ Russian Research Center for Molecular Diagnostics and Therapy,
Simferopol Bulvar 8, Moscow, 117638, Russia;

² Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–3, Moscow, 119234, Russia;

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

⁴ Department of Bioengineering, School of Biology,
M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

* e-mail: ta12345@list.ru

BALB/c mice were immunized with recombinant Ebola virus glycoprotein. Following selection, screening and cloning of murine hybridomas we obtained 5 genetically stable clones of monoclonal antibodies GPE118 (IgG), GPE274 (IgM), GPE325 (IgM), GPE463 (IgM), and GPE534 (IgG). These antibodies were isolated and purified from ascitic fluid of BALB/c mice using Protein G affinity chromatography (IgG) and euglobulin precipitation method (IgM). For the selection of at least 3 candidate antibodies to be tested in biological assays as components of an antibody cocktail for the prophylaxis and treatment of hemorrhagic fever, we carried out an immunochemical analysis of epitope specificity of isolated antibodies. Based on immunoblotting and sandwich ELISA data, it became evident that the epitope recognized by GPE 534 is different from GPE 118 and GPE 325 epitopes. The latter two antibodies also have different epitope specificity. It is evidenced from immunoblotting data as well as from binding data of these antibodies with intact and oxidized (partly deglycosylated) recombinant glycoprotein. For the studies of biological activity and the development of recombinant counterparts, we isolated 3 candidate high-affinity monoclonal antibodies GPE 534, GPE 118, and GPE 325.

Key words: *Ebola virus, Ebola virus glycoprotein, hybridoma, monoclonal antibodies, BALB/c mice, indirect ELISA, sandwich ELISA, immunoblot.*

Сведения об авторах

Шемчукова Ольга Борисовна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: rcmdt404@yandex.ru

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

Варламов Николай Евгеньевич — вет. врач Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения. Тел.: 8-499-613-23-65; e-mail: rcmdt404@ya.ru

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

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

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

Панина Анна Алексеевна — науч. сотр. Института биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Тел.: 8-495-330-66-38; e-mail: panina@ibch.ru

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

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

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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.323

МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ
ПО РЕЗОНАНСНОМУ ПЕРЕНОСУ ЭНЕРГИИ И ПЕРЕКИСНОМУ ОКИСЛЕНИЮ

Г.А. Армеев, Т.К. Горковец, Д.А. Ефимова, 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@molsim.org*

Обсуждаются методы построения трехмерных моделей ДНК в комплексе с белками с помощью компьютерного моделирования и не прямых методов изучения конформации макромолекул. Рассматриваются способы интерпретации экспериментальных данных, полученных непрямыми методами изучения трехмерной структуры биомолекул. Обсуждаются аспекты интеграции такого рода данных в процесс построения молекулярных моделей ДНК-белковых комплексов на основании геометрических характеристик ДНК. Предлагается алгоритм поиска конформации таких комплексов на основе данных экспериментов по ферстеровскому резонансному переносу энергии (FRET) и перекисному окислению ДНК (анализируемому с помощью метода гидроксильного футпринтинга), а также информации о локальной гибкости ДНК. Алгоритм апробирован на примере построения гипотетической модели ДНК в нуклеосоме, связанной с гистоном H1.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, ДНК, FRET, футпринтинг, нуклеосома, хроматин.

Структура ДНК-белковых комплексов влияет на течение множества процессов, таких как транскрипция, репликация и репарация. В исследованиях структуры додекамеров ДНК было показано, что реальная конфигурация этой макромолекулы значительно отличается от структуры идеальной двунитевой спирали. Необходимость существования более высоких уровней организации ДНК очевидна, так как геном эукариотического организма не может поместиться в относительно компактном ядре в полностью развернутом виде.

В 1974 г. Р. Корнбергом [1] были открыты структурные единицы компактизации хроматина, которые позже были названы нуклеосомами. Пространственная структура нуклеосом долгое время оставалась неизвестной, и лишь в 1997 г. методом рентгеноструктурного анализа (РСА) была впервые определена структура нуклеосомы с почти атомарным разрешением [2]. Нуклеосома представляет собой октамер белков гистонов, который несет на себе 145–147 нуклеотидных пар. ДНК закручена вокруг октамера, образуя 1,65 витка левозакрученной суперспирали. Белковое ядро нуклеосомы образует цилиндр диаметром 65 Å и высотой 60 Å.

На уровне единичных нуклеосом осуществляется тонкая регуляция работы генетического аппарата клетки. Одним из ярких примеров регуляции экспрессии генов является так называемый нуклеосомный барьер [3]: вероятность прохождения РНК-

полимеразы II сквозь нуклеосому зависит от типа и структуры нуклеосомы. Помимо этого, нуклеосомы взаимодействуют со множеством разнообразных транскрипционных факторов и структурных белков. Существует большое количество гистоновых вариантов, последовательность и структура которых отличается от канонических, что определяет их специфические свойства [4]. Например, в областях центромер хромосом ДНК находится в специфических нуклеосомах, содержащих модифицированный гистон CenH3 (CENP-A).

Нуклеосомы являются ключевыми и фундаментальными единицами упаковки ДНК. Их взаимодействие, а также пространственная конфигурация хроматина определяют процессы реализации и передачи генетической информации. Значительным прорывом, повысившим интерес к изучению нуклеосом, стало получение данных об их атомарном устройстве. На данный момент в банке данных PDB (Protein Data Bank) насчитывается более 100 структур различных нуклеосом. Однако изучение более высоких уровней организации хроматина обычными методами структурной биологии затруднено. На данный момент одной из наиболее крупных структур, полученных с помощью метода РСА, является комплекс из четырех нуклеосом [5]. Хроматиновые фибриллы трудно изучать при помощи метода РСА, так как структуры такого размера крайне сложно кристаллизовать, к тому же места рас-

положения нуклеосом не фиксированы строго [6], а, значит, хромосомы в кристалле будут сильно отличаться друг от друга. Информацию о структуре можно получать косвенно биофизическими и биохимическими методами, например, из данных экспериментов по измерению эффективности ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) и с помощью определения профилей перекисного окисления ДНК (гидроксильного футпринтинга).

Метод FRET основан на явлении безизлучательного переноса энергии с одного красителя на другой. Красители подбирают таким образом, чтобы донор флуоресцировал в области спектра поглощения акцептора. Введение меток возможно путем замены аминокислот в белках либо азотистых оснований в ДНК на их аналоги, несущие на себе флуорофорные группировки. Вероятность переноса энергии значительно зависит от расстояния между флуоресцентными метками; таким образом, измеряя эффективность FRET, можно оценить дистанцию между мечеными участками макромолекулы. В работе [7] таким методом были показаны тонкие различия (5 Å) по данному параметру между канонической и центромерной нуклеосомой. Измерения FRET можно производить в растворе, при этом усредняется сигнал от всех находящихся в нем молекул, но измерения такого рода не позволяют судить о конформационных переходах внутри этих молекул. Помимо этого, измерения можно производить в режиме единичных молекул, собирая флуоресценцию лишь с малого конфокального объема в растворе. Такие измерения позволяют различать конформационные переходы в структуре молекул, определять заселенность разных конформаций (долю молекул, находящихся в определенной конфигурации), а также оценивать времена таких переходов. Таким образом, FRET позволяет получить набор расстояний между парами оснований в меченой макромолекуле. Комбинируя эту информацию с механическими свойствами ДНК, а также с данными гидроксильного футпринтинга, можно судить о трехмерной структуре изучаемых комплексов.

Футпринтинг является полезным методом изучения структуры ДНК в различных комплексах, будь то нуклеосома или же комплекс ДНК с транскрипционными факторами. Метод основан на определении доступности нуклеиновых кислот для атаки гидроксильными радикалами и позволяет изучать ДНК с любой последовательностью с разрешением до одного нуклеотида. Гидроксильные радикалы обладают высокой реактивностью и расщепляют сахарофосфатный остов ДНК [8,9]. Основная реакция заключается в отщеплении водородов от 3'-, 4'- и 5'-углеродов дезоксирибозы с образованием промежуточного продукта, являющегося радикалом, и последующим разрывом сахарофосфатной

цепи ДНК [9]. Данные футпринтинга можно применять для определения мест ДНК, ассоциированных с белками, что дает дополнительную информацию о пространственных ограничениях внутри макромолекул при построении молекулярных моделей.

Моделирование ДНК и нуклеосом можно производить в полноатомном приближении [10] и рассчитывать энергию конформации ДНК при помощи традиционных силовых полей (AMBER, CHARMM и т.д.). Однако поиск оптимальной конфигурации для таких моделей требует значительных вычислительных ресурсов. Для повышения скорости расчетов применяют огрубленные модели. В одной из таких моделей каждая нуклеотидная пара описывается шестью переменными (три трансляционных координаты и три вращательных), как и каждый шаг между нуклеотидными парами [11]. Таким образом, для цепи из N нуклеотидных пар конфигурация ДНК описывается набором из $(12N - 6)$ обобщенных переменных. Такой подход, в отличие от других огрубленных моделей, позволяет однозначно воссоздавать атомарную структуру молекулярного комплекса. Дополнительно в данную модель можно ввести пространственные ограничения, полученные из экспериментов по измерению эффективности FRET и определению профилей гидроксильного футпринтинга, что позволяет восстановить конфигурацию исследуемого объекта в атомарном разрешении.

Материалы и методы

Интерпретация данных FRET одиночных молекул

Расчет расстояний по данным FRET производился в соответствии с формулой:

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6},$$

где R — расстояние между флуоресцентными метками, а R_0 — ферстеровский радиус пары меток (56 Å для пары цианинового 3 и 5). Расстояние, рассчитанное для пары красителей, не соответствует расстоянию между нуклеотидными парами, так как метки закреплены на ДНК при помощи линкерного участка из 10–15 атомов углерода. Для учета смещения были созданы молекулярные модели меток. При помощи метода молекулярной динамики был построен набор их конформеров и определены координаты наиболее вероятного местонахождения меток. Моделирование производилось в программе Gromacs [12] без учета электрических взаимодействий при температуре 500 К. Полученные координаты центров меток в дальнейшем использовались для расчета расстояния между нуклеотидными парами при оптимизации геометрии ДНК.

Обработка данных гидроксильного футпринтинга

Профили футпринтинга аппроксимировали суммой функций Лоренца по методу наименьших квадратов [13]. Пики нумеровали, вероятность разрыва цепи для каждого нуклеотида определяли как площадь под функцией для соответствующего пика.

Расчет энергии деформации ДНК

Энергия деформации рассчитывалась из обобщенных переменных, описывающих конфигурацию ДНК в соответствии с формулой:

$$E_{\text{deform}} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^6 \sum_{j=1}^6 f_{ij} \Delta\theta_i \Delta\theta_j$$

$$\Delta\theta_i = (\theta_i - \theta_i^0),$$

где θ_i — значения обобщенных переменных, а f_{ij} — коэффициенты жесткости ДНК для отклонения обобщенных переменных для каждой нуклеотидной пары [14]. Расчет обобщенных переменных из атомистической структуры и восстановление координат из набора переменных производился при помощи программы 3DNA [15]. Минимизация энергии производилась по методу сопряженных градиентов.

Все расчеты производились на персональном компьютере в программной среде Python с модулем SciPy.

Результаты и обсуждение

Энергию изгиба ДНК можно рассчитывать при помощи силовых полей, которые применяют для моделирования методом молекулярной динамики, однако ресурсоемкость таких расчетов и проблемы с явным учетом электростатических взаимодействий ограничивают применение этого подхода. Другим способом расчета энергии деформации является применение набора эмпирических силовых коэффициентов, которые были получены путем анализа геометрии ДНК из множества различных кристаллических структур [14]. Расчет конформации в обобщенных координатах можно производить быстрее, потому что число переменных в модели значительно меньше.

Так как минимизация происходит в пространстве обобщенных координат конформации ДНК, а расчет расстояний в трехмерном пространстве, то на каждом шаге минимизации требуется производить расчет атомарной модели ДНК. Общий алгоритм поиска конфигурации ДНК, отвечающий

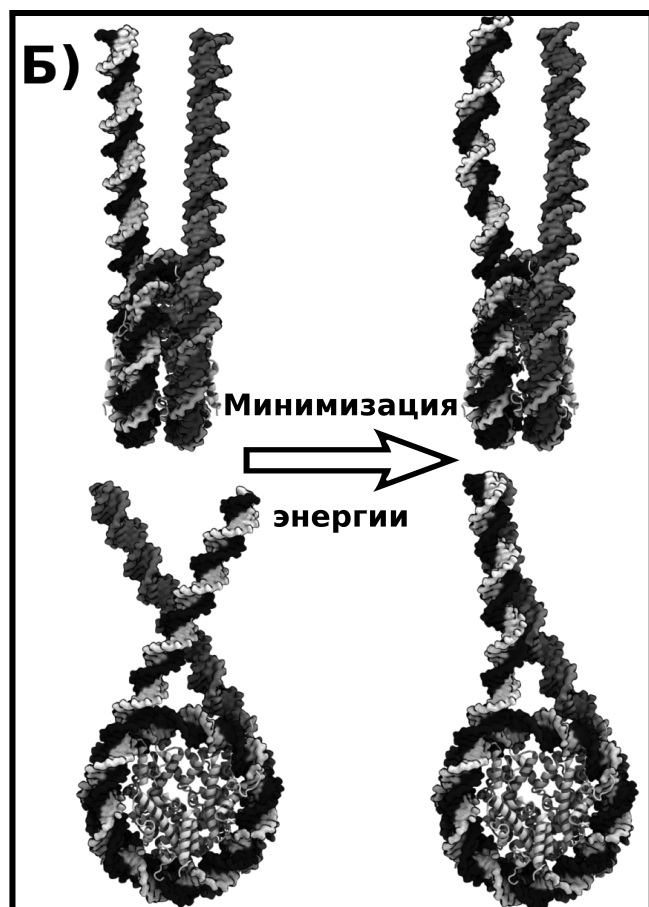
критериям жесткости нуклеиновой кислоты, расстояниям, полученным из FRET, а также ограничениям, полученным из анализа профилей футпринтинга, показан на рис. А.

К недостаткам такого подхода можно отнести отсутствие учета взаимодействий между участками ДНК, что может привести к возникновению стерических перекрытий внутри молекулы. Однако при корректном выборе участков ДНК для минимизации появление таких структур маловероятно.

В качестве объекта для испытания метода была использована нуклеосома с гистонами H1. Этот комплекс на данный момент отсутствует в банке трехмерных структур PDB, но есть работы, где его структура исследуется при помощи ядерного магнитного резонанса [16]. Гистон H1, также называемый линкерным, образует комплекс с нуклеосомами, способствуя более высокому уровню компактизации ДНК. Оказывая такое влияние на размещение/упорядочение ДНК в клетке, гистон H1 играет большую роль в регуляции экспрессии генов. Структурные особенности взаимодействия линкерного гистона и нуклеосомы до сих пор неизвестны и их изучение вызывает большой интерес.

За основу для построения модели была выбрана структура 1KX5 [17] из банка данных PDB, к которой были добавлены прямые линкеры в соответствии с последовательностью, используемой в эксперименте FRET. На основании данных футпринтинга были отобраны участки ДНК, которые не связаны с белком. После проведения минимизации геометрии ДНК с ограничениями расстояний из данных FRET была получена асимметричная структура с параллельным расположением линкерных участков ДНК (рис. Б). Весьма схожие модели были получены в работе [18], где структуру хроматосом исследовали методом гидроксильного футпринтинга и электронной микроскопии. В дальнейшем полученная структура может быть применена в качестве мишени для макромолекулярного докинга гистона H1.

Понимание молекулярных основ функционирования хроматина важно, так как существует проблема ограниченности экспериментальных методик для определения параметров взаимодействий ДНК с гистонами, транскрипционными факторами и структурными белками на молекулярном уровне. Данная проблема является следствием того, что экспериментальные методы вроде РСА, ЯМР и электронной микроскопии в состоянии определить структуры лишь небольших комплексов, которые обладают компактной и упорядоченной структурой. В то же время все больший интерес привлекают к себе структуры, не отличающиеся строгой упорядоченностью и их описание должно вестись не в рамках



одиночных структур, а в рамках набора конформационных ансамблей.

Разработанный метод позволяет создавать модели геометрии ДНК в комплексах с белками на основании интегрирования экспериментальных данных и данных о локальной жесткости ДНК при помощи молекулярного моделирования. Этот метод позволяет также получать атомистические модели и изучать особенности структуры как одиночных нуклеосом, так и их комплексов с другими макромолекулами. На примере хроматосомы показана принципиальная возможность получения геометрии линкерной ДНК, что важно для понимания устройства хроматина.

Авторы работы выражают благодарность М.П. Кирпичникову, В.М. Студитскому, А.В. Феофанову и сотрудникам их лабораторий за предоставленные экспериментальные данные.

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

Рисунок. А) Схема алгоритма поиска конформации ДНК с учетом измерений проведенных методами FRET и футпринтинга. Пунктиром выделен блок минимизации энергии при поиске структур. Б) Визуализация результата поиска конформации хроматосомы. Отобрана вторичная структура гистонов, для ДНК показана поверхность, доступная растворителю

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // *Science*. 1974. Vol. 184. N 4139. P. 868–871.
2. 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.
3. Studitsky V.M., Clark D.J., Felsenfeld G. Overcoming a nucleosomal barrier to transcription // *Cell*. 1995. Vol. 83. N 1. P. 19–27.
4. Shaytan A.K., Landsman D., Panchenko A.R. Nucleosome adaptability conferred by sequence and structural variations in histone H2A-H2B dimers // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2015. Vol. 32. P. 48–57.
5. Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // *Nature*. 2005. Vol. 436. N 7047. P. 138–141.
6. Mueller-Planitz F., Klinker H., Becker P.B. Nucleosome sliding mechanisms: new twists in a looped history // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20. N 9. P. 1026–1032.
7. Duyn V., Vinogradov S.A., Lampson M.A., Black B.E., Falk S.J., Guo L.Y., Sekulic N., Smoak E.M., Mani T., Logsdon G.A., Gupta K., Jansen L.E.T., Gregory D. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere // *Science*. 2015. Vol. 348. N 6235. P. 699–703.
8. Hayes J.J., Tullius T.D., Wolffe A.P. The structure of DNA in a nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. N 19. P. 7405–7409.
9. Jain S.S., Tullius T.D. Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. N 6. P. 1092–1100.
10. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Combined influence of linker DNA and histone tails on nucleosome dynamics as revealed by microsecond molecular dynamics simulations // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2015. Vol. 33. Suppl 1. P. 3.
11. Dickerson R.E., Bansal M., Calladine C.R., Diekmann S., Hunter W.N., Kennard O., von Kitzing E., Lavery R., Nelson H.C.M., Olson W.K. Definitions and nomenclature of nucleic acid structure parameters // *J. Mol. Biol.* 1989. Vol. 205. N 4. P. 787–791.
12. Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., van der Spoel D., Hess B., Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 29. N 7. P. 845–854.
13. Shadle S.E., Allen D.F., Guo H., Pogożelski W.K., Bashkin J.S., Tullius T.D. Quantitative analysis of electrophoresis data: novel curve fitting methodology and its application to the determination of a protein–DNA binding constant // *Nucleic Acids Res.* 1997. Vol. 25. N 4. P. 850–860.
14. 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. USA*. 1998. Vol. 95. N 19. P. 11163–11168.
15. 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.
16. Zhou B.-R., Feng H., Kato H., Dai L., Yang Y., Zhou Y., Bai Y. Structural insights into the histone H1-nucleosome complex // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. N 48. P. 19390–19395.
17. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol. Elsevier*. 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
18. Syed S.H., Goutte-Gattat D., Becker N., Meyer S., Shukla M.S., Hayes J.J., Everaers R., Angelov D., Bednar J., Dimitrov S. Single-base resolution mapping of H1–nucleosome interactions and 3D organization of the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 21. P. 9620–9625.

Поступила в редакцию
15.09.2015

MODELING OF POTEIN-DNA COMPLEXES GEOMETRY UTILISING FRET AND FOOTPRINTING DATA

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

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

*e-mail: alex@molsim.org

We discuss the question of constructing three-dimensional models of DNA complexed with proteins on the basis of computer modeling and indirect methods for studying the structure of macromolecules. We consider methods of interpreting the experimental data obtained by indirect methods for studying the three-dimensional structure of biomolecules. We discuss some aspects of the integration of such data in to the process of molecular models building (based on the geometric characteristics of DNA). We propose an algorithm for the estimation of protein-DNA complexes structure on the basis of information about the local DNA flexibility and experimental data obtained by Forster resonance energy transfer (FRET) and hydroxyl footprinting methods. Finally, we use this method for prediction of the hypothetical configuration of DNA in nucleosome bound with histone H1.

Key words: molecular modeling, DNA, FRET, footprinting, nucleosomes, chromatin.

Сведения об авторах:

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

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

Ефимова Дарья Андреевна — студент кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: dar9468@yandex.ru

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@molsim.org

БИОЛОГИЯ

УДК 577.214.32

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОХОЖДЕНИЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ
ЧЕРЕЗ НУКЛЕОСОМУ МЕТОДОМ ЭЛЕКТРОННОЙ КРИОМИКРОСКОПИИО.И. Волох¹, Ф.-К. Шей², М.Г. Карлова¹, Е.С. Трифонова¹,
В.М. Студитский³, О.С. Соколова^{1,*}¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² медицинский факультет им. Роберта Вуда Джонсона, университет Ратгерса;
США, штат Нью Джерси, 08901, г. Нью-Брансуик, ул. Патерсона, д. 125;³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз;
США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

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

Одним из перспективных и надежных методов исследования структур макромолекул является получение изображений с помощью просвечивающей криоэлектронной микроскопии и последующей трехмерной реконструкции. Методом криоэлектронной микроскопии была исследована структура комплекса РНК-полимеразы при транскрипции через нуклеосому, остановленной в позиции +42. Получены проекционные изображения и трехмерная структура комплекса ЕС-42 с разрешением 2,5 нм. Это позволило подтвердить сохранность структуры нуклеосомы при прохождении РНК-полимеразы.

Ключевые слова: РНК-полимераза, транскрипция, криоэлектронная микроскопия, нуклеосома.

Недавние исследования показали, что элонгация транскриптов является важным этапом регуляции экспрессии многих генов высших эукариот. Регуляция на стадии элонгации чаще всего осуществляется тогда, когда РНК-полимераза II (РНКП II) покидает промотор и транскрибирует ДНК первой (положение +1) нуклеосомы. В этот регуляторный процесс вовлечены ферменты, модифицирующие гистоны и ремоделирующие хроматин, а также различные элонгационные факторы. Современные исследования в этой области сосредоточены на определении природы нуклеосомного барьера для транскрибирующей РНКП II и анализе механизма действия факторов, позволяющих его преодолеть. Исследования *in vitro* показывают, что нуклеосомная структура является серьёзным препятствием для РНКП II — большинство комплексов останавливаются при встрече с первой нуклеосомой [1–4]. Высокие нуклеосомные барьеры встречаются в положениях +15 и +45 нуклеосомной ДНК [4], и их высота определяет эффективность транскрипции хроматина [5].

Один из наиболее информативных подходов для исследования механизма транскрипции хроматина РНК-полимеразой II — это остановка комплекса работающей полимеразы в определенном положении на нуклеосомной ДНК во время транскрипции и детальное изучение свойств остановленных комплексов (интермедиатов). Ранее для исследования свойств таких комплексов применяли в основном молекулярно-генетические подходы [4]. На сегодняшний день известны кристаллические

структуры нуклеосомы [6] и РНКП II [7]. Однако структурные основы формирования нуклеосомного барьера пока недостаточно исследованы, и полный комплекс РНКП с нуклеосомой не был кристаллизован.

Известно, что изменение конформационного состояния белка отражается и на его функциональной активности [8]. Таким образом, знание пространственных структур макромолекулярных комплексов дает возможность интерпретировать конформационные изменения в молекулах в процессе их активации и автоингибирования, а также при связывании с лигандами. Это необходимо как для выяснения механизмов действия (и, соответственно, идентификации доменов данного белка в качестве мишени при заболевании), так и для конструирования новых лекарств.

Признанными методами для изучения структуры и конформационных изменений в белковых молекулах являются: рентгеноструктурный анализ, ЯМР, метод спиновых меток, детекция люминесценции и спектроскопические методы. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и ограничения. Большинство методов способны определять лишь незначительные изменения полипептидной цепи и далеко не все они могут определить, какая часть белка и как изменила свою конформацию.

Преимущество метода просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) перед другими методами структурной биологии заключается в том, что этот метод позволяет визуализировать не только трехмерную структуру, но и динамику (конформа-

ционные перестройки) самых разнообразных нанобиообъектов с разрешением от 2–5 нм до атомного (1,8 нм). Одновременно метод ПЭМ не обладает многими недостатками других структурных методов: в нем нет лимитирующего размера частиц, не нужны кристаллы; количество и концентрация используемого материала достаточно малы. Модификация метода (крио-ПЭМ) позволяет наблюдать макромолекулы в нативном водном окружении в состоянии, близком к физиологическому [9]. В сочетании с методом реконструкции макромолекул, ПЭМ белков позволяет получить трехмерные структуры макромолекулярных комплексов [10].

В данной работе мы использовали метод крио-ПЭМ для получения трехмерной структуры комплекса РНК-полимеразы *E. coli* с нуклеосомой, остановленной в положении +42.

Материалы и методы

Сборка нуклеосом. Матрица для создания остановленного комплекса (ЕС-42) была получена методом ПЦР. Для получения комплекса РНК-полимеразы с нуклеосомой нуклеосомы собирались из очищенных гистонов в присутствии ДНК Т7А1-603/+42, содержащей сильный промотор Т7А1 для РНК-полимеразы *E. coli*; последовательность ДНК 603, поддерживающую сборку точно расположенной нуклеосомы (расположенной на расстоянии 50 п.н. от точки инициации транскрипции), и последовательность ДНК, обеспечивающую остановку РНК-полимеразы в нуклеосоме, в положении 42 п.н. от промотор-проксимальной границы нуклеосомы [4]. Для этого готовили смесь следующих компонентов: ДНК Т7А1-603/+42, 5 М NaCl, 1 М Tris, pH 8, 2% NP-40, 4 мМ EDTA, H₂A/2В, H₃/4, дистиллированная вода до 50 мкл. Постепенно понижали концентрацию NaCl с 2 М до 10 мМ путем диализа.

Для получения транскрипционного комплекса использовали препарат нуклеосом в концентрации 400 нг/мкл с ДНК (Т7А1-603/+42, 269 п.н.). Готовили смесь нуклеосом с РНКП *E. coli* в буфере ТВ40 (нуклеосомы (400 нг/мкл), холофермент *E. coli*). Смесь инкубировали при 37°C в течение 10 мин. Для образования комплекса ЕС-39 (содержащего РНК длиной 11 н.) к смеси добавляли 400 мкМ [ArUpC], 1 мМ АТФ, 1 мМ ГТФ и инкубировали при 37°C 10 мин. Далее для образования комплекса ЕС-45 (содержащего РНК длиной 45 н.п.) к смеси добавляли Rifampicin, CH₃ОН в присутствии 50 мкМ ЦТФ, 150 мкМ KCl и инкубировали при комнатной температуре 10 мин с последующим диализом против ТВ300 в течение 2–3 ч. Для образования комплекса ЕС-42 к смеси добавляли 1 мкМ смеси ЦТФ, УТФ, ГТФ и 25 мкМ 3'-дАТФ. Инкубировали при комнатной температуре 4 мин. Эффект остановки РНКП в заданной позиции достигается за счет лимитирования реакции транскрипции по одному рибонуклеотиду. Из-за отсутствия субстрата фермент доходит до точки на матрице, где соот-

ветствующий рибонуклеотид должен был бы включаться в формируемый транскрипт, и останавливается из-за отсутствия рибонуклеотида в растворе.

В результате был получен комплекс РНКП *E. coli* с нуклеосомой, остановленной в позиции +42 (ЕС-42), с концентрацией 86 нг/мкл. Чистоту комплекса оценивали электрофоретически.

Подготовка образцов для изучения методом крио-ПЭМ. Приготовленные образцы в объеме 3 мкл сразу же наносили на сетки с использованием аппарата Vitrobot Mark IV (FEI). Использовали медные сетки Quantifoil (Германия) с диаметром 3 мм и числом ячеек 400/2,54 см², покрытые пластиковой подложкой с отверстиями диаметром 1,2 мкм. В камере аппарата Vitrobot Mark IV поддерживали постоянные температуру (22°C) и влажность (95%). Сетки зажимали в пинцете и автоматически промокали с помощью бумажных фильтров для удаления излишков жидкости в течение 2 сек. После этого пинцет с зажатой сеткой моментально погружали в жидкий этан для образования аморфного льда, содержащего частицы белка. Хранили сетки с нанесенными образцами в контейнерах, погруженных в жидкий азот.

Криоэлектронная микроскопия и обработка изображений. Сетки помещали в криодержатель Gatan 626 (Gatan) и просматривали в криоэлектронном микроскопе Tecnai G2 Spirit TEM (FEI), при напряжении 120 кВ в режиме низкой дозы электронов (10 е/Å²). Для захвата и фиксации изображений использовали ПЗС Eagle (FEI) с размерами матрицы 4000×4000 пикселей. Частицы комплексов собирали с изображений в полуавтоматическом режиме с использованием программы BOXER [11] и копировали в один файл для дальнейшей классификации и анализа. Всего было собрано 3500 частиц комплексов. Обработку изображений проводили с использованием программы IMAGIC [12].

Результаты и обсуждение

Комплекс нуклеосомы с РНКП, остановленной в положении +42 (ЕС-42), был собран в количестве 100 мкл (86 нг/мкл). Электрофоретический анализ подтвердил наличие корректно собранных комплексов. Образцы, содержащие комплексы, были заморожены в витрифицированном льду. Поскольку замораживание в криомикроскопии происходит моментально (менее чем за 1 мс [13]), это дает основание считать, что структура комплекса, соответствующая одной из фаз прохождения РНК-полимеразы через нуклеосому, сохранялась у всех комплексов в равной мере. Одинаковая структура одиночных комплексов является необходимым условием для построения трехмерной реконструкции с использованием множества одиночных частиц [14].

Поскольку, как правило, частицы не имеют преимущественной ориентации во льду, различные

проекции отображают различные ориентации молекулы (рис. 1а).

Для повышения контраста криоизображений применяли комбинированное воздействие сферической аберрации электронного микроскопа и дефокусировки на 1,5–1,9 мкм от точного фокуса [15]. Это воздействие индуцирует фазовый сдвиг, описываемый частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ). Для того, чтобы воссоздать реальную структурную информацию, проводили коррекцию ЧКХ на изображениях.

Все 3500 проекционных изображений комплексов подвергались операции полосовой фильтрации для удаления нежелательных пространственных частот. Далее для центрирования частиц рассчитывали пики интенсивности сигнала для каждой частицы по сравнению с фоном. После этого с помощью программы IMAGIC [12] каждое изображение автоматически сдвигалось таким образом, чтобы количество пиков интенсивности вблизи центра было максимально. Центрированные частицы выравнивали с использованием корреляционного анализа [16] и итеративного алгоритма.

Для классификации сходные изображения частиц выделялись в отдельные классы. Было получено 100 классов, некоторые из которых приведены на рис. 1б. Для каждого класса рассчитывали

углы Эйлера — направления, которые определяют позицию и ориентацию частицы в пространстве относительно общего центра. Для построения трехмерной реконструкции комплекса ЕС-42 мы использовали поиск соответствующих проекций в пространстве Фурье или пространстве обратных координат [14]. Преобразование Фурье экспериментальных проекций выражается в формировании слоев вокруг общего центра, поэтому пересечения этих проекций уникальны, и их относительная ориентация может быть определена при использовании трех или более проекций.

В результате была рассчитана трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 (рис. 1г). Выбранный контурный уровень для визуализации реконструкции основывался на данных о молекулярной массе комплекса ~550 кДа и средней плотности белка, равной 810 Да/нм³. Полученная трехмерная структура представляет собой две электронные плотности, соединенные друг с другом, большая с высотой ~20 нм и шириной ~10 нм, и меньшая с диаметром ~8 нм. Разрешение полученной реконструкции, рассчитанное методом объемной корреляции Фурье [17, 18] при коэффициенте корреляции равном 0,5 оказалось 2,5 нм.

Для интерпретации полученной реконструкции мы использовали кристаллические структуры

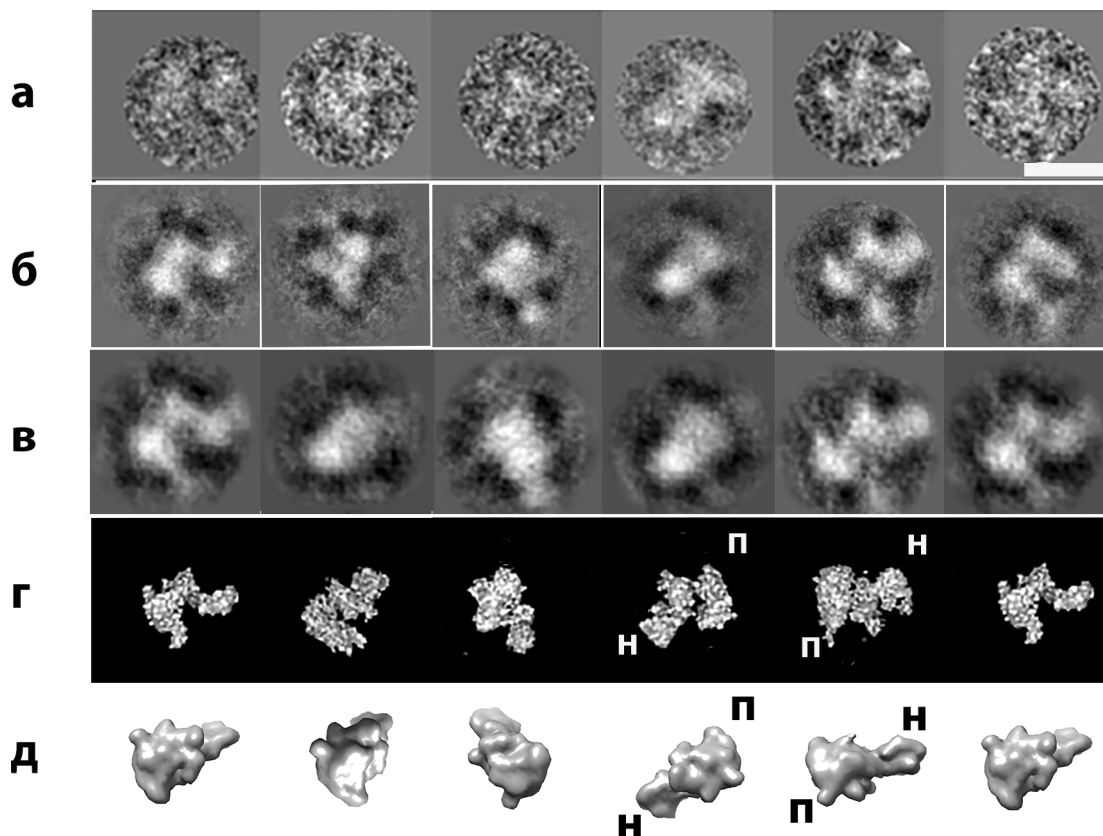


Рисунок. Анализ изображений и трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 с использованием криоданных: а — отдельные частицы комплексов во льду после полосовой фильтрации, контраст инвертирован (белок — белый); б — суммарные изображения комплексов в различных ориентациях; в — репроекции трехмерной структуры комплекса, рассчитанной с использованием изображений на (б) в соответствующих ориентациях; г — трехмерная реконструкция комплекса ЕС-42 в различных ориентациях; д — структуры РНКП (PDB ID: 2O5I) и нуклеосомы (PDB ID: 1AOI) с разрешением 2,5 нм в ориентациях, соответствующих изображениям на (г); н — нуклеосома; п — РНКП. Масштабный отрезок — 20 нм

нуклеосомы [6] и РНКП [19], отфильтрованные с разрешением 2,5 нм с помощью программы UCSF Chimera [20] (рис. 1д). При этом разрешении размеры кристаллических структур приближаются к размерам доменов, полученных с помощью крио-ПЭМ. Структура РНКП соответствует большему домену трехмерной реконструкции (отмечен символом “п” на рис. 1г, д). Меньший домен соответствует нуклеосоме (символ “н” на рис. 1г, д). В пользу этого варианта указывает и соответствие объемов субдоменов и кристаллических структур РНКП, и нуклеосомы при использованном разрешении 2,5 нм (рис. 1д). Домены в такой конфигурации связаны между собой коротким участком ДНК, по которой двигается РНКП, которая, однако, не различима на полученной нами реконструкции.

Такое расположение частей комплекса ЕС-42 соответствует выдвинутой ранее гипотезе о том, что механизм транскрипции хроматина РНКП II-типа позволяет сохранить на исходных позициях гистоны H3/H4, несущие специфичные ковалентные модификации (так называемый “гистоновый код”) и обеспечить сохранение эпигенетического статуса клетки [4]. Упомянутая гипотеза предполагает, что при осуществлении транскрипции по механизму РНКП II-типа, нуклеосомы не перемещаются, и

наблюдается обмен только гистонов H2A/H2B. Действительно, трехмерная структура интермедиата транскрипции, остановленного в позиции +42, содержит два домена, то есть нуклеосома полностью не разбирается при прохождении РНКП.

Таким образом, показана принципиальная возможность изучения комплексов РНКП с нуклеосомой, остановленных в определенной позиции, с применением криоэлектронной микроскопии. На основе полученных данных построена трехмерная реконструкция комплекса РНКП с нуклеосомой, остановленной в позиции +42 с разрешением 2,5 нм. Комплекс состоит из двух доменов, соответствующих РНКП и нуклеосоме, соединенных друг с другом. Полученные результаты могут использоваться в качестве стартовой модели для изучения и идентификации поверхностей, стабилизирующих взаимодействия в комплексах РНКП с нуклеосомой при транскрипции.

Авторы благодарят А.К. Шайтана за предоставление модели РНКП с нуклеосомой. Криоэлектронная микроскопия проводилась в ЦКП “Структурная диагностика материалов” ИК РАН им. А.В. Шубникова. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chang C.H., Luse D.S. The H3/H4 tetramer blocks transcript elongation by RNA polymerase II in vitro // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272. N 37. P. 23427–23434.
2. Kireeva M.L., Hancock B., Cremona G.H., Walter W., Studitsky V.M., Kashlev M. Nature of the nucleosomal barrier to RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2005. Vol. 18. N 1. P. 97–108.
3. Kireeva M.L., Walter W., Tchernajenko V., Bondarenko V., Kashlev M., Studitsky V.M. Nucleosome remodeling induced by RNA polymerase II: loss of the H2A/H2B dimer during transcription // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 9. N 3. P. 541–552.
4. Kulaeva O.I., Gaykalova D.A., Pestov N.A., Golovastov V.V., Vassilyev D.G., Artsimovitch I., Studitsky V.M. Mechanism of chromatin remodeling and recovery during passage of RNA polymerase II // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. Vol. 16. N 12. P. 1272–1278.
5. Bondarenko V.A., Steele L.M., Ujvari A., Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Polikanov Y.S., Luse D.S., Studitsky V.M. Nucleosomes can form a polar barrier to transcript elongation by RNA polymerase II // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24. N 3. P. 469–479.
6. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.
7. Armache K.J., Kettenberger H., Cramer P. Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. Vol. 100. N 12. P. 6964–6968.
8. Nguyen V.Q., Ranjan A., Stengel F., Wei D., Aebersold R., Wu C., Leschziner A.E. Molecular architecture of the ATP-dependent chromatin-remodeling complex SWR1 // *Cell.* 2013. Vol. 154. N 6. P. 1220–1231.
9. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens // *Q. Rev. Biophys.* 1988. Vol. 21. N 2. P. 129–228.
10. van Heel M., Gowen B., Matadeen R., Orlova E.V., Finn R., Pape T., Cohen D., Stark H., Schmidt R., Schatz M., Patwardhan A. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution // *Q. Rev. Biophys.* 2000. Vol. 33. N 4. P. 307–369.
11. Ludtke S.J., Baldwin P.R., Chiu W. EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions // *J. Struct. Biol.* 1999. Vol. 128. N 1. P. 82–97.
12. van Heel M., Harauz G., Orlova E.V., Schmidt R., Schatz M. A new generation of the IMAGIC image processing system // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116. N 1. P. 17–24.
13. Berriman J., Unwin N. Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets // *Ultramicroscopy.* 1994. Vol. 56. N 4. P. 241–252.
14. Vanheel M. Angular Reconstitution — a Posteriori Assignment of Projection Directions for 3-D Reconstruction // *Ultramicroscopy.* 1987. Vol. 21. N 2. P. 111–123.
15. Zhou Z.H., Hardt S., Wang B., Sherman M.B., Jaska J., Chiu W. CTF determination of images of ice-embedded single particles using a graphics interface // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116. N 1. P. 216–222.
16. Harauz G., Boekema E., van Heel M. Statistical image analysis of electron micrographs of ribosomal subunits // *Methods Enzymol.* 1988. Vol. 164. P. 35–49.
17. Saxton W.O., Baumeister W. The correlation averaging of a regularly arranged bacterial cell envelope protein // *J. Microscopy.* 1982. Vol. 127. Pt 2. P. 127–138.
18. van Heel M., Schatz M. Fourier shell correlation threshold criteria // *J. Struct. Biol.* 2005. Vol. 151. N 3. P. 250–262.

19. Vassilyev D.G., Vassilyeva M.N., Perederina A., Tahirov T.H., Artsimovitch I. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase // *Nature*. 2007. Vol. 448. N 7150. P. 157–162.

20. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157. N 1. P. 281–287.

Поступила в редакцию
04.07.2015

STUDY OF RNA POLYMERASE TRANSCRIPTION THROUGH NUCLEOSOME BY CRYO-ELECTRON MICROSCOPY APPROACH

O.I. Volokh¹, F.-K. Hsieh², M.G. Karlova¹, E.S. Trifonova¹, V.M. Studitsky³, O.S. Sokolova^{1,}*

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

² Robert Wood Johnson Medical School, Rutgers University, Paterson Str. 125, New Brunswick, NJ 08901, USA;

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

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

One of the most promising and reliable methods for analysis of the structure of macromolecules is cryo-electron transmission microscopy with subsequent three-dimensional reconstruction. In this study, this method was used to study transcription by RNA polymerase, stalled at the position 42 bp into a nucleosome. We obtained the projection images and solved the three-dimensional structure of the complex EC-42 with the 2.5 nm resolution. It allowed us to confirm the conformational integrity of the nucleosome, during the passage of RNA polymerase.

Keywords: *RNA polymerase, transcription, cryo-electron microscopy, nucleosome.*

Сведения об авторах:

Волох Олеся Игоревна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olesyavolokh@gmail.com

Шей Фу-Кай — науч. сотр. школы медицины им. Роберта Вудса Джонстона, Университет Ратгерса. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: fukai.hsieh@gmail.com

Карлова Мария Георгиевна — мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mkarlova@yandex.ru

Трифонова Елизавета Сергеевна — лаб. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: nyska57@gmail.com

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, зав. лаб. регуляции транскрипции и репликации биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

Сokolova Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-00-05; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 577.175.1

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ Y-ВИРУСОМ И ВИРУСОМ СКРУЧИВАНИЯ ЛИСТЬЕВ КАРТОФЕЛЯ МЕТОДОМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ

О.А. Кондакова¹, К.О. Бутенко¹, Е.В. Скурат¹, Ю.Ф. Дрыгин^{2,*}

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

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского; Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

* e-mail: drygin@belozersky.msu.ru

Для молекулярной диагностики инфекций картофеля Y-вирусом и вирусом скручивания листьев картофеля (ВСЛК) разработаны иммунохроматографические тест-системы. Чтобы размножить антиген — капсидный белок труднодоступного флоримоноограниченного ВСЛК, был создан бинарный вектор, содержащий кДНК рекомбинантной РНК тобамовируса, в которой ген капсидного белка был заменен на ген белка оболочки ВСЛК. Рекомбинантная тобамовирусная РНК упаковывалась белком оболочки ВСЛК в сферические вирусные частицы. Химерный вирус был инфекционен, а выход его и белка оболочки ВСЛК при выделении был в 800 раз выше, чем у дикого типа. К химерному вирусу были получены антитела для лабораторного и полевого анализа инфекции картофеля. На основании опыта разработки и применения диагностических тест-систем предлагается тактика рациональной массовой лабораторной и практической диагностики вирусных заболеваний организмов на молекулярном уровне.

Ключевые слова: Y-вирус картофеля, вирус скручивания листьев картофеля, химерный вирус, иммунохроматография, инфекция, молекулярная диагностика.

Молекулярная диагностика инфекций является частным случаем поиска целевой нуклеотидной последовательности и/или целевого антигена. В общем случае молекулярная диагностика не зависит от биологической природы патогена и организма хозяина, меняется только метод подготовки образца к анализу [1].

Современная массовая диагностика основана на двух принципах молекулярного взаимодействия: на молекулярной гибридизации комплементарных гетероциклических оснований нуклеиновых кислот и на узнавании антигена антителом. В недалеком будущем геномное секвенирование и генетические паспорта организмов станут обычными. В этом случае молекулярная диагностика сможет не только устанавливать окончательный диагноз, но и, возможно, позволит узнать, как возникло заболевание.

В лабораторной диагностике фитопатогенов наиболее часто используются иммуноферментные и иммунохимические анализы (ИФА, ИХА), иммунохроматографические тест-системы (ИХТС), иммуночипы; ДНК(РНК)-зонды, ПЦР и ОТ-ПЦР (обратная транскрипция-полимеразная цепная реакция), ДНК(олигонуклеотиды)-чипы. Для достижения предельной чувствительности диагностического анализа, например, в технологии ОТ-ПЦР—МГА (молекулярный-гибридизационный анализ)—ИФА, системы усиления сигнала комбинируют [2].

Доминирующими в практической лабораторной диагностике вирусов растений являются технологии

иммуноферментного анализа, молекулярного гибридизационного анализа и различные варианты полимеразной цепной реакции ввиду их высокой чувствительности, специфичности и производительности. Для одновременного выявления нескольких патогенов в одном образце предлагаются различные технические решения, из которых наиболее перспективным представляется развитие чиповой технологии.

В МГУ на кафедре вирусологии биологического факультета и в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского совместно с ВНИИКХ имени А.Г. Лорха разработано несколько высокоэффективных методов молекулярной диагностики вирусных и виroidной инфекций картофеля для анализа Центральной коллекции оздоровленных сортообразцов картофеля на базе ВНИИКХ имени А.Г. Лорха. В частности, была разработана высокочувствительная (1 пг РНК фитопатогена) технология визуальной молекулярной диагностики виroidной и вирусных инфекций картофеля методом молекулярной гибридизации ДНК-зондов, меченных диен-платиной (МГА—ИФА технология) [3]. Комбинированная технология ОТ-ПЦР и МГА—ИФА (определение продукта амплификации проводилось специфическим ДНК-зондом, который, в свою очередь, определялся иммуноферментным анализом с хемилюминисцентным субстратом) позволила достичь предельной чувствительности визуальной молекулярной диагностики виroidной и вирусных ин-

фекций картофеля — одну молекулу РНК вириода или вируса в анализируемой пробе [2]. ДНК-чип низкой плотности, разработанный нами, способен одновременно определять шесть вирусов и вириод картофеля на нитратцеллюлозной мембране [4]. В этой технологии суммарную РНК из зараженных и незараженных растений, гибрид которой с рекомбинантной ДНК определяли с помощью иммуноферментного анализа, метили гаптенем—диен-платиной. Полученные макрочипы можно было использовать повторно.

В Российской Федерации наибольший экономический ущерб картофелеводству наносят вирусы Y, M, S, X, ВСЛК (PLRV — Potato leafroll virus) и вириод скручивания листьев картофеля (PSTVd — Potato spindle tuber viroid). ВСЛК относится к роду *Polerovirus* семейства *Luteoviridae* и является флоэмно-ограниченным, труднодоступным и высоко патогенным вирусом картофеля. По литературным данным урожайность инфицированных им растений снижается на 38–70%. Растения отстают в росте, листья становятся хлоротичными, края долек листа скручиваются вдоль средней жилки. Листья больных растений хрупкие, кожистые. Клубни мелкие, часто вытянутой или веретеновидной формы, флоэмная ткань как клубней, так и стеблей и листьев некротизируется. В природе вирус переносится тлями. Установлено, что ВСЛК может присутствовать в растениях в латентном состоянии, что делает актуальным диагностику его скрытой зараженности. По вредоносности ВСЛК идет вслед за вирусом Y и наносит серьезный ущерб урожаю картофеля, а в смешанных инфекциях может уничтожить вплоть до 90% урожая. В силу высокой токсичности в природе ВСЛК накапливается в очень небольших количествах, из килограмма зараженных листьев дурмана или физалиса удается выделить 1,3 мг вирусных частиц [5].

В настоящее время единственной технологией, удовлетворяющей требованиям современной массовой диагностики на практике, является иммунохроматография на тест-полосках. Быстро развивающаяся современная аналитическая технология иммунохроматографического определения широкого спектра биологически активных соединений различной природы вытесняет в силу своей простоты и скорости анализа традиционные твердофазные методы ИФА. В литературе такой подход получил обобщенное название “проточный латеральный иммуноанализ”. Дешевые, быстрые и простые аналитические технологии на основе иммунохроматографии позволяют проводить высокочувствительные измерения без специальных навыков и оборудования даже в полевых условиях. Являясь эффективным средством диагностирования, иммунохроматографические экспресс-тесты позволяют в течение нескольких минут определить и оценить содержание различных диагностически важных биологически активных веществ [6–10].

Поскольку молекулярная диагностика фитопатогенов сельскохозяйственных растений на практике позволяет сэкономить значительные средства, разрабатываемые методы диагностики защищаются патентами, а компании-разработчики производят для продажи диагностические наборы, компоненты которых закодированы и защищены авторским правом. В силу вышеперечисленных причин, массовая молекулярная диагностика фитопатогенов этих растений в России находится в заметно отстающем состоянии.

Ранее нами было описано применение иммунохроматографического анализа для определения ВТМ [11] и обнаружения вируса X картофеля [12].

Цель настоящей работы — представить результаты разработки и испытаний прототипов иммунохроматографических тест-систем (ИХТС) для массовой диагностики инфекций картофеля вирусом Y и ВСЛК.

Материалы и методы

Вирус Y картофеля и антисыворотка к нему были получены из ВНИИКХ имени А.Г. Лорха.

Для размножения флоэмно-ограниченного ВСЛК, переносимого в природе тлями, нами был создан бинарный вектор. Растения *N. benthamiana* заражались этим вектором с помощью агроинфильтрации и через неделю изометрические вирионы, состоящие из РНК тобамовируса и белка оболочки ВСЛК, выделяли из листьев трех верхних ярусов. Зараженные листья гомогенизировали в блендере в 0,1 М цитратном буфере, доведенном 0,5 М Na_2HPO_4 до pH 6,5, в присутствии 0,1%-ного β -меркаптоэтанола и 1%-ного Тритон X-100. Гомогенат инкубировали 30 мин при перемешивании (0°C), отделяли осадок дебриса при 10 тыс. об/мин на центрифуге Beckman J-21C в роторе JA-20 в течение 10 мин, дополнительно супернатант осветляли 0,25 объемами хлороформа. Далее вирус выделяли ультрацентрифугированием при 100 000g в течение 2 ч через 20%-ную сахарозную подушку.

Иммунизацию кроликов проводили 5–7 раз суспензией химерного вируса (150–200 мкг) в фосфатно-солевом буфере (pH 7–7,2) подкожно с интервалом 10–14 сут. Первые две иммунизации проводили с полным и неполным адьювантом Фрейнда. Глобулиновую фракцию белков из кроличьей антисыворотки выделяли осаждением сульфатом аммония. Фракцию поликлональных первичных антител получали на сорбенте DEAE-Toyo-Pearl (Toyo-Soda, Япония) элюцией 50 мМ NaCl.

Концентрацию антител определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{280} = 2,08 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [13]. Оценку чистоты антител проводили электрофорезом в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Препарат коллоидного золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты

цитратом натрия [11]. Определение среднего размера частиц коллоидного золота проводили на просвечивающем электронном микроскопе Jeol 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 100 кэВ. Для электронной микроскопии использовали углеродные пленки-подложки.

В работе использовали коммерческие (“Имтек”, Россия) антивидовые (вторичные) антитела — козы иммуноглобулины (IgG) против иммуноглобулинов кролика. Иммунизацию антител к вирусам на поверхности частиц коллоидного золота проводили по методике, описанной нами ранее [11].

Экстракты из здоровых и зараженных вирусами растений получали путем растирания 100 мг листового материала или проростков в фарфоровой ступке с добавлением 1,0 мл ТФБ (10 мМ Трис, 10 мМ фосфат натрия, pH 7–7,5). Полученный гомогенат (1:10; растительная масса/объем буфера) центрифугировали 5 мин при 10 000 об/мин. Осветленный экстракт анализировали с помощью твердофазного метода “сэндвич”-ИФА. При иммунохроматографическом тестировании использовали неосветленные экстракты листьев здорового и инфицированного растения. Тест-полоска длиной 6–7 см и шириной 5 мм для проточного латерального иммуноанализа представляет собой мультимембранный композит, на котором в виде узких поперечных зон фиксированы первичные и вторичные антитела для обнаружения вируса. Для мультимембранного композита в иммунохроматографии использовали мембранные фильтры фирмы MDI (Индия).

Движение анализируемого сока (экстракта) вдоль полоски происходит за счет капиллярной диффузии. В стартовой области полоски вслед за зоной нанесения или погружения наносится конъюгат первичных антител с визуально-детектируемым коллоидным золотом (рис. 1). В ходе анализа зараженного образца в аналитической зоне ИХТС формируется окрашенный тройной комплекс (иммобилизованные антитела—определяемый вирус—конъюгат первичных антител с коллоидным золотом) в виде узкой зоны, которую можно легко регистрировать визуально. В отсутствие вируса в анализируемом растительном экстракте меченные коллоидным золотом антитела свободно проходят через зону иммобилизованных на мембране антител к вирусу и окрашенная полоса образуется только в контрольной зоне. Оценку результатов иммунохроматографии проводили визуально сравнением анализа опытных и контрольных образцов. Наличие окрашенной полосы в контрольной зоне свидетельствует о работоспособности тест-полоски.

Результаты

Применение ИХТС для диагностики наиболее опасных для картофелеводства инфекций вирусом Y и ВСЛК показано на рис. 2. Появление окрашенной

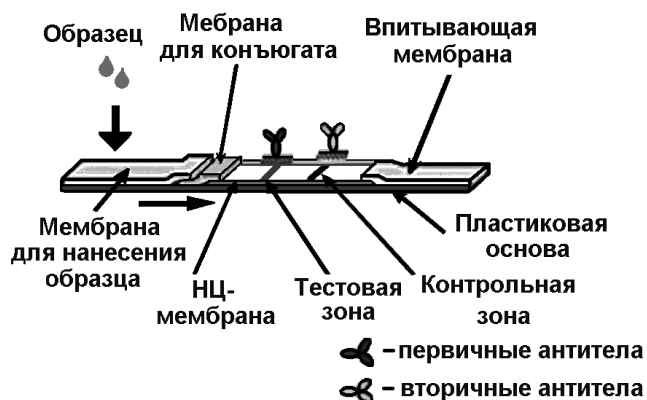


Рис. 1. Внешний вид ИХТС для экспресс-детекции целевых антигенов

аналитической зоны и отсутствие окраски в образце здорового растения или инфицированного другим (PVX — Potato virus X) вирусом (рис. 2а) указывает на достаточную чувствительность диагностики и ее специфичность. При этом время анализа занимает 2–15 мин, а объем анализируемой пробы листа или проростка клубня (сок или экстракт растительной ткани) не превышает 100 мкл.

Поскольку ВСЛК накапливается во флоэме растений в небольших количествах, что затрудняет его выделение и изучение, а тем более, получение антител к нему, нами была создана рекомбинантная ДНК, состоящая из кДНК палочковидного тобамовируса (crTMV — crucifer-infecting Tobacco Mosaic Virus), в которой ген белка оболочки был замещен на ген капсидного белка ВСЛК, стоящий под сильным промотером. Эта ДНК была вставлена в бинарный вектор. Растения *N. benthamiana* заражались вектором с помощью агроинфильтрации, в результате в зараженном растении синтезировались РНК, транспортный белок тобамовируса и белок оболочки ВСЛК. При этом образовавшийся химерный вирус, состоящий из РНК спирального тобамовируса и белка оболочки ВСЛК (целевого антигена), был инфекционен и распространялся по сосудистой системе растения.

При выделении выход химерного вируса из зараженного растения в трех повторных выделениях был в среднем в 800 раз больше по сравнению с выходом природного штамма ВСЛК. Это обстоятельство позволило получить антитела к химерному вирусу, основной антиген которого — капсидный белок — идентичен природному белку оболочки. Важно отметить, что реплицированная РНК спирального тобамовируса упаковывалась капсидным белком ВСЛК в икосаэдрический вирион. Более того, антитела к дикому типу ВСЛК узнавали химерный вирус с той же чувствительностью, что и природный изолят [14]. Полученные нами антитела к химерному вирусу узнавали природный изолят ВСЛК (рис. 2б). Независимо эти результаты были подтверждены методом твердофазного иммуноферментного анализа.

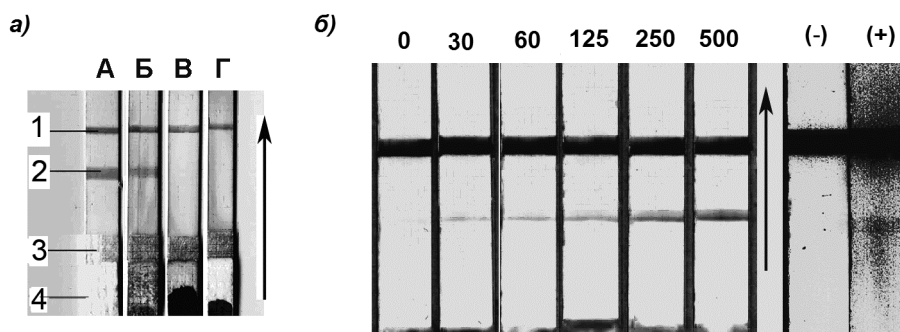


Рис. 2. а — иммунохроматографический анализ картофеля на зараженность вирусом Y. А — препарат вируса Y картофеля, 1 мкг/мл, (+)контроль. Б — экстракт из листьев зараженного картофеля; (анализ). В — экстракт из листьев здорового растения картофеля, (-)контроль. Г — экстракт из листьев картофеля, зараженного вирусом X картофеля, (-)контроль. 1 — контрольная область (вторичные); 2 — аналитическая область (первичные); 3 — область нанесения конъюгата первичных IgG-Au; 4 — зона нанесения анализируемой пробы или погружения в нее тест-полоски. Стрелка указывает направление хроматографии. б — определение вируса скручивания листьев картофеля в соке листа картофеля. В анализируемую пробу добавлено слева направо 0 → 500 нг химерного вируса. (-) — здоровое растение, (+) — картофель, зараженный диким типом вируса ВСКЛК

Получение диагностических антител к ВСКЛК является сложной задачей в связи с необходимостью использования тлей для заражения растений и его малым накоплением в растении. Эти трудности были преодолены с помощью созданного нами бинарного вектора, который после агроинокуляции табака вызывает образование инфекционного химерного вируса. Из 20 г листьев мы получали 8–10 мг вирусных частиц, подобных природным вирионам ВСКЛК.

Обсуждение результатов

В России и странах СНГ в настоящее время массовая диагностика вирусных инфекций растений осуществляется в основном с помощью технологии твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Методы этой технологии позволяют количественно определять до 1 нг/мл вирусов в экстрактах листового материала. Однако они занимают много времени, для их использования необходим квалифицированный персонал и требуется дорогостоящее оборудование, что ограничивает область их применения специализированными лабораториями.

Молекулярная диагностика вирусных инфекций на практике предполагает массовую диагностику (сотен или даже тысяч образцов), которая должна сочетать в себе избирательность определения целевого патогена, чувствительность, достаточную для выявления вируса (вириода) в полевом материале, производительность, удовлетворяющую экономике сельскохозяйственного производства, скорость, необходимую в экстренных случаях при массовых инфекциях (при эпифитотиях) и доступность, ценовую и эксплуатационную.

В семеноводческих хозяйствах ежегодная диагностика инфекций картофеля должна проводиться как на стадии производства предбазисного мате-

риала (пробирочные растения, черенки, микроклубни), так и при отборе здоровых растений в полевых условиях. Именно отсутствие систематической диагностики зараженности картофеля привело к тому, что в России картофель в разной степени, но повсеместно, заражен фитопатогенами. По разным источникам смешанные вирусные, вириодные, микробные и грибковые инфекции приводят к потерям урожая картофеля в поле до 70%.

Повсеместный массовый мониторинг зараженности посевного и полевого материала растений вирусами возможен только на основе простых, надежных, высокоспецифичных и высокочувствительных экспресс-методов, применимых для широкого круга вирусов, позволяющих проводить экспресс-диагностику в полевых условиях без специальных навыков и оборудования. Одним из основных коммерческих требований, предъявляемых ко всем современным методам внелабораторной иммунодиагностики (используемых в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве), является полная готовность набора к проведению анализа. Такой набор должен включать все необходимые реагенты.

Сегодня наиболее быстрой и простой технологией молекулярной диагностики вирусных заболеваний картофеля является иммунохроматография на тест-полосках. Во всех случаях анализ проводится до появления сигнала в контрольной зоне. Для проведения анализа с помощью ИХТС достаточно лишь добавить каплю сока анализируемого растения, что инициирует иммунохимическое взаимодействие и формирование регистрируемого сигнала в контрольной и аналитической областях. Идеальным в таких тест-системах является использование меток (окрашенные латексы, красители, коллоидное золото, липосомы с красителем, углеродные частицы и т.д.), позволяющих проводить анализ путем простого визуального считывания. Например, чувствительность определения

вируса табачной мозаики в неосветленном соке листьев табака, разбавленном в 10 раз, составляет 1 нг/мл, а полное время анализа — 2 мин [11].

Чувствительность определения вирусов Y, S и M картофеля разработанными нами ИХТС находится в пределах 10–50 нг/мл. С помощью ИХТС удается определить 30 и более наногрaмм ВСЛК и вируса Y картофеля (рис. 2). Здесь необходимо отметить три обстоятельства. Во-первых, как и в других иммунологических тестах, чувствительность диагностики инфекции определяется препаратами антигена и полученными к нему антителами, и здесь иммунохроматографический метод лишь немного уступает ИФА. Во-вторых, проточный латеральный иммуноанализ является полуколичественным методом и чаще всего используется для получения ответа в формате “да-нет”, ИФА же является строго количественным методом. Необходимо оговориться, что в последнее время в лаборатории Б.Б. Дзантиева (ИНБИ имени А.Н. Баха РАН) разработаны лабораторные и полевые рефлектометры для количественной оценки результатов иммунохроматографического анализа. И, наконец, главное, чувствительность ИХТС более чем достаточна для диагностики системной вирусной инфекции. Для ранней стадии инфекции, или если вируса в растении накапливается мало, например, в случае флeзмo-ограниченных вирусов, чувствительности иммунологических методов может и не хватить.

На основании опыта создания и использования систем для молекулярной диагностики вирусных инфекций картофеля можно заключить, что для массового анализа вирусных заболеваний исходного семенного материала экономически целесообразно использовать двухэтапный подход [15, 16]. На первом этапе выгодно использовать высокопроизводительный и доступный даже в полевых условиях экспресс-метод диагностики. Наиболее пригоден здесь иммунохроматографический метод на тест-полосках в формате “да-нет”, с помощью которого отбраковывается явно зараженный материал. Массовый скрининг (сотни образцов) семенного картофеля на зараженность вирусами Y и X при отборе базовых клонов в банке здоровых сортов был проведен этим методом нами совместно с НИИКХ Россельхозакадемии. Для проверки за-

раженности сортообразцов картофеля вирусами X, Y, M, S и ВСЛК все пробы готовили одним и тем же способом. Соответствие результатов выявления вирусов картофеля с помощью ИФА и ИХТС составило для вируса Y — 89%, а для вируса X — 100%, для здоровых растений было получено 100%-ное совпадение результатов.

На втором этапе для анализа оставшихся растений надо использовать либо ИФА, либо наиболее чувствительную диагностическую технологию полимеразной цепной реакции, в том варианте ОТ-ПЦР, который доступен лаборатории. Более достоверный диагноз можно поставить методом ПЦР в реальном времени или гнездовой ПЦР с необходимыми положительным и отрицательным контролями. Такой прошедший двухэтапный отбор семенной материал подлежит размножению и гарантирует высокий урожай в поле при подходящих климатических условиях. Обязательной является ежегодная полевая массовая диагностика инфекций семенного картофеля.

Таким образом, в настоящей работе разработаны ИХТС для молекулярной экспресс-диагностики инфекций картофеля вирусом Y и ВСЛК. На основании опыта создания систем для определения растений, инфицированных вирусами, предлагается тактика рационального применения молекулярного диагностического анализа на практике.

На очереди стоит разработка прототипов ИХТС для диагностики вирусных инфекций, наносящих большой экономический ущерб, у других овощных культур России. Дальнейшее развитие иммунохроматографического анализа возможно путем создания иммуночипов как для определения круга вирусов отдельных районированных культур растений: овощных, ягодных, косточковых и т.д., так и для наиболее экономически опасных представителей фитопатогенов, наносящих ущерб в данном регионе.

Авторы благодарят сотрудников ВНИИКХ имени А.Г. Лорха Б.В. Анисимова, Ю.А. Варицева и А.И. Ускова за иммунореагенты и коллег из ЗАО НВП “Иммунотех” МГУ имени М.В. Ломоносова за сотрудничество в разработке ИХТС.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дрыгин Ю.Ф. Детекция целевой последовательности нуклеотидов и целевого антигена // 8-я Всероссийская научно-практическая конференция “Молекулярная диагностика 2014” / М: МБА, 2014. С. 126.
2. Drygin Yu.F., Chirkov S.N., Kondakova O.A., Zinovkin R.A., Ivanov P.A., Blintsov A.N., Gavryushina E.S., Zherdev A.V., Byzova N.A., Dzantiev B.B., Atabekov J.G. High-sensitive technologies for molecular diagnostics of potato virus

and viroid infections // Potato Production and Innovative Technologies / Eds. A.J. Haverkort and B.V. Anisimov. Wageningen: Acad. Publishers, 2007. P. 274–285.

3. Кондакова О.А., Дрыгин Ю.Ф. Диагностика вирусного заболевания картофеля зондами (диен)Рt-ДНК // Биотехнология. 1999. № 4. С. 83–90.

4. Дрыгин Ю.Ф., Кондакова О.А., Чирков С.Н., Зиновкин Р.А., Киселева В.И., Атабеков И.Г. Способ одно-

временного обнаружения множества РНК-последовательностей в биологическом образце. Международный патент #WO/2009/123494.

5. Takanami Y., Kubo S. Enzyme-assisted purification of two phloem-limited plant viruses: tobacco necrotic dwarf and potato leafroll // *J. Gen. Virol.* 1979. Vol. 44. N 1. P. 153–159.

6. Weller M.G. Immunochromatographic techniques — a critical review // *Fresen. J. Anal. Chem.* 2000. Vol. 366. N 6. P. 635–645.

7. Posthuma-Trumpie T., Korf J., van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threat. A literature survey // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 393. N 2. P. 569–582.

8. Zhang G., Guo J., Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests // *Biosensors and Biodetection. Methods and Protocols* / Eds. A. Rasooly and K.E. Herold. NY: Humana Press, 2009. P. 169–183.

9. Wong R., Tse H. Lateral flow immunoassay. NY: Humana Press, 2009. 223 p.

10. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis // *Trends Anal. Chem.* 2014. Vol. 55. P. 81–93.

11. Drygin Y.F., Blintsov A.N., Osipov A.P., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Uskov A.I., Varitsev Y.A., Anisimov B.V., Novikov V.K., Atabekov J.G. High-sensitivity express immunochromatographic method for detection of plant infection by

tobacco mosaic virus // *Biochemistry (Mosc.)*. 2009. Vol. 74. N 9. P. 986–993.

12. Drygin Yu. F., Blintsov A. N., Grigorenko, V.G., Andreeva I.P., Osipov A.P., Varitsev Y.A., Uskov A.I., Kravchenko D.V., Atabekov J.G. High sensitive field test lateral flow immunodiagnosics of PVX infection // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. Vol. 93. N 1. P. 179–189.

13. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. С. 288.

14. Дрыгин Ю.Ф., Скурят Е.В., Кондакова О.А., Атабеков И.Г., Бутенко К.О. Способ получения препаративных количеств вирусных частиц флоэмно-ограниченных вирусов. Патент РФ: 2555534 от 08.06.2015 г.

15. Дрыгин Ю.Ф. Стратегия и тактика молекулярной диагностики инфекций картофеля на практике // Второе научно-практическое совещание “Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля”. М.: МГУ, 2012. С. 10–11.

16. Бутенко К.О., Скурят Е.В., Кондакова О.А., Варищев Ю.А., Гаврюшина Е.С., Дрыгин Ю.Ф., Атабеков И.Г. Полевой метод диагностики инфекции картофеля вирусом скручивания листьев на тест-полосках с антителами к химерному вирусу // *Защита картофеля*. 2014. Т. 1. № 1. С. 35–36.

Поступила в редакцию
24.07.15

MOLECULAR DIAGNOSTICS OF POTATO INFECTIONS WITH PVY AND PLRV BY IMMUNOCHROMATOGRAPHY

O.A. Kondakova¹, K.O. Butenko¹, E.V. Skurat¹, Yu.F. Drygin^{2,*}

¹ Department of Virology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Leninskiye gory 1–40, Moscow, 119992, Russia;

*e-mail: drygin@belozersky.msu.ru

Immunochromatography test systems were developed for molecular diagnostics of the potato virus Y and PLRV infection. To increase a low yield of PLRV and raise antibodies against the PLRV antigen, chimerical virus was constructed comprising the PLRV coat protein and recombinant RNA of a tobamovirus, in which capsid protein gene was replaced by the PLRV coat protein gene. Binary vector containing the DNA copy of the recombinant RNA was infectious, and yield of the chimerical virus increased up to 800 times in comparison with the WT PLRV. On the basis of experience in the development of the diagnostics of viral and viroid infections, a rational tactics is proposed for the mass laboratory and field diagnosis of viral infections on the molecular level.

Key words: potato virus Y, potato leafroll virus, chimerical PLRV virus, immunochromatography, infection, molecular diagnostics.

Сведения об авторах:

Кондакова Ольга Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-08; e-mail: olgakond@yandex.ru

Бутенко Константин Олегович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-29; e-mail: k002@yandex.ru

Скурят Евгений Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-47; e-mail: skurat@genebee.msu.ru

Дрыгин Юрий Федорович — докт. хим. наук, зав. лабораторией нуклеиново-белковых взаимодействий НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-55-29; e-mail: drygin@belozersky.msu.ru

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.226

ИЗУЧЕНИЕ СИГНАЛА СБОРКИ ВИРУСНЫХ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДОВ
У ПОТЕКСВИРУСОВ

Е.К. Петрова*, Е.А. Трифонова, Н.А. Никитин, О.А. Кондакова,
И.Г. Атабеков, О.В. Карпова

Кафедра вирусологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
* e-mail: petrova@mail.bio.msu.ru

Изучено образование вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации 5'-концевых транскриптов вируса мозаики альтернантеры с белком оболочки X-вируса картофеля (представители рода *Potexvirus*). Показано, что экпирование транскриптов вируса мозаики альтернантеры оказывает влияние на эффективность их взаимодействия с белком оболочки. При этом удаление экп-структуры у предварительно экпированных транскриптов вируса мозаики альтернантеры не препятствует сборке вирусных рибонуклеопротеидов. Удаление первых 100 нуклеотидов (вероятного участка инициации сборки) не оказало влияния на формирование вирусных рибонуклеопротеидов. Получены дополнительные доказательства того, что сборка вирусных рибонуклеопротеидов у потексвирусов не зависит от нуклеотидной последовательности РНК.

Ключевые слова: вирусы растений, вирус мозаики альтернантеры, X-вирус картофеля, вирусный рибонуклеопротеид, сборка вириона, экп-структура.

Сборка вириона является одним из основных этапов инфекционного цикла вирусов различной природы. Однако специфический сигнал упаковки (участок инициации сборки) до сих пор не охарактеризован для большинства вирусов растений со спиральной структурой. Изучение сборки вирионов и вирусных рибонуклеопротеидов (ВРНП) и поиск сигналов упаковки вирусных геномов является актуальным и важным для понимания процессов образования вирусной частицы и механизмов взаимодействия вирусных белка оболочки (БО) и РНК. Ранее в нашей лаборатории было продемонстрировано, что БО спирального X-вируса картофеля (ХВК) (род *Potexvirus*, семейство *Alfavirus*) способен *in vitro* образовывать ВРНП не только с РНК ХВК, но и с гетерологичными нуклеиновыми кислотами [1, 2]. Образующиеся ВРНП морфологически и по трансляционным свойствам идентичны гомологичным ВРНП (РНК ХВК — БО ХВК) и нативным вирионам ХВК. Было обнаружено, что инициация сборки гетерологичных ВРНП (чужеродная РНК — БО ХВК) *in vitro* так же, как и гомологичных, начинается с 5'-конца молекулы РНК и не зависит от специфической нуклеотидной последовательности. Показано, что 5'-концевые неэкпированные транскрипты РНК ХВК не образуют ВРНП при инкубации с БО ХВК *in vitro*. При этом инкубация БО ХВК с экпированными транскриптами потексвирусов приводит к формированию ВРНП, идентичных по структуре и свойствам гомологичным ВРНП и нативным вирионам

ХВК. Таким образом, важным условием сборки ВРНП *in vitro* является предварительное экпирование нуклеиновой кислоты. Однако удаление экп-структуры после предварительного экпирования РНК в дальнейшем не препятствует образованию ВРНП. Было высказано предположение, что экп-структура не является сигналом сборки сама по себе, но влияет на 5'-конец молекулы РНК, создавая конформационный сигнал упаковки и способствуя эффективному взаимодействию РНК и БО ХВК [3, 4].

В настоящей работе влияние экп-структуры на эффективность сборки ВРНП было изучено на примере другого вируса, относящегося к роду *Potexvirus* — вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт). Геном ВМАльт представлен одноцепочечной (+) РНК длиной 6606 нуклеотидов, несущей на 5'-конце экп-структуру, а на 3'-конце поли(А)-последовательность. РНК ВМАльт содержит пять открытых рамок трансляции (ОРТ): 5'-проксимальная ОРТ транслируется непосредственно с геномной РНК с образованием вирусной репликазы. ОРТ 2, 3, 4 представляют собой характерный для потексвирусов так называемый "тройной блок генов", кодирующий три транспортных белка. Продукт ОРТ 5 — белок оболочки с молекулярной массой 22 кДа [5].

Специфический сигнал упаковки для ВМАльт на данный момент неизвестен. Данные по подавлению трансляции РНК в составе ВРНП свидетельствуют о том, что в случае ВМАльт участок инициа-

ции сборки также находится на 5'-конце молекулы РНК [6, 7].

Показано, что БО ВМАльт в отсутствии РНК способен полимеризоваться *in vitro* в различных условиях с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ), сходных по своей морфологии с нативными вирионами или вРНП. Это затрудняет анализ сборки вРНП при инкубации 5'-концевых транскриптов ВМАльт с БО ВМАльт, поэтому было принято решение исследовать сборку вРНП при инкубации транскриптов с БО ХВК, который не полимеризуется в отсутствие РНК [3, 8].

Материалы и методы

Препарат ВМАльт (штамм AltMV-MU, номер FJ822136 в системе GenBank [9]) выделяли из зараженных растений портулака (*Portulaca grandiflora*) согласно [6]. Белок оболочки ХВК получали методом солевой депротенинизации, РНК выделяли фенольным методом [6].

Для получения вРНП *in vitro* смешивали РНК и белок оболочки и проводили инкубацию в стандартных условиях (в 20 мкл 0,01 М Трис-НСl-буфера pH 7,5 при комнатной температуре в течение 20 мин) [2].

Образцы для электронной микроскопии были приготовлены согласно [2, 3], анализ проводили с помощью электронного микроскопа JEM-1011 (JEOL, Япония).

Образцы для атомно-силовой микроскопии были приготовлены и проанализированы, как описано ранее [3].

Генно-инженерные конструкции и транскрипты были получены, как описано в [3]. кДНК для получения 5'-концевого транскрипта ВМАльт, соответствующего с 1-й по 1320-й нт 5'-концу РНК ВМАльт, была получена методом ПЦР на матрице плазмиды AltMV-19 (копия 1-1639 нт ВМАльт (штамм AltMV-MU) под контролем Т7 промотора в плазмиде рBluescript SK (+)) с использованием следующих пар праймеров: AltMV1-ApaI-fw (5'-ccggggcccgaaagtaagcaagcaaa-3') и AltMV1320-PstI-rev (5'-ccgctgcagtaggacagtgacacgtcaac-3'). кДНК для получения делеционного 5'-концевого транскрипта ВМАльт, соответствующего с 97-го по 1639-й нт 5'-концу РНК ВМАльт, была получена методом ПЦР на матрице плазмиды AltMV-19 (копия 1-3944 нт РНК ХВК под Т7 промотором в рSL1180 (Amp^R)) с использованием следующей пары праймеров: T7-AltMV-del96-XhoI (5'-cagctctcgagtaatacagactcactatagggccacttctcggttc-3') и AltMV-R0-NotI-m (5'-agacttcgctggcccgctgtgtat-3'). Для получения конструкции ВМАльт-1320 (1-1320 нт РНК ВМАльт) продукты ПЦР амплификации были клонированы в плазмиду рGEM5Zf(+) по сайтам рестрикции ApaI и PstI. Для получения конструкции ВМАльтΔ (97-1639 нт РНК ВМАльт) продукты ПЦР амплификации были клонированы

в плазмиду рSL1180 (Amp^R) путем двойной вставки в одно клонирование: вектор — рSL1180 (рестрикция по сайтам Xho I и Pst I); вставка-1 — ПЦР-продукт (97-303 нт ВМАльт) (рестрикция по сайтам Xho I и Not I); вставка-2 — AltMV-19 (303-1639 нт ВМАльт) (рестрикция по сайтам Not I и Pst I). Все вставки находились под контролем промотора бактериофага Т7 *E.coli*. Полученными плазмидами трансформировали клетки *E. coli* штамма XL1.

Реакцию транскрипции проводили *in vitro* с применением реактивов и ферментов (Т7-РНК-полимераза) фирмы "Promega" (США).

Кэпирование транскриптов *in vitro* проводилось с использованием набора "ScriptCap m⁷G Capping System" фирмы EPICENTRE Biotechnologies (США) согласно протоколу производителя.

Декэпирование предварительно кэпированных транскриптов проводилось с использованием кислой пирофосфатазы табака (ТАР) фирмы EPICENTRE Biotechnologies (США) по стандартному протоколу производителя.

Результаты и обсуждение

Ранее в нашей лаборатории было показано, что БО ВМАльт способен к образованию протяженных вирусоподобных частиц в отсутствии РНК в различных условиях [7]. Такая полимеризация БО ВМАльт затрудняет анализ формирования вРНП при инкубации БО ВМАльт с 5'-концевыми транскриптами РНК ВМАльт. В то же время было выявлено, что РНК ВМАльт эффективно взаимодействует с БО ХВК с образованием вРНП, по размерам и структуре идентичных гомологичным вРНП и нативным вирионам ХВК [2]. Поэтому для изучения влияния кэп-структуры и нуклеотидной последовательности 5'-конца РНК ВМАльт РНК (или транскрипт) ВМАльт инкубировали с БО ХВК.

Полученный *in vitro* некэпированный транскрипт ВМАльт, соответствующий с 1-го по 1320-й нуклеотид 5'-концу геномной РНК ВМАльт (ВМАльт-1320), инкубировали с БО ХВК. Методом ПЭМ (негативное контрастирование) показано, что образования вРНП при этом не происходит (рис. 1а). В качестве отрицательного контроля использовали БО ХВК, проинкубированный в условиях формирования вРНП в отсутствии РНК (рис. 1г). Транскрипт ВМАльт-1320 был кэпирован с помощью кэпирующей системы вируса осповакцины, и часть кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 была проинкубирована с БО ХВК, что привело к формированию вРНП (рис. 1б). Другая часть препарата кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 была обработана кислой пирофосфатазой табака (ТАР) с целью удаления кэп-структуры с 5'-конца транскрипта. Декэпирование предварительно кэпированного транскрипта ВМАльт-1320 не повлияло на сборку — при его инкубации с БО ХВК было

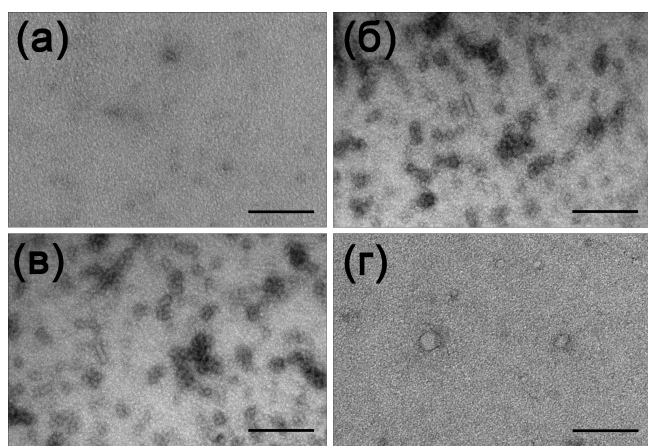


Рис. 1. Анализ образования вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации транскриптов ВМАльт-1320 с БО ХВК *in vitro*. а — Некэпированный транскрипт ВМАльт-1320; б — Кэпированный транскрипт ВМАльт-1320; в — Кэпированный транскрипт ВМАльт-1320, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Электронные микрофотографии, негативное контрастирование 2% уранилацетатом. Метка 200 нм.

зафиксировано образование частиц (рис. 1в), сходных по морфологии с частицами на рис. 1б. Таким образом, кэп-структура влияет на образование конформационного сигнала упаковки и формирование ВРНП у 5'-концевых транскриптов геномной РНК другого представителя группы потесквирусов — ВМАльт — так же, как это было показано для ХВК [3, 4]. При использованных условиях получения ВРНП количества БО в инкубационной смеси недостаточно для полной упаковки транскриптов в нитевидные частицы, сборка происходит не полностью [2]. Длина полученных ВРНП пропорциональна длине РНК, входящей в их состав [2–4], поэтому ВРНП, образующиеся при инкубации с БО ХВК коротких транскриптов, выглядят как короткие палочки.

В отличие от РНК ВМАльт для его близкого родственника — вируса мозаики папайи (ВМПп), с которым ВМАльт имеет идентичность нуклеотидных последовательностей на уровне 79,8 % — в экспериментах, проведенных *in vitro*, участок начала сборки был точно локализован как первые 47 нуклеотидов на 5'-конце РНК ВМПп [10, 11]. Можно было ожидать, что участок начала сборки у ВМАльт будет расположен там же, где у ВМПп. В связи с этим, помимо кэпированных и декэпированных транскриптов, был получен 5'-концевой транскрипт ВМАльт с делецией первых 96 нт (ВМАльтΔ), которые включают в себя сигнал упаковки ВМПп. ВМАльтΔ длиной 1542 нуклеотида соответствовал с 97-го по 1639-й нуклеотид 5'-конца молекулы РНК ВМАльт.

Методами ПЭМ и атомно-силовой микроскопии (АСМ) были проанализированы частицы, образующиеся при инкубации БО ХВК с некэпированными, кэпированными и декэпированными транскриптами ВМАльтΔ. На рис. 2 представлены

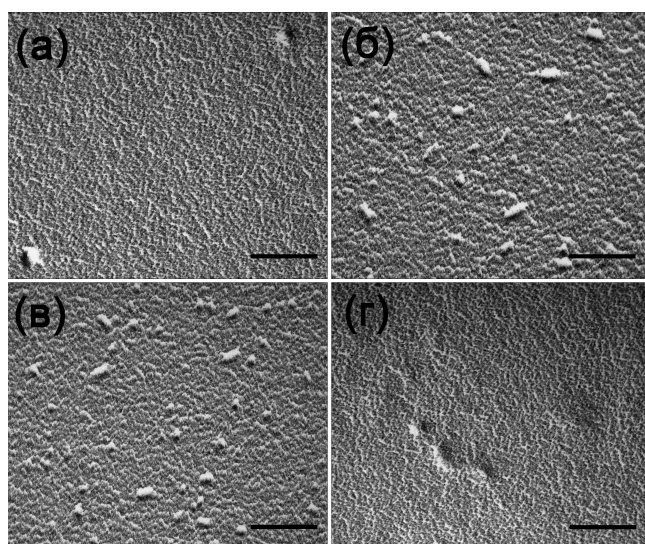


Рис. 2. Анализ образования вирусных рибонуклеопротеидов при инкубации транскриптов ВМАльтΔ с БО ХВК *in vitro*. а — Некэпированный транскрипт ВМАльтΔ; б — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ; в — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Электронные микрофотографии, угловое отклонение металлом (Pt+Pd, 7°). Метка 200 нм

результаты анализа с помощью ПЭМ (угловое напыление). Инкубация некэпированного транскрипта ВМАльтΔ с БО ХВК не приводит к образованию частиц (рис. 2а). Полученный результат не вызывает удивления, так как в транскрипте был удален участок, который, как мы предполагали, содержал участок инициации сборки по аналогии с ВМПп. Однако при кэпировании данного транскрипта и его последующей инкубации с БО ХВК было зафиксировано формирование ВРНП (рис. 2б). Полученный результат свидетельствует о том, что последовательность первых 96 нуклеотидов не содержит сигнала сборки ВРНП для ВМАльт.

Декэпирование ранее кэпированных транскриптов ВМАльтΔ также не препятствует образованию ВРНП (рис. 2в). В качестве отрицательного контроля был использован свободный БО ХВК, проинкубированный в стандартных условиях сборки (рис. 2г).

Эти данные были подтверждены методом АСМ, который показал отсутствие сборки в случае некэпированного транскрипта ВМАльтΔ (рис. 3а) и образование частиц в случае инкубации с БО ХВК кэпированного (рис. 3б) или декэпированного транскрипта ВМАльтΔ (рис. 3в). Метод АСМ позволяет измерить высоту полученных частиц. При инкубации кэпированных и декэпированных транскриптов ВМАльтΔ с БО ХВК были образованы частицы со средними высотами $8,4 \pm 0,7$ и $9,0 \pm 1,5$ нм соответственно (рис. 3б, в). Высота полученных частиц сопоставима со средней высотой ВРНП, образованных при инкубации геномной РНК ВМАльт с БО ХВК, что свидетельствует о схожей морфологии частиц [2]. При инкубации БО ХВК с некэпи-

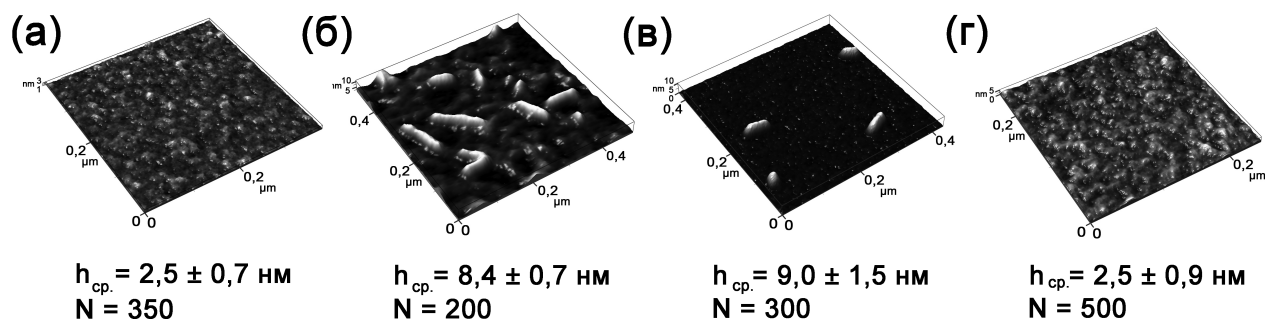


Рис. 3. Анализ методом атомно-силовой микроскопии образования ВРНП при инкубации транскриптов РНК ВМАльтΔ с БО ХВК *in vitro*. а — Транскрипт ВМАльтΔ; б — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ; в — Кэпированный транскрипт ВМАльтΔ, обработанный ТАР; г — БО в отсутствие РНК. Указаны высоты образованных структур (h_{cp}) и число измеренных частиц (N)

рованными транскриптами ВМАльтΔ или без РНК средние высоты агрегатов составили $2,5 \pm 0,7$ и $2,5 \pm 0,9$ нм соответственно (рис. 3а, г).

На основании представленных результатов можно сделать вывод, что 5'-концевые транскрипты ВМАльт взаимодействуют с БО ХВК аналогично 5'-концевым транскриптам ХВК [3, 4]: при инкубации с БО ХВК некэпированных транскриптов ВМАльт образование ВРНП зафиксировать не удалось. При инкубации с БО кэпированных транскриптов ВМАльт частицы образуются, а удаление кэп-структуры не препятствует сборке — ВРНП формируются при инкубации декэпированных транскриптов ВМАльт с БО ХВК. Делеция возможного сайта инициации сборки по аналогии с ВМПап не повлияла на результаты: некэпированные транскрипты ВМАльтΔ не одевались белком оболочки ХВК. Однако после кэпирования делеционных мутантов происходило образование ВРНП. Таким образом, можно заключить, что кэпирование оказывает существенное влияние на процесс формирования ВРНП и в случае образования ВРНП при инкубации БО с 5'-концевыми транскриптами геномной РНК другого потексвируса — ВМАльт. Данные, полученные в экспериментах с транскриптами ВМАльтΔ, позволяют предположить, что либо участок начала сборки ВМАльт отличается от участка начала сборки ВМПап, либо для ВМАльт, как и для ХВК, образование ВРНП не зависит от нуклеотидной последовательности РНК [2, 6].

Скорее всего, кэп не является сигналом упаковки или местом инициации сборки ВРНП сам по себе, так как при этом *in vivo* могла бы происходить упаковка не только вирусных РНК, но и клеточных мРНК. Однако существует вероятность, что он оказывает влияние на структуру 5'-конца вирусной РНК потексвируса, образуя конформационный сигнал упаковки, который узнаёт вирусный БО при сборке ВРНП.

Таким образом, кэпирование 5'-концевых транскриптов ВМАльт оказывает влияние на эффективность их взаимодействия с БО ХВК. Удаление кэп-структуры у предварительно кэпированных транскриптов ВМАльт аналогично удалению кэп-структуры у транскриптов ХВК не приводит к подавлению процесса формирования ВРНП при инкубации с БО ХВК. Получены дополнительные доказательства того, что сборка ВРНП у потексвируса не зависит от нуклеотидной последовательности РНК [2–4]. Можно предположить, что кэпирование изменяет структуру 5'-конца РНК потексвируса и влияет на образование конформационного сигнала упаковки, способствуя эффективному связыванию БО и вирусной РНК и образованию вирусной частицы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007). Авторы выражают благодарность М.Н. Савватееву за помощь в анализе образцов методом атомно-силовой микроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Новиков В.К., Кимаев В.З., Атабеков И.Г. Реконструкция рибонуклеопротеида вируса Х картофеля // Докл. РАН. 1972. Т. 204. № 5. С. 1259–1262.
2. Архипенко М.В., Петрова Е.К., Никитин Н.А., Протопопова А.Д., Дубровин Е.В., Яминский И.В., Родионова Н.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Искусственные вирусоподобные частицы, полученные *in vitro* из белка оболочки Х-вируса картофеля и чужеродных вирусных РНК // Acta naturae. 2011. Т. 3. № 3 (10). С. 42–48.
3. Petrova E., Nikitin N., Protopopova A., Arkhipenko M., Yaminskii I., Karpova O., Atabekov J. The role of the 5' cap structure in viral ribonucleoproteins assembly from Potato Virus X coat protein and RNAs // Biochimie. 2013. Vol. 95. N 12. P. 2415–2422.
4. Petrova E.K., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Protopopova A.D., Karpova O.V., Atabekov J.G. The 5'-proximal region of Potato virus X RNA involves the potential cap-dependent "conformational element" for encapsidation // Biochimie. 2015. Vol. 115. P. 116–119.
5. Hammond J., Reinsel M.D., Maroon-Lango C.J. Identification and full sequence of an isolate of Alternanthera mosaic potexvirus infecting *Phlox stolonifera* // Arch. Virol. 2006. Vol. 151. N 3. P. 477–493.
6. Mukhamedzhanova A.A., Karpova O.V., Rodionova N.P., Atabekov I.G. Nonspecific activation of translation of encapsidated potexviral RNA with involvement of potato virus X movement protein TGB1 // Dokl. Biochem. Biophys. 2009. Vol. 428. N 1. P. 239–241.

7. Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. Characterization of Alternanthera mosaic virus and its Coat Protein // Open Virol. J. 2011. Vol. 5. P. 136–140.

8. Kaftanova A.S., Kiselev N.A., Novikov V.K., Atabekov J.G. Structure of products of protein reassembly and reconstruction of potato virus X // Virology. 1975. Vol. 65. N 1. P. 283–287.

9. Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. The complete nucleotide sequence of Alternanthera mosaic virus infecting

Portulaca grandiflora represents a new strain distinct from phlox isolates // Virus Genes. 2011. Vol. 42. N 2. P. 268–271.

10. Geering A.D., Thomas J.E. Characterisation of a virus from Australia that is closely related to papaya mosaic potexvirus // Arch. Virol. 1999. Vol. 144. N 3. P. 577–592.

11. Sit T.L., Leclerc D., AbouHaidar M.G. The minimal 5' sequence for in vitro initiation of papaya mosaic potexvirus assembly // Virology. 1994. Vol. 199. N 1. P. 238–242.

Поступила в редакцию
27.07.15

STUDY OF POTEXVIRUS RIBONUCLEOPROTEINS' SIGNAL OF ASSEMBLY

E.K. Petrova*, E.A. Trifonova, N.A. Nikitin, O.A. Kondakova, J.G. Atabekov, O.V. Karpova

Department of Virology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

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

Formation of viral ribonucleoprotein particles during incubation of the *Alternanthera mosaic virus* 5'-end transcripts with Potato virus X (members of the *Potexvirus* genus) coat protein was studied. It was shown that the capping of *Alternanthera mosaic virus* transcripts affects the efficiency of their interaction with a coat protein. At the same time the removal of the cap structure from previously capped *Alternanthera mosaic virus* transcripts did not prevent viral ribonucleoproteins assembly. The removal of the first 100 nucleotides (the likely site for assembly initiation) had no effect on the formation of viral ribonucleoproteins. The additional evidences that the potexvirus ribonucleoproteins assembly does not depend on the RNA nucleotide sequence were obtained.

Keywords: plant viruses, *Alternanthera mosaic virus*, *Potato virus X*, viral ribonucleoprotein, virion assembly, cap structure.

Сведения об авторах:

Петрова Екатерина Кирилловна — канд. биол. наук, ст. преп. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: petrova@mail.bio.msu.ru

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

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

Кондакова Ольга Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-50-08; e-mail: olgakond@yandex.ru

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

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

БИОФИЗИКА

УДК 577.25

**LOV- И BLUF-ФЛАВОПРОТЕИНЫ: РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФОТОРЕЦЕПТОРЫ
МИКРООРГАНИЗМОВ И ФОТОСЕНСОРНЫЕ АКТИВАТОРЫ
В ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ****Г.Я. Фрайкин¹, М.Г. Страховская^{1,2,*}, Н.С. Беленикина¹, А.Б. Рубин¹**¹ *Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;**Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;*² *Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА;**Россия, 115682, г. Москва, Ореховый бульвар, д. 28*** e-mail: marstr@biophys.msu.ru*

В последние годы показано, что LOV (light, oxygen, voltage)- и BLUF (Blue Light sensing Using FAD)-фотосенсорные белки выполняют функции фоторецепторов светорегулируемых процессов не только у эукариот, но и у многих прокариот. У бактериальных фоторецепторов LOV- и BLUF-домены с присоединенными флавиновыми хромофорами часто связаны с разными ферментными и другими эффекторными доменами и составляют модульные системы, переключаемые светом. К настоящему времени достигнут прогресс в раскрытии механизмов фотоактивации таких систем. Они основаны на индуцированных фотореакциями хромофоров изменениях в фотосенсорных доменных структурах и последующей трансдукции сигнала к эффекторным доменам. Знание принципов трансдукции сигнала LOV- и BLUF-фотосенсорами имеет важное значение для создания на их основе фотоперключаемых ферментов и транскрипционных систем, применяемых в оптогенетике — новой и активно развивающейся области клеточной биологии и биотехнологии. Рассматриваются структурные аспекты передачи сигнала светоактивированными LOV- и BLUF-фоторецепторами и их регуляторные функции у бактерий, а также некоторые недавние достижения в использовании LOV-и BLUF-фотосенсоров в качестве активаторов в оптогенетических системах для регуляции клеточных процессов.

Ключевые слова: *LOV- и BLUF-фоторецепторы, трансдукция сигнала, бактерии, регуляция, оптогенетические системы, обзор.*

Фотобиорегуляторные процессы опосредуются специализированными фоторецепторами, которые воспринимают световые сигналы и трансформируют их в биохимические сигнальные каскады, вызывающие физиологические ответы. У растений, грибов и бактерий идентифицировано несколько типов регуляторных фоторецепторов, в том числе чувствительные к красному свету фитохромы, чувствительные к синему свету криптохромы, фототропины и другие белки, содержащие LOV- и BLUF-домены [1].

Фотосенсорные BLUF- и LOV-домены — это короткие (100–140 аминокислотных остатков — а.о.) α/β -модули, способные присоединять в качестве хромофоров флавины (ФАД или ФМН). LOV-доменные белки составляют обширную группу фоторецепторов, первоначально идентифицированные у фототропинов растений, а позднее — у грибов и многочисленных бактерий. Значительно менее распространенные BLUF-доменные белки найдены пока только у некоторых эвгленоидов и бактерий. BLUF-домены отличаются от LOV-доменов осо-

бенностями вторичной структуры и специфическим типом первичных фотопревращений их флавинового хромофора. В BLUF-доменах ФАД в фотовозбужденном состоянии инициирует сопряженный с протоном электронный транспорт между консервативным тирозиновым остатком и хромофором с последующей реорганизацией водородных связей вблизи него (рисунок). В LOV-доменах ФМН под действием синего света подвергается фотоциклу, включающему формирование тиолового аддукта между изоаллоксазиновым кольцом флавина и консервативным цистеиновым остатком белка. Возникающие в фотосенсорных доменах структурные изменения индуцируют модуляцию активности эффекторных доменов или взаимодействующих с фоторецепторами белков [1, 2].

В последнее время достигнут прогресс в понимании механизмов восприятия света и трансдукции сигнала BLUF- и LOV-фоторецепторами, у бактерий выявлены и изучены опосредуемые ими светозависимые регуляторные процессы. Также имеются достижения в разработке на основе LOV- и BLUF-

фотосенсоров оптогенетических систем для световой регуляции клеточных процессов и функций. На этих актуальных вопросах функционирования LOV- и BLUF-фоторецепторов сосредоточено внимание в настоящей обзорной статье.

Регуляторные функции BLUF- и LOV-фоторецепторов

BLUF-фотосенсорные белки. Многие бактериальные фоторецепторы этого класса состоят только из BLUF-домена с двумя С-концевыми α -спиралями; реже они содержат связанные с BLUF-доменом эффекторные домены (см. ниже), активность которых может регулироваться фотовозбужденным BLUF-доменом [3]. Короткие BLUF-фотосенсоры передают сигналы и опосредуют физиологические ответы за счет формирования комплексов с сигнальными белками, т.е. путем светозависимого белок-белкового взаимодействия [4].

Как отмечено выше, в BLUF-доменах фотоцикл ФАД включает сопряженный с протоном перенос

электрона от тирозинового остатка на фотовозбужденный флаavin с переходом его в нейтральный радикал. Это инициирует реориентацию водородных связей вблизи флавинового хромофора, вследствие чего образуется обратимый в темноте интермедиат (ФАД_{red}) со сдвинутым на 10–15 нм в красную область спектром поглощения. Водородная связь, ответственная за образование интермедиата, формируется консервативным глутаминовым остатком, который таутомеризуется при световом возбуждении BLUF-домена [5] (рисунок). Локальные изменения в ориентации водородных связей вызывают конформационные изменения в флавин-связывающем кармане, которые, распространяясь через $\beta 5$ -лист и С-концевые α -спирали BLUF-домена, оказывают модулирующее влияние на активность эффекторных доменов [6].

Согласно недавно полученным данным, фотовозбужденный BLUF-домен регулирует каталитическую активность ферментных эффекторных доменов, участвующих в синтезе и распаде вторич-

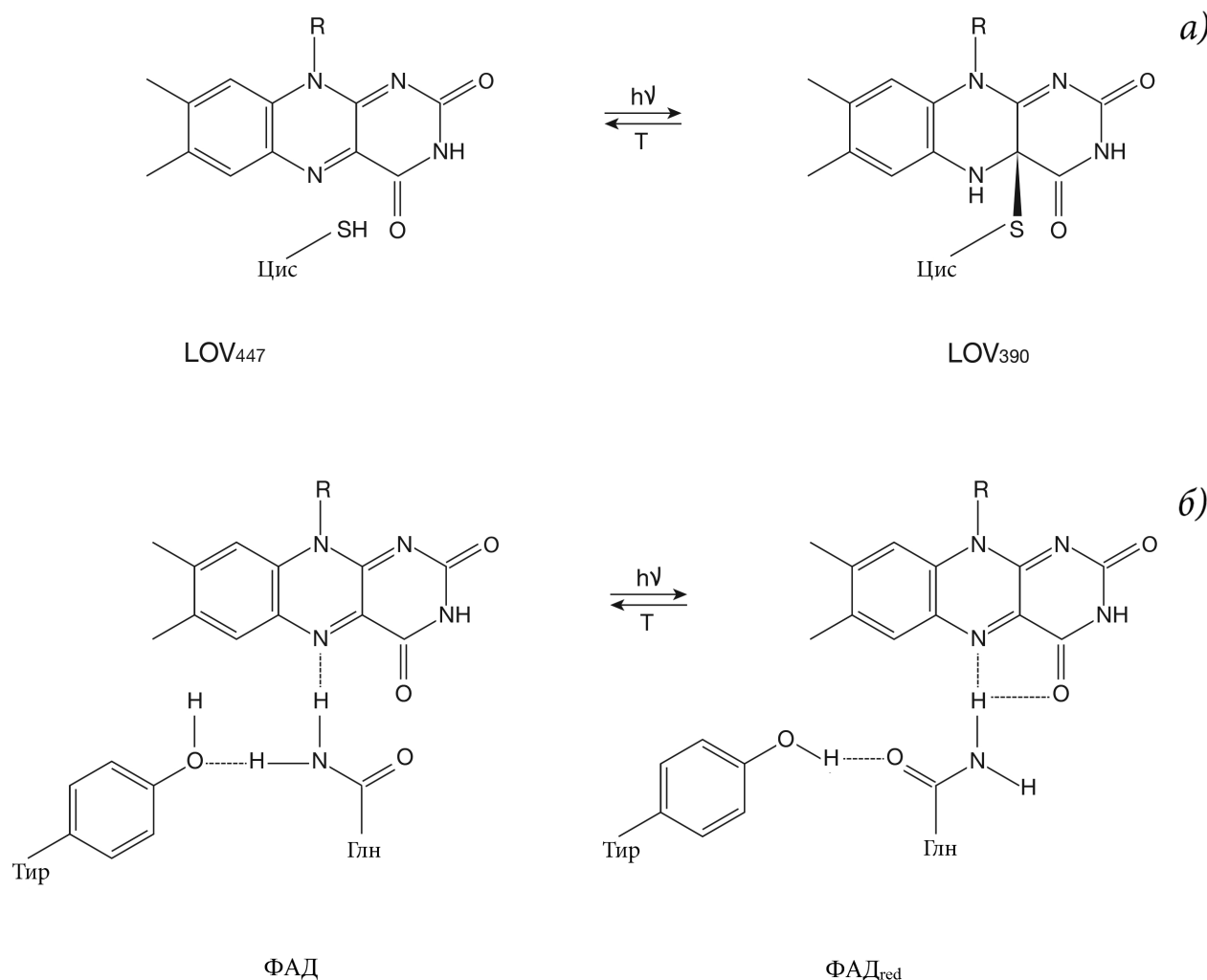


Рисунок. Индуцированное светом ($h\nu$) формирование в LOV-домене обратимого в темноте (T) ФМН-цистеинильного аддукта, выявляемого по сдвигу максимума поглощения от 447 нм (LOV_{447}) к 390 нм (LOV_{390}) (а); индуцированная светом ($h\nu$) реорганизация сети водородных связей между ФАД и тирозиновым/глутаминовым остатками вызывает образование в BLUF-домене обратимого в темноте (T) интермедиата ФАД_{red} (б)

ных мессенджеров. У фотосенсорного белка из бактерий *Klebsiella pneumoniae*, BlrP1 (blue-light regulated phosphodiesterase) (табл. 1), BLUF- домен модулирует ц-ди-ГМФ-фосфодиэстеразную активность ковалентно присоединенного к нему EAL-домена [7]. Кристаллографический анализ BlrP1 свидетельствует о димерном устройстве EAL-доменов с консервативным контактом, создаваемым составной спиралью, формируемой из коротких спиралей каждого протомера. Фотосенсорные BLUF-домены расположены близко к участку димеризации, и при поглощении света BLUF-доменом одной субъединицы антипараллельного гомодимера стимулируется фосфодиэстеразная активность EAL-домена другой субъединицы [7]. Регуляция активности EAL-домена BLUF-сенсором осуществляется посредством двусторонней аллостерической связи между фотоиндуцированными структурными изменениями и активным центром EAL [8]. Световые сигналы от обоих BLUF-доменов объединяются в консервативном участке димеризации EAL и передаются к активному центру ферментного домена, вызывая его активацию.

У выявленного у бактерий *Beggiatoa* sp. фотосенсорного белка, содержащего BLUF-домен, связанный с аденилилциклазой, bPAC (photoactivated adenylyl cyclase) [9] (или BlaC [10]), обнаружено фотоиндуцированное повышение активности этого фермента и уровня клеточного цАМФ (табл. 1). Представляют интерес данные о превращении BlaC в гуанилатциклазу путем сконструированной модели нуклеотидилциклазного домена, в котором заменено несколько а.о. Тройной мутант, BlgC, обладает фотоактивированной гуанилатциклазой *in vitro*. Синий свет вызывает у мутанта *Escherichia coli*, экспрессирующего BlaC, значительное повышение уровня цГМФ [10].

В последнее время появились сведения о фотобиологических функциях BLUF-фоторецепторов, которые контролируют такие биологические ответы, как фототаксис (Pix D у *Synechocystis* sp.), формирование биопленок (YcgF у *E. coli*, PapB у *Rhodospseudomonas palustris*), вирулентность (BlsA у *Acinetobacter baumannii*) и синтез компонентов аппарата фотосинтеза (AppA у *R. sphaeroides*) [6]. Действие отмеченных фоторецепторов основано на светозависимых белок-белковых взаимодействиях. В недавних исследованиях получена новая информация о молекулярных деталях этих светорегулируемых процессов.

Участвующий в контроле фототаксиса у *Synechocystis* sp. короткий BLUF-фотосенсор PixD (табл. 1) взаимодействует в темноте с регуляторным белком PixE, который индуцирует формирование олигомерного комплекса, состоящего из 10 субъединиц PixD и 5 субъединиц PixE [11]. При световом возбуждении PixD происходят конформационные изменения, сопровождаемые распадом комплекса на димеры PixD и мономеры PixE [4]. Предполагается, что именно этот фотоиндуциро-

ванный процесс запускает сигнальный каскад, контролирующий фототаксис бактерий [11].

У другого короткого BLUF-белка — PapB из *R. palustris*, фотобиологическая функция связана с отрицательной регуляцией формирования биопленки. В основе фототаксиса лежит взаимодействие PapB с ц-ди-ГМФ-специфичной фосфодиэстеразой PapA, активность которой повышается при световом возбуждении фотосенсора. PapB, в отличие от рассмотренного выше PixD, образующего комплекс с белком PixE только в темноте [11], взаимодействует с PapA и на свету. Это свидетельствует о различиях в механизмах взаимодействия двух фотосенсоров с соответствующими белками в сигнальных каскадах, контролирующих разные фотобиологические процессы — фототаксис или формирование биопленки [6, 12].

BLUF-белок *E. coli* YcgF (табл. 1) содержит EAL-домен, однако, в отличие от сходного с ним по доменной организации фоторецептора BlrP1 (см. выше), YcgF не связывается с ц-ди-ГМФ и его EAL-домен не обладает фотоиндуцированной фосфодиэстеразной активностью. Установлено, что YcgF функционирует как антагонист транскрипционного регулятора YcgE [13]. Действие YcgE в качестве репрессора осуществляется путем его связывания с промоторами в опероне, кодирующем белки, которые могут активировать вещества матрикса биопленки. Фотовозбужденный YcgF временно формирует гомодимеры, вызывая диссоциацию комплекса YcgE — YcgF и высвобождая репрессор из оперона. Это указывает на фотосенсорную функцию YcgF при модуляции формирования биопленки клетками *E. coli* [13].

Результаты этого исследования показывают, что у BLUF-белка с вырожденным EAL-доменом синий свет может активировать биологическую функцию, отличную от ферментативной, за счет светозависимого белок-белкового взаимодействия.

Фоторецептор бактерий *R. sphaeroides* AppA (табл. 1) — свето- и редокс-регулятор экспрессии фотосинтетических генов, состоит из BLUF-домена и редокс-сенсорного домена SCHIC (Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin) [6]. Свет и кислород воспринимаются посредством AppA — PpsR-регуляторной системы, где PpsR — репрессор фотосинтетических генов, содержащий (НТН)-мотив (helix — turn — helix — motif) для связывания с ДНК, а AppA — антирепрессор, способный через SCHIC-домен образовывать нековалентный AppA — PpsR₂-комплекс.

В недавней работе на основе анализа кристаллических структур обоих белков и их комплекса показано, что световая активация AppA изменяет эффекторную область PpsR внутри комплекса. Кроме того, продемонстрировано формирование светочувствительного тройного комплекса AppA — PpsR — DNA, через который может передаваться сигнал посредством аллостерических структурных изменений. Согласно предложенному механизму,

фотомодифицированный комплекс AppA — PpsR₂ взаимодействует с сайтами связывания PpsR на ДНК, предотвращая формирование PpsR–DNA-репрессорного комплекса, что приводит к активации экспрессии фотосинтетических генов [14].

LOV-фотосенсорные белки. Фотосенсорная функция LOV-домена была впервые выявлена при идентификации фототропина, содержащего два ФМН-связывающих LOV-домена, из которых основным в регуляции активности фоторецептора является LOV2, соединенный Jα-спиралью с эффекторным серин-треонин-киназным доменом. Фотоцикл ФМН с максимумом поглощения при 447 нм (LOV₄₄₇) включает обратимое в темноте образование ФМН-цистеинильного аддукта (LOV₃₉₀) (рисунок). Эта форма является сигнальным состоянием фоторецептора, которое связано с индуцированной формированием аддукта деструктуризацией Jα-спирали и последующим повышением киназной активности [1, 2].

Важно отметить, что аналогичный принцип световой активации LOV-белков (за исключением некоторых деталей структурных механизмов трансдукции сигнала) сохранен среди отдаленных филогенетических групп организмов, включая грибы и бактерии [1, 2, 15, 16]. Все LOV-фоторецепторы грибов и бактерий содержат один LOV-домен, причем у многих прокариот он тесно связан с различными эффекторными доменами, образуя модульные системы, активность которых может регулироваться светом.

У грибов базовыми представителями LOV-фоторецепторной системы являются два ФАД-содержащих LOV-доменных белка: WC-1 (White Collar) и VVD, опосредующие световую регуляцию запуска и фазы циркадного ритма у *Neurospora crassa* [17]. Фотосенсорный белок WC-1 представляет собой транскрипционный фактор, формирующий с другим транскрипционным фактором WC-2 гетеродимерный комплекс WCC. Фотоактивация WC-1 в этом комплексе вызывает гомодимеризацию WCC [18]. Активированный светом WC-комплекс индуцирует транскрипцию многих светоиндуцибельных генов, включая ген, кодирующий фотосенсор VVD, необходимый для правильной регуляции циркадных ритмов [17, 19]. Индуцированные формированием фотоаддукта конформационные изменения в LOV/ VVD сопровождаются гомодимеризацией VVD и его взаимодействием с WCC [20], что определяет образование отрицательной обратной связи с WCC при контроле суточной экспрессии генов.

Современная модель антагонистического действия VVD по отношению к WC-комплексу основана на прямом взаимодействии и конкурентной гетеродимеризации между VVD — VVD/LOV и WC-1/LOV [18, 19]. Образование гетеродимера VVD:WC-1 обеспечивает адаптацию организма к свету, поскольку блокирует первоначально ини-

цированную волну генной экспрессии в условиях продолжающегося освещения, препятствуя тем самым сверхэкспрессии WCC-транскрибируемых генов [18, 19, 21].

У бактериальных LOV-фоторецепторов, содержащих связанные с фотосенсорным доменом различные эффекторные домены, в последние годы выявлена регулируемая светом активность, а для некоторых из них обнаружены фотобиологические функции [2, 15]. LOV-гистидин (H)-киназы, содержащиеся у бактерий *Caulobacter crescentus* (LovK), *Brucella abortus* (LOV-HK) (табл. 2) и *Pseudomonas syringae*, проявляют типичные для LOV-доменов фотоциклы флавинового хромофора, которые сопровождаются изменением третичной структуры и аутофосфорилированием киназ *in vitro*, а также переносом фосфатной группы на соответствующие белки — регуляторы ответов (RRs) (табл. 2). Таким образом, у LOV-киназ RRs составляют двухкомпонентную систему трансдукции светового сигнала [3]. Фотоактивация LovK и LOV-HK вызывает физиологические ответы у бактерий: у *B. abortus* наблюдается 10-кратное повышение уровня пролиферации клеток в макрофагах, а у *C. crescentus* — резкое увеличение адгезии клеток [15].

У цианобактерий *Synechococcus elongatus* LOV-домен, связанный с GGDEF-EAL-доменами, опосредует фотоиндуцированную регуляцию фосфоэстеразной активности EAL *in vitro* [22] (табл. 2). На основании этого факта предполагается, что активированный синим светом LOV-домен может контролировать уровень клеточного ц-ди-ГМФ, который участвует как вторичный мессенджер в регуляции ряда физиологических функций (подвижность, вирулентность и др.).

У бактерий *Bacillus subtilis* LOV-STAS (Sulfate transporter/antisigma-factor antagonist)-белок YtvA (табл. 2) функционирует как фоторецептор *in vitro* и *in vivo*. STAS-домен определяет модулируемое синим светом свойство YtvA связывать *in vitro* ГТФ, который является вторичным мессенджером в ответах на стресс *B. subtilis*. Кроме того, фотоактивированный YtvA *in vivo* действует как положительный регулятор транскрипционного фактора общего стресса σB [23]. Поскольку мутации, нарушающие связывание ГТФ в STAS-домене или междоменное распространение светоиндуцированного сигнала в фоторецепторе, подавляют активированную синим светом σB-зависимую транскрипцию *in vivo*, считается, что связывание ГТФ необходимо для проявления функциональной активности YtvA [23–25].

Исследования структурных изменений, происходящих в LOV-домене YtvA, который соединен с эффекторным STAS-доменом Jα-спиралью, показали, что, в отличие от таковых у фототропинов, они не затрагивают деструктуризацию Jα-спирали [24, 26]. Это связано с различиями в четвертичной структуре и ориентации Jα, которая у YtvA-LOV-домена образует “coiled-coil”-конфигурацию [23]. Изолированные YtvA-LOV-домены представляют

Таблица 1

Первичные фотониндуцированные процессы и регуляторные функции у отдельных BLUF-фоторецепторов бактерий

Тип фоторецептора	Первичные фотониндуцированные процессы в BLUF-фотосенсорах	Структурные основы трансдукции сигнала	Регуляция клеточных процессов и функций
PixD (BLUF)	Сопряжённый с протоном перенос электрона от Тир-остатка на фотовозбуждённый флавин с переходом его в нейтральный радикал; реориентация водородных связей вблизи хромофора и образование интермедиата ФАДгед; конформационные изменения в С-концевых α-спиралях BLUF-домена [1, 2, 6]	Изменение конформации PixD и распад олигомерного комплекса PixD с регуляторным белком PixE [11]	Контроль фототаксиса <i>Synechocystis</i> sp. [11]
BlgP1 (BLUF — EAL)		Аллостерическая двусторонняя связь между изменениями структуры BLUF-домена и активным центром EAL в димерном BlgP1 [8]	Стимуляция фосфодiestеразной активности EAL-домена у <i>K. pneumoniae</i> [7]
YcgF (BLUF — EAL)		Диссоциация комплекса димера YcgF с транскрипционным репрессором YcgE, сопровождаемая его высвобождением из оперона [13]	Формирование биоплёнки клетками <i>E. coli</i> [13]
AppA (BLUF — SCHIC)		Аллостерические структурные изменения в комплексе AppA — PpsR — ДНК. Взаимодействие комплекса AppA — PpsR с сайтами связывания репрессора PpsR на ДНК предотвращает формирование PpsR — ДНК-репрессорного комплекса [14]	Активация экспрессии фотосинтетических генов. Синтез компонентов аппарата фотосинтеза у <i>R. sphaeroides</i> [6, 14]
bPAC (BLUF — AC)		Не исследованы	Повышение активности аденилилизклазы (AC) и уровня cAMP у <i>Beggiatoa</i> sp. [9]

Таблица 2

Первичные фотониндуцированные процессы и регуляторные функции у некоторых выбранных LOV-фоторецепторов бактерий

Тип фоторецептора	Первичные фотониндуцированные процессы в LOV-доменах	Структурные основы трансдукции сигнала	Регуляция клеточных процессов и функций
LovK (LOV — Н-киназа)	Фотовозбуждённый ФМН подвергается фотоциклу, который включает образование тиолового аддукта между изоаллоксазинным кольцом хромофора и Цис-остатком белка; конформационные изменения в LOV-домене, инициируемые реориентацией глутаминового остатка и изменением водородных связей с участием периферических а.о. — специфических трансмиттеров сигнала [1, 2, 15]	Изменения третичной структуры Н-киназного домена [2, 15]	Фосфорилирование Н-киназы и трансфосфорилирование белка — регулятора ответа (RR). Увеличение степени адгезии клеток <i>C. crescentus</i> [3, 15]
LOV — НК (LOV — Н-киназа)		Изменения третичной структуры Н-киназного домена [2, 15]	Фосфорилирование Н-киназы и трансфосфорилирование белка — регулятора ответа (RR). Повышение уровня пролиферации клеток <i>B. abortus</i> [3, 15]
YtrA (LOV — STAS)		Конформационные изменения в LOV-димере вызывают поворот двух мономеров на 4–5° относительно друг друга [26]. Влияние этих структурных изменений на конформацию STAS-домена не исследовано	Связывание ГТФ STAS-доменом. Положительная регуляция транскрипционного фактора общего стресса σB у <i>B. subtilis</i> [23]
LOV — GGDEF-EAL		Не исследованы	Регуляция фосфодiestеразной активности EAL у LOV-фоторецептора из <i>S. elongates in vitro</i> [22]

собой конститутивные димеры, мономеры которых при фотоактивации поворачиваются относительно друг друга на 4–5° [26]. В распространении светоиндуцированных структурных перестроек в YtvA-LOV, как и в LOV-доменах фототропина и VVD, первостепенную роль играет глутаминовый остаток, подвергающийся реориентации в своей боковой цепи.

Анализ данных, полученных при изучении структурных аспектов передачи сигнала в LOV-фоторецепторах, показывает, что у бактериальных, как и эукариотных, LOV-белков трансдукция светового сигнала на начальных стадиях происходит по общему механизму. В его основе лежат вызываемые формированием фотоаддукта конформационные изменения β -листа LOV-ядра. В их инициации важное значение имеет консервативный остаток глутамин, непосредственно взаимодействующий с фотоактивированным флавиновым хромофором. Перестройка глутамин индуцирует изменение водородных связей с участием нескольких периферических а.о., которые отличаются у разных LOV-белков и действуют как специфические транзмиттеры сигнала (табл. 2). Также различаются структурные механизмы последующих этапов передачи сигнала, обеспечивающие способность LOV-доменов регулировать активность эффекторных доменов [15].

Применение LOV- и BLUF-фотосенсоров в оптогенетических системах

Оптогенетика — новая область биологии клетки, объединяющая оптические и генетические подходы для регуляции клеточных процессов светом с использованием фотосенсорных белков. В последние годы оптогенетика становится одной из ключевых биотехнологий, поскольку генетически закодированные фотосенсорные активаторы могут быть функционально введены в клетки любого типа, где после световой активации, происходящей с высокой пространственно-временной точностью, они способны индуцировать регуляцию экспрессии генов, ферментативной активности и других биологических функций [27].

LOV- и BLUF-фотосенсоры обладают ключевыми свойствами, идеально подходящими для применения в оптогенетике. Они имеют малый размер и используют в качестве хромофоров фотохимически активные флавиновые кофакторы, присутствующие во всех типах клеток. Кроме того, способность LOV-и BLUF-фотосенсоров образовывать функциональные модульные структуры с эффекторными доменами служит основой для конструирования их комбинаций с другими белками/ферментами, активность которых подлежит светоиндуцированному аллостерическому контролю [28 — 31].

В ряде исследований для аллостерического контроля функций белков использован LOV2-домен растительного фототропина, который подвер-

гается большим структурным изменениям при фотовозбуждении. LOV2- Ja присоединяется к белку — мишени таким образом, что конформационные изменения в LOV2 индуцируют конформационные изменения в белке. По такому механизму LOV2- Ja вызывает светозависимую регуляцию активности ряда ферментов, в том числе при экспрессии в животные клетки [32 — 34].

Особый интерес представляют данные о регуляции светом ГТФазы Rac1 в фибробластах, экспрессирующих гибридный LOV2- Ja – Rac1-белок [33]. Показано, что в темноте LOV2 стерически ингибирует активность Rac1, блокируя его связывание с эффекторными белками. Действие сфокусированного лазерного света вызывает деструктуризацию Ja -спирали, снимая стерическое ингибирование и обеспечивая тем самым взаимодействие Rac1 с эффекторными молекулами. Поскольку Rac1 является ключевым белком, регулирующим динамику цитоскелета, полученные результаты демонстрируют, что световое воздействие может быть использовано для дистанционного контроля подвижности клеток, экспрессирующих фотоактивируемый Rac1 [33].

Фоторегуляторное действие LOV2- Ja показано также в отношении ДНК-связывающей активности гибридного белка, включающего бактериальный репрессор триптофана TrpR [35]. В основе светоиндуцированного связывания лежит отсоединение Ja -спирали от LOV-ядра, сопровождаемое конформационным изменением и активацией эффекторного домена (TrpR).

Отметим, что помимо использования фототропинового LOV2 в качестве светозависимого регулятора биологических процессов, на основе этого домена созданы флуоресцентные репортерные молекулы [2, 27, 30]. Они успешно применяются для контроля популяций бактерий в анаэробных условиях либо вирусных инфекций растений. В этих случаях LOV-доменный репортер с достаточно интенсивной зелёной флуоресценцией флавинового хромофора превосходит GFP (green fluorescent protein), у которого для образования флуоресцирующего хромофора требуется присутствие кислорода. Хотя флуоресценция флавинового хромофора исчезает при фотохимическом образовании цистеинильного аддукта, этот процесс может быть предотвращен путём замены цистеинового остатка на аланин или серин, что обеспечивает постоянно флуоресцирующую молекулу.

Наряду с LOV2- Ja для оптогенетических применений исследуются также бактериальные LOV-фотосенсоры. На основе свойства бактериальных LOV-доменных фоторецепторов включать в состав в качестве эффекторного домена Н-киназу сконструирована синтетическая регулируемая светом Н-киназа, у которой нефоточувствительный PAS-домен от сенсора кислорода FixL из бактерий *Bradyrhizobium japonicum* заменен на LOV-домен фоторецептора YtvA из *B. subtilis* [36]. Дальнейшее применение этого гибридного белка связано с ин-

женерией плазмид для светорегулируемой индукции (pDawn) или репрессии (pDusk) бактериальных генов [37].

Недавно с помощью генной инженерии созданы и другие контролируемые светом транскрипционные системы. Весьма перспективной представляется конструкция, состоящая из LOV-фотосенсорного белка VVD из *N. crassa*, ДНК-связывающего и активационного доменов, которая используется для контроля экспрессии генов в животных клетках [38]. Также значительный интерес вызывает изучение LOV-доменов, идентифицированных недавно в геномах бактерий, выделенных из разных мест обитания, в том числе экстремальных [39]. Соединение этих фотосенсорных модулей с различными эффекторными доменами может предоставить обширный выбор конструкций для оптогенетических систем.

Исследование BLUF-фотосенсоров для применения в оптогенетике инициировали работы с использованием РАС из *Euglena gracilis* — фоторецептора, содержащего цАМФ-циклазу. Экспрессированный в нейроны животных, BLUF-фоторецептор вызывает светозависимую активацию циклазы,

сопровождаемую быстрым повышением уровня цАМФ, который посредством каскада фосфорилирования регулирует генную экспрессию и ряд биологических процессов [40].

Рассмотренная выше BLUF-аденилициклаза (bPAC/BlaC) бактерий *Beggiatoa* sp. перспективна для последующего применения в оптогенетике. Действительно, светоактивированная bPAC проявляет высокую эффективность в цАМФ-регулируемых процессах, включая поведенческие реакции, при интеграции с нейронами некоторых животных [9]. Кроме того, BlaC посредством мутации может быть конвертирована в фотоактивируемую цГМФ-циклазу (BlgC), расширяя область ее применения [10]. Как известно, продукты аденилил- и гуанилилциклаз, цАМФ и цГМФ, являются универсальными вторичными мессенджерами, которые регулируют многие процессы у организмов. Поэтому свойство бактериальных РАС контролировать под действием света синтез цАМФ/цГТФ в сочетании с их малым размером и высокой степенью световой активации открывает перспективы для применения этих BLUF-циклазных фоторецепторов в оптогенетике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fraikin G.Ya., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. Biological photoreceptors of light-dependent regulatory processes // Biochemistry (Mosc.). 2013. Vol. 78. N 11. P. 1238–1253.
2. Losi A., Gartner W. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors // Photochem. Photobiol. 2011. Vol. 87. N 3. P. 491–510.
3. Losi A., Gartner W. Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. Vol. 7. N 10. P. 1168–1178.
4. Yuan H., Dragnea V., Wu Q., Gardner K.H., Bauer C.E. Mutational and structure studies of the PixD BLUF output signal that affects light-regulated interaction with PixE // Biochemistry. 2011. Vol. 50. N 29. P. 6365–6375.
5. Khrenova M.G., Nemukhin A.V., Domratheva T. Photoinduced electron transfer facilitates tautomerization of the conserved signaling glutamine side chain in BLUF protein light sensors // J. Phys. Chem. B. 2013. Vol. 117. N 8. P. 2369–2377.
6. Masuda S. Light detection and signal transduction in the BLUF photoreceptors // Plant Cell Physiol. 2013. Vol. 54. N 2. P. 171–179.
7. Barends T.R.M., Hartmann E., Griesse J.J., Beitlich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase // Nature. 2009. Vol. 459. N 7249. P. 1015–1018.
8. Winkler A., Udvardhelyi A., Hartmann E., Reinstein J., Menzel A., Shoeman R.L., Schlichting I. Characterization of elements involved in allosteric light regulation of phosphodiesterase activity by comparison of different functional BlrP1 states // J. Mol. Biol. 2014. Vol. 426. N 4. P. 853–868.
9. Stierl M., Stumpf P., Udvari D., Gueta R., Hagedorn R., Losi A., Gartner W., Peterleit L., Efetova M., Schwarzel M., Oertner T.G., Nagel G., Hegemann P. Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa* // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. N 2. P. 1181–1188.
10. Ryu M.-H., Moskvina O.V., Siltberg-Liberles J., Gomelsky M. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. N 53. P. 41501–41508.
11. Tanaka K., Nakasone Y., Okajima K., Ikeuchi M., Tokutomi S., Terazima M. Time-resolved tracking of inter-protein signal transduction: *Synechocystis* PixD — PixE complex as a sensor of light intensity // J. Amer. Chem. Soc. 2012. Vol. 134. N 20. P. 8336–8339.
12. Ren S., Sawada M., Hasegawa K., Hayakawa Y., Ohta H., Masuda S.A. PixD — PapB chimeric protein reveals the function of the BLUF domain C-terminal α -helices for light-signal transduction // Plant Cell Physiol. 2012. Vol. 53. N 9. P. 1638–1647.
13. Tschowri N., Linderberg S., Hengge R. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signaling pathway of *Escherichia coli* // Mol. Microbiol. 2012. Vol. 85. N 5. P. 893–906.
14. Winkler A., Heintz U., Lindner R., Reinstein J., Shoeman R.L., Schlichting I. A ternary AppA — PpsR — DNA complex mediates light-regulation of photosynthesis-related gene expression // Nat. Struct. Mol. Biol. 2013. Vol. 20. N 7. P. 859–867.
15. Herrou J., Crosson S. Function, structure, and mechanism in bacterial photosensory LOV proteins // Nat. Rev. Microbiol. 2011. Vol. 9. N 10. P. 713–723.
16. Losi A., Gartner W. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors // Ann. Rev. Plant Biol. 2012. Vol. 63. P. 49–72.
17. Chen C.-H., Loros J.J. *Neurospora* sees the light // Commun. Integrat. Biol. 2009. Vol. 2. N 5. P. 448–451.
18. Malzahn E., Ciprianidis S., Kaldi K., Schafmeier T., Brunner M. Photoadaptation in *Neurospora* by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains // Cell. 2010. Vol. 142. N 5. P. 762–772.
19. Chen C.H., DeMay B.S., Gladfelter A.S., Dunlap J.C., Loros J.J. Physical interaction between VIVID and white

- collar complex regulates photoadaptation in *Neurospora* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. N 38. P. 16715–1672.
20. Zoltowski B.D., Crane B.R. Light activation of the LOV protein VIVID generates a rapidly exchanging dimer // Biochemistry. 2008. Vol. 47. N 27. P. 7012–7019.
21. Hunt S., Thompson S., Elvin M., Heintzen C. VIVID interacts with the WHITE COLLAR complex and FREQUENCY-interacting RNA helicase to alter light and clock responses in *Neurospora* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. N 38. P. 16709–16714.
22. Cao Z., Livoti E., Losi A., Gartner W. A blue light-inducible phosphodiesterase activity in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* // Photochem. Photobiol. 2010. Vol. 86. N 5. P. 606–611.
23. Avila-Perez M., Vreede J., Tang Y., Bende O., Losi A., Gartner W., Hellingwerf K. In vivo mutational analysis of YtvA from *Bacillus subtilis*: mechanism of light activation of the general stress response // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. N 37. P. 24958–24964.
24. Tang Y., Cao Z., Livoti E., Krauss U., Jaeger K.-E., Gartner W., Losi A. Interdomain signaling in the blue-light sensing and GTP-binding protein YtvA: a mutagenesis study uncovering the importance of specific protein sites // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. N 1. P. 47–56.
25. Nakasone Y., Hellingwerf K.J. On the binding of BODIPY — GTP by the photosensory protein YtvA from the common soil bacterium *Bacillus subtilis* // Photochem. Photobiol. 2011. Vol. 87. N 3. P. 542–547.
26. Jurk M., Dorn M., Kekhney A., Svergun D., Gartner W., Schmieder P. The switch that does not flip: the blue-light receptor YtvA from *Bacillus subtilis* adopts an elongated dimer conformation independent of the activation state as revealed by combined AUC and SAXS study // J. Mol. Biol. 2010. Vol. 403. N 1. P. 78–87.
27. Pathak G.P., Vrana J.D., Tucker C.L. Optogenetic control of cell function using engineered photoreceptors // Biol. Cell. 2013. Vol. 105. N 2. P. 59–72.
28. Moglich A., Moffat K. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. N 10. P. 1286–1300.
29. Zoltowski B.D., Gardner K.H. Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein — protein interactions // Biochemistry. 2011. Vol. 50. N 1. P. 4–16.
30. Christie J.M., Gawthorne J., Young G., Fraser N.J., Roe A.J. LOV to BLUF: flavoproteins contributions to the optogenetic toolkit // Mol. Plant. 2012. Vol. 5. N 3. P. 533–544.
31. Krauss U., Drepper T., Jaeger K.E. Enlightened enzymes: strategies to create novel photoresponsive proteins // Chem. Eur. J. 2011. Vol. 17. N 9. P. 2552–2560.
32. Krauss U., Lee J., Benkovic S.J., Jaeger K.E. LOVely enzymes — towards engineering light-controllable biocatalysts // Microb. Biotech. 2010. Vol. 3. N 1. P. 15–23.
33. Wu Y.I., Frey D., Lungu O.I., Jaehrig A., Schlichting I., Kuhlman B., Hahn K.M. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells // Nature. 2009. Vol. 461. N 7260. P. 104–108.
34. Wang X., He L., Wu Y.I., Hahn K.M., Montell D.J. Light-mediated activation reveals a key role for Rac in collective guidance of cell movement *in vivo* // Nat. Cell Biol. 2010. Vol. 12. N 6. P. 591–597.
35. Strickland D., Yao X., Gawlak G., Rosen M.K., Gardner K.H., Sosnick T.R. Rationally improving LOV domain-based photoswitches // Nat. Methods. 2010. Vol. 7. N 8. P. 623–626.
36. Moglich A., Ayers R.A., Moffat K. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 385. N 7. P. 1433–1444.
37. Ohlendorf R., Vidavski R.R., Eldar A., Moffat K., Moglich A. From Dusk till Dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression // J. Mol. Biol. 2012. Vol. 416. N 3. P. 534–542.
38. Wang X., Chen X., Yang Y. Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system // Nat. Methods. 2012. Vol. 9. N 3. P. 266–269.
39. Pathak G.P., Losi A., Gartner W. Metagenome-based screening reveals worldwide distribution of LOV-domain proteins // Photochem. Photobiol. 2012. Vol. 88. N 1. P. 107–118.
40. Weissenberger S., Schultheis C., Liewald J.F., Erbguth K., Nagal G., Gottschalk A. PACa — an optogenetic tool for *in vivo* manipulation of cellular cAMP levels, neurotransmitter release, and behavior in *Caenorhabditis elegans* // J. Neurochem. 2011. Vol. 116. N 6. P. 616–625.

Поступила в редакцию
06.07.2015 г.

LOV AND BLUF FLAVOPROTEINS: REGULATORY PHOTORECEPTORS OF MICROORGANISMS AND PHOTSENSORY ACTUATORS IN OPTOGENETIC SYSTEMS

G.Ya. Fraikin¹, M.G. Strakhovskaya^{1,2,*}, N.S. Belenikina¹, A.B. Rubin¹

¹ Department of Biophysics, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² Federal Scientific and Clinical Center for Specialized Medical Service and Medical Technologies FMBA, Orekhovii bulvar 28, Moscow, 115682, Russia;

*e-mail: marstr@biophys.msu.ru

In recent years, it has been shown that LOV (light, oxygen, voltage) and BLUF (Blue Light sensing Using FAD) photosensory proteins are functioning as photoreceptors of light-regulated processes not only in eukaryotes but also in numerous prokaryotes. In bacterial photoreceptors, LOV and BLUF domains with attached flavin chromophores are often associated with different effector domains, which possess enzymatic and other functions, constituting modular light-switchable systems. Nowadays, progress has been achieved in uncovering the photoactivation mechanisms of such systems, which based on the chromophore photoreaction-induced changes

in the photosensory domain structures and subsequent signal transduction to the effector domains. Knowledge of signal transduction principles in LOV and BLUF photosensors is important for designing on their basis photo-switchable enzymes and transcriptional systems, which have been applied in optogenetics — a new field in cell biology and biotechnology. The structural aspects of signal transduction by light-activated LOV and BLUF photoreceptors and their regulatory functions in bacteria as well as on some recent advances in using LOV and BLUF photosensors as actuators in optogenetic systems for regulation of cellular processes are discussed.

Key words: *LOV and BLUF photoreceptors, signal transduction, bacteria, regulation, optogenetic systems, review.*

Сведения об авторах:

Фрайкин Григорий Яковлевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: gfraikin@yandex.ru

Страховская Марина Глебовна — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: marstr@biophys.msu.ru

Беленикина Наталья Серафимовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: nata.belenikina@ya.ru

Рубин Андрей Борисович — докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, проф., зав. кафедрой биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-16; e-mail: rubin@biophys.msu.ru

БИОФИЗИКА

УДК 57.047

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФЦИНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ pH ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ МЫШЕЙ

С.К. Пирутин^{1,3,*}, В.Б. Туровецкий¹, Н.Ю. Сарычева², А.Б. Дружко³,
В.Н. Калихевич⁴, А.А. Каменский²¹ Кафедра биофизики и ² кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики, РАН;
Россия, 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, д. 3;⁴ кафедра химии природных соединений, Институт химии,
Санкт-Петербургский государственный университет;
Россия, 198504, г. Санкт-Петербург, Петродворец, Университетский пр., д. 26
* e-mail: pirutin@yandex.ru

С использованием зондовой микрофлуориметрии одиночных клеток показано, что при действии на мышинные перитонеальные макрофаги тафцина в концентрациях, вызывающих увеличение их фагоцитарной активности (0,1 и 1,0 мкг/мл), наблюдается двухфазное изменение внутриклеточного pH (pH_i) во времени. В начальный период происходит снижение pH_i , достигающее предельной выраженности через 5 мин инкубации. Затем величина pH_i растет, достигая максимального значения через 30 мин взаимодействия клеток с агентом, после чего изменения наблюдаемого параметра не происходит вплоть до 55-й мин. Обнаружено, что при введении в среду инкубации клеток блокатора системы Na^+/H^+ -обмена этилизпропиламилорида на фоне действия тафцина повышение внутриклеточного pH не происходит. Это позволяет предположить, что наблюдаемое повышение pH_i при действии тафцина на второй фазе клеточного ответа связано с работой системы Na^+/H^+ -обмена.

Ключевые слова: тафцин, макрофаги, внутриклеточный pH, Na^+/H^+ -обменник.

В связи с активным применением в медицине биологически активных эндогенных пептидов и их синтетических аналогов в последние годы значительное внимание уделяется исследованиям механизмов их действия [1–3]. Одним из таких пептидов является регуляторный нейротропный тетрапептид — тафцин, проявляющий свойства иммуномодулятора и стимулятора пиноцитоза и фагоцитоза [4, 5]. Важное место при анализе механизма действия биологически активных пептидов занимает изучение их влияния на отдельные системы клеточной регуляции, к числу которых относится и система внутриклеточной pH-регуляции [6–8]. Как было показано ранее [9], действие регуляторного тетрапептида тафцина на перитонеальные макрофаги мышей приводит к сходным по характеру дозозависимому возрастанию их фагоцитарной активности и внутриклеточного pH с максимумом в области концентраций пептида, близких по значению к его физиологическому уровню в крови здоровых людей (0,26 мкг/мл) [10].

Цель настоящей работы — изучение временной зависимости влияния тафцина на внутриклеточный pH изолированных перитонеальных макрофагов и участия Na^+/H^+ -обменника в подщелачивании внутриклеточного содержимого при действии пептида.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на перитонеальных макрофагах беспородных белых мышей. Выделение клеток и посадку их на стекла осуществляли, как описано ранее [11]. Клетки инкубировали в растворе Хенкса с добавлением 10 ммоль/л HEPES (pH 7,2; “Serva”, Германия).

В работе использовали тетрапептид тафцин в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл, в которых, как ранее было показано [9], он вызывает увеличение фагоцитарной активности макрофагов и их внутриклеточного pH.

Определение величины внутриклеточного pH осуществляли при помощи микрофлуориметрического метода анализа одиночных клеток с использованием флуоресцентного зонда флуоресцеиндиацетата (5 мкг/мл, “Serva”, Германия) [9, 12]. Регистрацию интенсивности флуоресценции отдельных клеток проводили на фотометрирующем люминесцентном микроскопе “ЛЮАМ ИЗ” (“ЛОМО”, Россия) в узких полосах спектра излучения двух форм флуоресцеина при $\lambda_1=520$ нм и $\lambda_2=570$ нм. Более подробно методика определения внутриклеточного pH описана ранее [13].

После определения pH_i нативных клеток к ним добавляли тафцин в указанных выше концентрациях

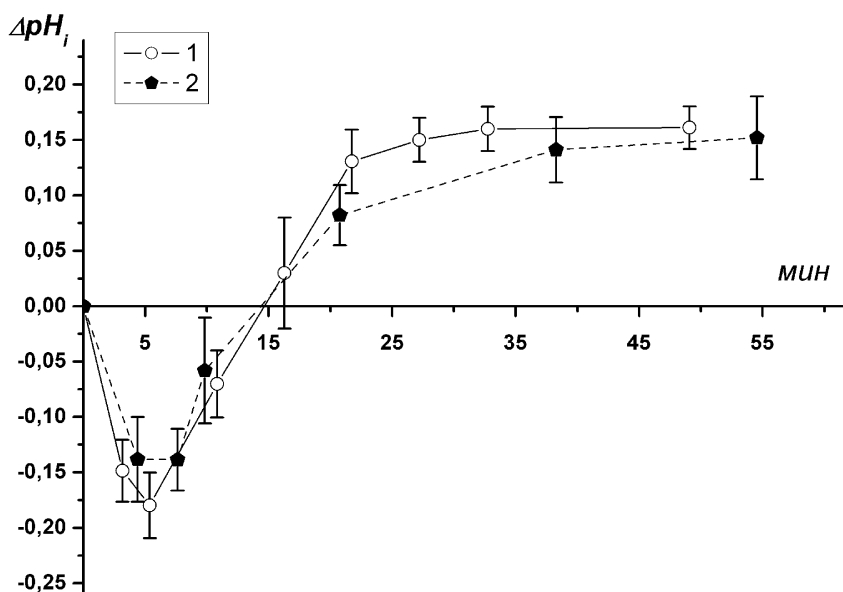


Рисунок. Изменение внутриклеточного pH мышинных перитонеальных макрофагов во времени при действии тафцина. По оси абсцисс: время после введения в среду инкубации тафцина в концентрации 0,1 мкг/мл (1) и 1,0 мкг/мл (2); По оси ординат: изменение внутриклеточного pH по сравнению с контролем (ΔpH_i).

и определяли меняющуюся во времени величину исследуемого параметра. Эксперименты проводили минимум в пяти независимых сериях, по три образца в каждой. В каждом образце измерение производилось на ~60 клетках выбранных в поле зрения случайным образом. Величина внутриклеточного pH макрофагов в контроле составляла $7,18 \pm 0,01$. Эксперименты проводили при температуре 22°C . Полученные данные представлены в виде средних арифметических значений исследованных параметров и их среднеквадратических ошибок. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента. Различия между средними арифметическими значениями параметров считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На рисунке представлены данные, полученные при анализе динамики изменения внутриклеточного pH (pH_i) макрофагов во времени при действии тафцина в концентрациях 0,1 и 1,0 мкг/мл, вызывающих, как было показано нами ранее [9], выраженное повышение уровня фагоцитоза и величины внутриклеточного pH. Как видно из рисунка, пептид в обеих исследованных концентрациях действует сходным образом, вызывая двухфазное изменение pH_i . В начальный период времени происходит его снижение, достигающее наибольшей выраженности примерно через 5 мин взаимодействия пептида с клеткой и составляющее около 0,17 ед. pH по сравнению с контролем. К 12–15 мин инкубации величина внутриклеточного pH возвращается к исходному уровню. В дальнейшем происходит постепенное повышение величины pH_i (на

0,10–0,15 ед. pH выше уровня контроля) к 20–25 мин. Этот уровень внутриклеточного pH уже не меняется вплоть до 45–50 мин инкубации. Подобное двухфазное изменение величины pH_i с начальным подкислением внутриклеточного содержимого и последующим его подщелачиванием весьма характерно для ответа клеток на действие многих биологически активных факторов [13, 14], в том числе известного хемотаксического стимулятора нейтрофилов трипептида N-формил-мет-лей-фен [15]. Изучение временной зависимости изменений pH_i нейтрофилов при действии этого пептида показало, что при 37°C максимальное подкисление внутриклеточного содержимого наблюдается уже через 0,5 мин инкубации и составляет около 0,07 ед. pH по сравнению с уровнем контроля. Ко второй минуте взаимодействия клеток с пептидом происходит восстановление pH_i до исходного уровня, а затем наблюдается постепенное возрастание внутриклеточного pH, достигающее к 7 мин инкубации величины 0,12 ед. выше уровня контроля. По мнению авторов, на первом этапе взаимодействия молекул пептида с клеточными рецепторами происходит кратковременное повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клеток. Это, в свою очередь, вызывает активацию различных процессов, приводящих к повышению в клетке концентрации ионов водорода, что находит отражение в регистрируемом начальном понижении pH_i . В дальнейшем, за счет увеличения активности различных систем удаления избытка H^+ из клетки и, в первую очередь, по-видимому, системы Na^+/H^+ -обмена, происходит повышение внутриклеточного pH. Из полученных нами данных следует, что близкие по характеру, однако, более медленные изменения pH_i имеют место и при действии тетрапептида тафцина на

перитонеальные мышинные макрофаги. Наблюдаемые в рассмотренных выше случаях различия в динамике изменений внутриклеточного рН могут быть обусловлены рядом причин, в том числе, спецификой объектов исследования, особенностями изучавшихся пептидных регуляторов, а также различиями в использованных экспериментальных условиях, в частности, температурных. На возможность последней указывают данные о том, что снижение температуры инкубации с 37 до 22°C приводит к замедлению процессов связывания флуоресцентно-меченного тафцина с рецепторами клеточной поверхности перитонеальных макрофагов без изменения характера наблюдаемых при этом событий [16]. Обращает на себя внимание то, что наблюдавшееся авторами однородное распределение флуоресцентного производного пептида, наиболее выраженное к 5 мин инкубации, сменялось образованием кластеров, а затем, примерно, через 10 мин — их эндоцитозом, заканчивающимся в пределах менее чем 30 мин инкубации. Наши данные, представленные на рисунке, показывают, что примерно к этому же времени (20–25 мин после начала инкубации) происходит выход величины внутриклеточного рН макрофагов на постоянный (повышенный по сравнению с контролем) уровень. Весьма интересным в этом аспекте представляется и то, что, судя по имеющимся в литературе данным [17], зависимое от времени специфическое связывание [³H]-тафцина со стимулированными макрофагами при 22°C достигает максимального уровня через 15–20 мин инкубации. Примерно в эти же сроки достигает наименьшего значения уровень внутриклеточного цАМФ в макрофагах под действием тафцина [18]. При этом сниженный уровень цАМФ сохраняется в клетках не менее 60 мин. В этой связи уместно напомнить, что по нашим данным, представленным на рисунке, повышенное значение внутриклеточного рН поддерживается в макрофагах в течение не менее чем 50 мин их инкубации с пептидом. Представленные выше, а также полученные нами ранее данные показывают, что тафцин в определенных условиях способен вызывать как возрастание специфической функциональной активности, так и повышение внутриклеточного рН макрофагов. В этой связи представлялось интересным рассмотреть вопрос о механизме

Таблица

Изменение внутриклеточного рН мышинных перитонеальных макрофагов при действии тафцина и ЭИПА

Действующий агент	Изменение рН макрофагов по сравнению с контролем (ΔpH_i)
Тафцин	+0,25±0,03
ЭИПА	-0,20±0,02
ЭИПА + тафцин	-0,16±0,03

Примечание. Концентрация тафцина — 0,3 мкг/мл. Концентрация ингибитора Na^+/H^+ -обмена этилизопропиламилорида (ЭИПА) — 12,5 мкМ.

подщелачивающего действие пептида. Учитывая важную роль системы Na^+/H^+ -обмена в регуляции pH_i разного типа клеток [19], мы попытались оценить вклад данной системы в наблюдаемое при действии тафцина повышение внутриклеточного рН. Для решения этой задачи было изучено действие пептида в условиях селективного ингибирования активности Na^+/H^+ -обменника плазматической мембраны макрофагов с помощью этилизопропиламилорида (ЭИПА). Как видно из данных, представленных в таблице, инкубация макрофагов в присутствии ЭИПА приводит к снижению внутриклеточного рН вследствие ингибирования системы Na^+/H^+ -обмена в клетке. Введение в этих условиях в среду инкубации тафцина (0,3 мкг/мл) не приводит к достоверному изменению исходно сниженного уровня pH_i , тогда как в отсутствие в среде ЭИПА при действии пептида в этой же концентрации наблюдается выраженное подщелачивание внутриклеточного содержимого. Полученные данные указывают на участие системы Na^+/H^+ -обмена в регистрируемом при действии тафцина повышении внутриклеточного рН макрофагов.

Таким образом, полученные нами результаты выявили двухфазный временной характер изменений внутриклеточного рН макрофагов при действии тафцина, а также показали участие системы Na^+/H^+ -обмена в подщелачивающем действии пептида на клетку.

Авторы выражают благодарность за сотрудничество в данных исследованиях Золотилину Сергею Александровичу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. An Y., Li L., Yang D., Jia N., Xu C., Wang Q., Wang S., Yuan S. Anticancer activity of tuftsin-derived T peptide in postoperative residual tumors // *Anti-cancer drugs*. 2014. Vol. 25. N 8. P. 857–867.
2. Wiecek Z., Zimecki M., Słon J.J., Siemion I.Z. The immunomodulatory activity of tetra- and tripeptides of tuftsin-kentsin group // *Peptides*. 1994. Vol. 15. N 2. P. 215–221.
3. Wardowska A., Dzierzbicka K., Menderska A., Trzonkowski P. New conjugates of tuftsin and muramyl dipeptide as stimulators of human monocyte-derived dendritic cells // *Protein Pept. Lett.* 2013. Vol. 20. N 2. P. 200–204.

4. Siemion I.Z., Kluczyk A. Tuftsin: on the 30-year anniversary of Victor Najjar's discovery // *Peptides*. 1999. Vol. 20. N 5. P. 45–74.
5. Khan M.A., Aljarbou A., Khan A., Owais M. Immune stimulating and therapeutic potential of tuftsin-incorporated nystatin liposomes against *Cryptococcus neoformans* in leukopenic BALB/C mice // *FEMS Immunol. Med. Mic.* 2012. Vol. 66. N 1. P. 88–97.
6. Moolenaar W.H., Tsien R.Y., van der Saag P.T., de Laat S.W. Na^+/H^+ — exchange and cytoplasmic pH in the

action of growth factors in human fibroblasts // *Nature*. 1983. Vol. 304. N 5927. P. 645–648.

7. Busa W.B., Nuccitelli R. Metabolic regulation via intracellular pH // *Am. J. Physiol.* 1984. Vol. 246. N 4. P. 409–438.

8. Frelin C., Vigne P., Ladoux A., Lazdunski M. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates // *Eur. J. Biochem.* 1988. Vol. 174. N 1. P. 3–14.

9. Туровецкий В.Б., Золотилин С.А., Сарычева Н.Ю., Калихевич В.Н., Каменский А.А. Влияние тафцина на функциональную активность и внутриклеточный pH перитонеальных макрофагов мышей // *Бюл. exper. биол.* 1994. Т. 67. № 3. С. 265–267.

10. Fridkin M., Najjar V.A. Tuftsin: Its chemistry, biology, and clinical potential // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1989. Vol. 24. N 1. P. 1–40.

11. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б. Модификация повреждающего действия ультрафиолетового излучения на мембраны перитонеальных макрофагов мышей // *Радиационная биология. Радиобиология*. 2002. Т. 42. № 2. С. 151–154.

12. Heiple J.M., Taylor D.L. Intracellular pH: Its measurement, regulation and utilization in cellular functions // *Proceedings of a conference held at the Kroc Foundation, Santa Ynez Valley, California, July 20–24, 1981*. NY: Alan. R. Liss., 1982. P. 21–54.

13. Пирутин С.К., Туровецкий В.Б., Друшко А.Б., Кудряшов Ю.Б. Изменение внутриклеточного pH ма-

крофагов после УФ-облучения // *Радиационная биология. Радиобиология*. 2004. Т. 44. № 6. С. 681–683.

14. Пархоменко И.М., Перитвили Г.В., Туровецкий В.Б., Кудряшов Ю.Б., Рубин А.Б., Бровко Л.Ю. Влияние малых доз ионизирующей радиации на внутриклеточный pH, содержание АТФ и синтетическую активность культивируемых фибробластов китайского хомячка // *Радиобиология*. 1993. Т. 33. № 1. С. 104–109.

15. Weisman S.J., Punzo A., Ford C., Sha'afi R.I. Intracellular pH changes during neutrophil activation: Na^+/H^+ — antiport // *J. Leukoc. Biol.* 1987. Vol. 41. N 1. P. 25–32.

16. Gottlieb P., Hazum E., Tzehoval E., Feldman M., Segal S., Fridkin M. Receptor-mediated endocytosis of tuftsin by macrophage cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984. Vol. 119. N 1. P. 203–211.

17. Bar-Shavit Z., Stabinsky Y., Fridkin M., Goldman R. Tuftsin-macrophage interaction: specific binding and augmentation of phagocytosis // *J. Cell. Physiol.* 1979. Vol. 100. N 1. P. 55–61.

18. Stabinsky Y., Bar-Shavit Z., Fridkin M., Goldman R. On the mechanism of action of the phagocytosis-stimulating peptide tuftsin // *Mol. Cell. Biochem.* 1980. Vol. 30. N 2. P. 71–77.

19. Grinstein S., Rothstein A. Mechanisms of regulation of the Na^+/H^+ exchanger // *J. Membr. Biol.* 1986. Vol. 90. N 1. P. 1–12.

Поступила в редакцию
06.11.15

INFLUENCE OF TETRAPEPTIDE TUFTSIN ON INTRACELLULAR PH OF MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

S.K. Pirutin^{1,3,*}, V.B. Turovetsky¹, N.Y. Sarycheva², A.B. Druzhenko³,
V.N. Kalihevich⁴, A.A. Kamensky²

¹ Department of Biophysics and ² Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

³ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow region, 142290, Russia;

⁴ Department of Natural Compounds Chemistry, Institute of Chemistry, Saint-Petersburg State University, Universitetsky pr. 26, Peterhof, St. Petersburg, 198504, Russia;

* e-mail: pirutin@yandex.ru

It was demonstrated by means of probe microfluorimetry of single cells that tuftsin in concentrations 0.1 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (that increase murine peritoneal macrophages phagocytic activity) changed intracellular pH (pH_i) biphasically over time. At the beginning there was a decrease of pH_i reaching the ultimate expression after 5 min of incubation. After that pH_i value increased, reaching maximum 30 min later. The observed parameter (pH_i) did not change up to 55 min. It was found that after administration of the Na^+/H^+ exchange blocker ethylisopropylamiloride into the cells incubation medium during tuftsin treatment there was no increase of intracellular pH. This finding can be the evidence that the observed increase of pH_i during tuftsin treatment through the second phase of cellular response connected with the system of Na^+/H^+ exchange.

Keywords: tuftsin, macrophages, intracellular pH, Na^+/H^+ exchanger.

Сведения об авторах:

Пирутин Сергей Константинович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: pirutin@yandex.ru

Туровецкий Валерий Борисович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-51-50; e-mail: vbturovet@rambler.ru

Сарычева Наталья Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., кафедра физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

Дружко Анна Борисовна — канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр., лаборатории функциональной биофизики белка ИТЭБ РАН г. Пушкино. Тел.: 4-967-73-25-80; e-mail: druzhko@mail.iteb.ru

Калихевич Виктор Николаевич — канд. хим. наук, ст. науч. сотр., кафедры химии природных соединений химического факультета СПбГУ. Тел.: 8-812-363-67-22; e-mail: vkalihevich@jand.ru

Каменский Андрей Александрович — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-55; e-mail: kamensky_msu@mail.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 582.282.123.4:577.152.34

**ФИБРИНОЛИТИЧЕСКАЯ И КОЛЛАГЕНОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ
ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПРОТЕИНАЗ ШТАММОВ МИКРОМИЦЕТОВ
ASPERGILLUS OCHRACEUS L-1 И *ASPERGILLUS USTUS* 1****А.А. Осмоловский^{1,*}, Е.А. Попова¹, В.Г. Крейер¹, Н.А. Баранова¹, Н.С. Егоров²**

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

² Международный учебно-научный биотехнологический центр, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: aosmol@mail.ru

Показано, что штаммы микромицетов *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 различаются по проявлению активности внеклеточных протеиназ при разных значениях pH, а также по выраженности своего действия на фибриллярные белки. Выявлено, что протеиназы *A. ochraceus* L-1 проявляют максимальную активность при росте продуцента на среде без нитратов (pH ферментативной реакции 8,0), а протеиназы *A. ustus* 1 проявляют максимальную активность при росте микромицета на среде, содержащей нитрат натрия (pH ферментативной реакции 6,0). Значения удельных фибринолитической и коллагенолитической активностей *A. ochraceus* L-1 в 2,2 и 1,6 раз больше, чем у *A. ustus* 1, соответственно, однако *A. ustus* 1 практически не проявляет общей протеолитической (казеинолитической) активности и обладает высоким соотношением фибринолитической активности и общей протеолитической (казеинолитической) активности (6,92), что делает его перспективным продуцентом протеиназ, расщепляющих фибрин и коллаген.

Ключевые слова: фибринолитические ферменты, коллагенолитические ферменты, протеиназы микромицетов.

Фибриллярные белки, в частности фибрин и коллаген, являются одними из трудногидролизуемых субстратов. Для их расщепления необходимы протеолитические ферменты со специфической активностью, применение которых особенно востребовано в медицине. Такие протеиназы используются в составе препаратов для удаления некротизированных тканей, гнойных выделений и кровяных сгустков в открытых ранах [1]. Препараты протеиназ с направленной фибринолитической активностью также весьма перспективны для использования в медицине в качестве тромболитических препаратов [2]. Наиболее эффективными протеиназами для этих целей являются ферменты, образуемые микроорганизмами, в том числе и микромицетами [3, 4].

Мицелиальные грибы, в отличие от бактерий, могут секретировать в окружающую среду до 5–12 протеиназ, активных при разных значениях физико-химических параметров и обладающих разной субстратной специфичностью [4, 5], поэтому микромицеты способны использовать для питания широкий спектр разнообразных белковых субстратов, встречающихся в почве [5]. Среди представителей разных групп мицелиальных грибов наибольший интерес представляют микромицеты рода

Aspergillus, которые способны образовывать несколько типов протеиназ направленного действия [1, 6]. В последнее время была показана способность протеиназ аспергиллов осуществлять специфические реакции ограниченного протеолиза [7, 8].

Среди аспергиллов известны продуценты как коллагеназ, так и фибринолитических протеиназ [9–11]. Однако выделенные при их культивировании протеиназы были высоко активны в отношении глобулярных белков, что накладывает ограничения на возможность их медицинского применения, связанные с токсичностью и проявляемыми аллергическими реакциями. Поэтому необходим поиск новых продуцентов протеиназ с выраженной активностью к фибриллярным белкам. Важным для оценки эффективности таких протеиназ является соотношение фибринолитической и неспецифической общей протеолитической (казеинолитической) активности (ФА/ОПА) [12].

Штаммы микромицетов *Aspergillus ochraceus* и *Aspergillus ustus*, использованные в данной работе, были отобраны в результате предыдущих исследований как перспективные продуценты протеиназ с фибринолитической и коллагенолитической активностью [13, 14].

Целью работы было изучение действия протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 на фибриллярные белки (фибрин и азоколлаген) при разных значениях pH.

Материалы и методы

Объекты исследования и условия культивирования.

Использовали штаммы *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Микромицеты культивировали в глубинных условиях на орбитальной качалке (200 об/мин) в качалочных колбах объемом 750 мл со 100 мл питательной среды при 28°C в течение 2 сут на среде, содержащей сусло, глюкозу и пептон [15], после чего часть полученного посевного материала переносили в среды состава (в %): глюкоза — 3,5, крахмал — 0,1, гидролизат рыбной муки — 0,5, пептон — 0,5, NaCl — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда № 1); глюкоза — 3,0, глицерин — 7,0, гидролизат рыбной муки — 0,5, NaNO_3 — 0,2, KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05 (среда № 2) с последующим культивированием в течение 5 сут. Засев осуществляли смывом спор микромицетов, выращенных в пробирках на скошенном сусло-агаре в течение 7 сут.

Определение протеолитической активности.

Активность протеиназ *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 определяли в культуральной жидкости после предварительного отделения биомассы фильтрованием при разных значениях pH с субстратами — казеином, фибрином и азоколлагеном, приготовленными на 0,1 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,0 и 6,0) или же на 0,1 М Трис-НСl буфере (pH 7,0 и 8,0).

Общую протеолитическую (казеинолитическую) активность культур определяли с помощью модифицированного метода Ансона — Хагихары [16, 17]. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл 1%-ного раствора казеина по Гаммерстену в соответствующем буфере, после чего проводили инкубацию при 37°C в течение 10 мин. Останавливали реакцию добавлением 600 мкл 10%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Далее образцы центрифугировали при 12 000 g и определяли поглощение при 275 нм в супернатанте. Активность выражали в мкМ тирозина, образовавшегося в течение 1 мин в 1 мл культуральной жидкости ($E_{\text{Тир}}$). Для расчета общей протеолитической активности строили калибровочную кривую по тирозину.

Фибринолитическую (плазминоподобную) активность определяли с помощью суспензии бычьего фибрина [18]. К 200 мкл пробы добавляли 400 мкл 1%-ной суспензии фибрина, приготовленного на соответствующем буфере, и после инкубации в течение 60 мин при 37°C реакцию останавливали добавлением 600 мкл 10%-ной ТХУ. Далее в супернатанте, полученном описанным выше способом, проводили измерение поглощения при 275 нм. Активность выражали в $E_{\text{Тир}}$.

Определение коллагенолитической активности проводили с использованием азоколлы ("Calbio-tech", США) по общепринятой методике [14]. Ак-

тивность выражали в мкг расщепившегося азоколлы за 1 мин ($E_{\text{Азк}}$) в 1 мл культуральной жидкости.

Реакции проводили при постоянном перемешивании в термошейкере TS-100 ("BioSan", Латвия). Измерение оптической плотности растворов проводили на спектрофотометре Hitachi 200-20 (Япония).

Определение белка в культуральной жидкости.

Концентрацию белка определяли после предварительного осаждения в культуральной жидкости дезоксихолатом натрия и ТХУ [19]. К 1 мл культуральной жидкости добавляли 100 мкл 0,15%-ного дезоксихолата натрия и выдерживали при комнатной температуре в течение 10 мин, после чего добавляли 50 мкл 100% ТХУ. Далее образцы центрифугировали при 12 000 g, супернатант сливали, а осадок промывали 1 мл холодного этанола, высушивали в токе воздуха и растворяли в 0,05 М Трис-НСl буфере, pH 8,0-8,2. В полученных растворах проводили спектрофотометрическое определение концентрации белка при 280 нм в кювете с длиной пути в 1 см [20].

Результаты и обсуждение

Активность протеиназ штаммов *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 была изучена при значениях pH ферментативной реакции от 5,0 до 8,0 с интервалом через единицу. В этом диапазоне pH работают сериновые протеиназы, которые характерны для аспергиллов — изолятов почв и растительных остатков [4]. Поскольку мицелиальные грибы обладают смешанным типом питания по источникам азота, образование протеиназ определяли на двух средах — с источниками аминного азота (среда № 1) или аминного и минерального азота (среда № 2).

В табл. 1 приведены данные общей протеолитической, фибринолитической и коллагенолитической активности *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1. Как видно из таблицы, значения pH, при которых микромицеты проявляют максимальную активность, неодинаковы. Так, для протеиназ *A. ochraceus* L-1 максимальные значения общей протеолитической и фибринолитической активности были показаны при pH реакции 8,0, а коллагенолитической — при pH 7,0. Максимальные значения всех трех изученных активностей у протеиназ *A. ustus* 1 приходились на pH 6,0, однако этот штамм был высоко активен и при pH 8,0 в случае с фибринолитической и коллагенолитической активностью, что может указывать на присутствие в протеолитическом комплексе этого микромицета нескольких ферментов. Протеолитические ферменты обеих культур проявляли слабую активность или были неактивны при pH 5,0.

Следует отметить, что протеолитическая активность *A. ochraceus* L-1 была выше на среде № 1, а *A. ustus* 1 — на среде № 2, это может указывать на то, что разные источники азота в составе среды по-разному влияют на регуляцию секреции протеиназ этих микромицетов. Для *A. ochraceus* ранее

Таблица 1

Протеолитическая активность микромицетов *A. ochraceus* и *A. ustus* при разных значениях pH

Активность	pH реакции	<i>A. ochraceus</i>		<i>A. ustus</i>	
		Среда № 1	Среда № 2	Среда № 1	Среда № 2
Общая протеолитическая, $E_{\text{тип}}/\text{мл}$	5,0	0,0	0,0	1,1	0,0
	6,0	64,5	0,1	5,3	3,4
	7,0	83,1	1,3	32,1	1,5
	8,0	94,9	2,8	25,1	0,0
Фибринолитическая, $E_{\text{тип}}/\text{мл}$	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	6,0	10,0	0,2	8,1	22,7
	7,0	14,4	5,0	17,3	18,5
	8,0	17,6	8,5	5,2	22,1
Коллагенолитическая, $E_{\text{азк}}/\text{мл} \times 10^{-3}$	5,0	3,5	0,0	0,0	19,5
	6,0	21,5	14,2	24,3	107,2
	7,0	59,7	30,3	33,2	87,3
	8,0	56,4	11,2	37,1	101,4

было показано, что добавление к среде с нитратом натрия белковых субстратов увеличивало протеолитическую активность культуры [21]. В случае с *A. ustus* 1 добавление нитрата натрия к среде индуцировало образование протеиназ. Общая протеолитическая активность *A. ochraceus* L-1 на среде № 1 была в 7,9 раз больше, чем на среде № 2, а фибринолитическая и коллагенолитическая — почти в 2 раза. Фибринолитическая и коллагенолитическая активности микромицета *A. ustus* 1, выращенного на среде № 2, были в 1,3 и 2,9 раз больше, соответственно, чем на среде № 1. Эти активности были на 22,5% и 44,3% больше, чем у *A. ochraceus* L-1.

Общая протеолитическая активность *A. ustus* 1 была выше на среде № 1 ($32,1 E_{\text{тип}}/\text{мл}$), а на среде № 2 она была незначительна ($3,4 E_{\text{тип}}/\text{мл}$). Высокие значения фибринолитической и коллагенолитической активности и минимальное проявление общей протеолитической активности на одной среде (среда № 2) могут свидетельствовать о содержании в протеолитическом комплексе *A. ustus* 1 протеиназ с разной специфичностью, в том числе высокоактивных к фибриллярным белкам, а также о возможности регулировать их секрецию.

Определение содержания белка в культуральной жидкости продуцентов позволило выявить, что *A. ustus* 1 выделяет в среду культивирования больше белка, чем *A. ochraceus* L-1 (табл. 2). Сопоставление удельных значений фибринолитической и коллагенолитической активностей внеклеточных протеиназ данных микромицетов, рассчитанных на мкг белка, при pH реакции, проявившем максимальные значения активности, показало, что *A. ochraceus* L-1 имеет примерно одинаковые значения удельных активностей при росте на обеих

средах и они выше, чем у *A. ustus* 1 в 2,1 и 1,6 раз, соответственно (табл. 2). Значения удельных фибринолитической и коллагенолитической активностей протеиназ *A. ustus* 1, как и значения общих протеолитических активностей были на среде № 2 в 3 и 7 раз больше, чем на среде № 1. Сравнение удельных значений общей протеолитической активности протеиназ микромицетов на обеих средах показало, что *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 обладают в 3,2 и 3,8 раз, соответственно, большей активностью на среде № 1, чем на среде № 2.

Соотношение фибринолитической и общей протеолитической активностей (ФА/ОПА) микромицетов *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 представлено на рисунке. Как для значений общих активностей, так и для значений удельных активностей это соотношение для *A. ustus* 1 в 38 раз больше, чем для *A. ochraceus* L-1, что говорит о большей специфичности протеиназ *A. ustus* 1 к фибриллярным белкам по сравнению с *A. ochraceus* L-1.

Соотношение ФА/ОПА, показанное для протеиназ *A. ustus* 1, на среде № 2 в 11,5 раз больше, чем полученное на среде № 1. Вероятно, качественно и количественно изменяя источники азота в среде культивирования, возможно увеличить это соотношение и, таким образом, получить высокоспецифичные к фибрину и коллагену протеиназы. Аналогичные результаты были показаны для *Penicillium chrysogenum* Н9. На среде с нитратом натрия соотношение ФА/ОПА для протеиназ этого микромицета, как и для *A. ustus* 1, составило больше 6, а при варьировании источниками азота удалось его увеличить в 2,6 раза [12]. Именно поэтому протеолитические ферменты, образуемые *A. ustus* 1 и проявляющие выраженное действие на фибрин, представляют значительный интерес.

Таблица 2

Удельные значения протеолитической активности *A. ochraceus* и *A. ustus*

Микромицет	№ среды	Общий белок, мкг/мл	Удельная общая протеолитическая активность, $E_{\text{тип}}/\text{мкг белка}$	Удельная фибринолитическая активность, $E_{\text{тип}}/\text{мкг белка}$	Удельная коллагенолитическая активность, $E_{\text{АЗК}}/\text{мкг белка} \times 10^{-3}$
<i>A. ochraceus</i>	1	5,3	17,90	3,32	11,26
	2	2,2	5,68	3,86	13,77
<i>A. ustus</i>	1	31,1	1,00	0,55	1,19
	2	12,8	0,26	1,77	8,37

Таким образом, микромицеты *A. ochraceus* L-1 и *A. ustus* 1 изучены в качестве продуцентов протеиназ направленного действия. Показано, что внеклеточные протеиназы, образуемые этими штаммами, отличаются по проявлению активности при разных значениях pH и выраженности своего действия на фибриллярные белки. Внеклеточные протеиназы *A. ochraceus* L-1 проявляют максимальную активность при росте микромицета на среде без нитрата при pH 8,0 и высокие значения удельных фибринолитической ($3,86 E_{\text{тип}}/\text{мкг белка}$) и коллагенолитической ($13,77 E_{\text{АЗК}}/\text{мкг белка} \times 10^{-3}$) активностей. Для внеклеточных протеиназ *A. ustus* 1 показана максимальная активность при росте продуцента на среде, содержащей нитрат натрия, при pH реакции 6,0 и небольшими, по сравнению с *A. ochraceus* L-1, значениями удельных фибринолитической и коллагенолитической активностей ($1,77 E_{\text{тип}}/\text{мкг белка}$ и $8,37 E_{\text{АЗК}}/\text{мкг белка} \times 10^{-3}$, соответственно). Однако штамм *A. ustus* 1 практически не проявляет общей протеолитической (казеино-

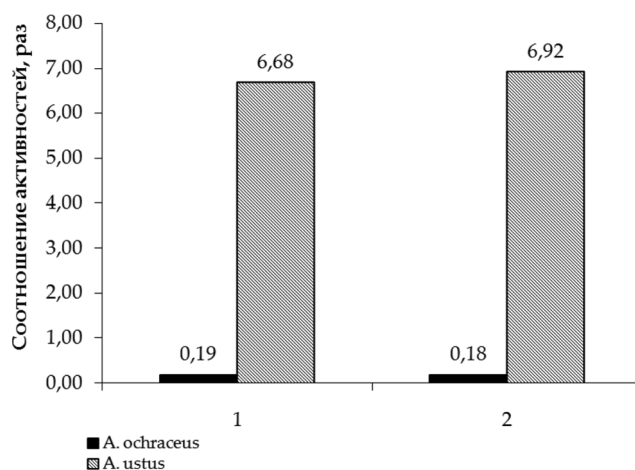


Рисунок. Соотношение общих фибринолитической и протеолитической (1) и удельных (2) активностей протеиназ микромицетов *A. ochraceus* и *A. ustus*

литической) активности, и ФА/ОПА составило 6,92, что делает его перспективным продуцентом фибринолитических и коллагенолитических протеиназ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zanoelo F.F., Giannesi G.C., Cabral H. Proteolytic enzymes: biochemical properties, production and biotechnological application // Fungal enzymes / Eds. M.L.T.M. Polizeli and M. Rai. Boca Raton: CRC Press, 2013. P. 94–112.
2. Kotb E. Activity assessment of microbial fibrinolytic enzymes // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. Vol. 97. N 15. P. 6647–6665.
3. Egorov N.S. Microbiological synthesis of proteolytic enzymes possessing fibrinolytic activity // Thrombosis and thrombolysis / Eds. E.I. Chazov and V.N. Smirnov. N.Y.: Consultants Bureau, 1986. P. 197–221.
4. Nirmal N.P., Shankar S., Laxman R.S. Fungal proteases: An overview // Int. J. Biotech. Biosci. 2011. Vol. 1. N 1. P. 1–40.
5. Ландау Н.С., Кураков А.В., Гуликова О.М., Батомункуева Б.П., Струкова С.М., Егоров Н.С. Экстрацеллюлярные протеиназы микромицетов с фибринолитическими и антикоагулянтными свойствами // Микробиология. 1998. Т. 67. № 2. С. 215–220.
6. Клечковская В.В., Егоров Н.С. О плазмокоагулирующей и фибринолитической активностях грибов рода *Aspergillus* // Микробиология. 1983. Т. 52. № 3. С. 396–403.
7. Osmolovskiy A.A., Kreier V.G., Kurakov A.V., Baranova N.A., Egorov N.S. *Aspergillus ochraceus* micromycetes —

producers of extracellular proteinases — protein C activators of blood plasma // Appl. Biochem. Microbiol. 2012. Vol. 48. N 5. P. 488–492.

8. Osmolovskiy A.A., Zvonareva E.S., Kreyer V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. The effect of micromycete extracellular proteases of the *Aspergillus* genus on the proteins of haemostatic system // Russ. J. Bioorg. Chem. 2014. Vol. 40. N 6. P. 634–639.

9. Sukhosiroya E.A., Nikitina Z.K., Yakovleva M.B., Veshchikova E.V., Bykov V.A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus* // Bull. Exp. Biol. Med. 2003. Vol. 135. N 5. P. 447–451.

10. Barthomeuf C., Pourrat H., Pourrat A. Collagenolytic of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger* // J. Ferment. Bioeng. 1992. Vol. 73. N 3. P. 233–236.

11. Schirasaka N., Naitou M., Okamura K., Kusuda M., Fukuta Y., Terashita T. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3 // Mycoscience. 2012. Vol. 53. N 5. P. 354–364.

12. El-Aassar S.A., El-Badry H.M., Abdel-Fattah A.F. The biosynthesis of proteases with fibrinolytic activity in immobilized cultures of *Penicillium chrysogenum* H9 // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. Vol. 33. N 1. P. 26–30.

13. Попова Е.А., Крейер В.Г., Осмоловский А.А., Егоров Н.С. Получение препарата коллагенолитической протеиназы, образуемой *Aspergillus ustus* в условиях глубинного и твердофазного культивирования // Усп. мед. микологии. 2014. Т. 12. С. 333–335.

14. Sharkova T.S., Kurakov A.V., Osmolovskiy A.A., Matveeva E.O., Kreier V.G., Baranova N.A., Egorov N.S. Screening of producers of proteinases with fibrinolytic and collagenolytic activities among micromycetes // Microbiology. 2015. Vol. 84. N 3. P. 359–364.

15. Batomunkueva B.P., Egorov N.S. Isolation, purification and resolution of the extracellular proteinase complex of *Aspergillus ochraceus* 513 with fibrinolytic and anticoagulant activities // Microbiology. 2001. Vol. 70. N 5. P. 519–522.

16. Hagihara B., Matbara H., Nakai M., Okunuk K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // J. Biochem. 1958. Vol. 45. N 3. P. 185–194.

17. Егоров Н.С., Ландау Н.С., Буяк Л.И., Крейер В.Г. Гидролитическая система нокардиоформной бактерии

Nocardia minima в процессе ее роста, развития и дифференциации // Микробиология. 1991. Т. 60. № 4. С. 637–643.

18. Mukherjee A.K., Rai C.K., Thakur R., Chattopadhyay P., Kar S.K. Bafibrinase: a non-toxic, non-hemorrhagic, direct-acting fibrinolytic serine protease from *Bacillus sp.* strain AS-S20-I exhibits *in vivo* anticoagulant activity and thrombolytic potency // Biochimie. 2012. Vol. 94. N 6. P. 1300–1308.

19. Bollag D.M., Edelstein S.J. Protein Methods. N.Y.: Wiley-Liss Inc., 1991. P. 72–73.

20. Gertler A., Trop M. The elastase-like enzymes from *Streptomyces griseus* (Pronase). Isolation and partial characterization // Eur. J. Biochem. 1971. Vol. 9. N 1. P. 90–96.

21. Osmolovsky A.A., Kreier V.G., Baranova N.A., Kurakov A.V., Egorov N.S. Production of extracellular proteinases — protein C activators of blood plasma — by the micromycete *Aspergillus ochraceus* during submerged and solid-state fermentation // Appl. Biochem. Microbiol. 2013. Vol. 49. N 6. P. 581–586.

Поступила в редакцию
06.08.2015

FIBRINOLYTIC AND COLLAGENOLYTIC ACTIVITY OF EXTRACELLULAR PROTEINASES OF MICROMYCETES *ASPERGILLUS OCHRACEUS* L-1 AND *ASPERGILLUS USTUS* 1

A.A. Osmolovskiy^{1,*}, E.A. Popova¹, V.G. Kreier¹, N.A. Baranova¹, N.S. Egorov²

¹ Department of Microbiology, School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² International Biotechnological Center, M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;
* e-mail: aosmol@mail.ru

It was shown that extracellular proteinases produced by micromycetes *A. ochraceus* L-1 and *A. ustus* 1 differ by the values of activity at various pH values and the intensity of its effect on fibrillar proteins. It was revealed that the proteinase of *A. ochraceus* L-1 demonstrated maximum activity during the growth of the producer on nitrate-free growth medium, at pH 8.0, and proteinase of *A. ustus* 1 showed maximum activity during the growth of the micromycete on a medium containing sodium nitrate, at pH of 6.0. Values of specific fibrinolytic and collagenolytic activities of *A. ochraceus* L-1 were in 2.2 and 1.6 times greater than those activities of *A. ustus* 1, but *A. ustus* 1 showed low values of total proteolytic (caseinolytic) activity and had a high ratio of fibrinolytic activity to total proteolytic (caseinolytic) activity (6.92), making it a promising producer of proteinases which hydrolyze fibrin and collagen.

Key words: fibrinolytic enzymes, collagenolytic enzymes, proteinases of micromycetes.

Сведения об авторах:

Осмоловский Александр Андреевич — канд. биол. наук, зам. декана, ст. преп. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: aosmol@mail.ru

Попова Елизавета Андреевна — науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: veliania@gmail.com

Крейер Валериана Георгиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Баранова Нина Андреевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: vkreyer@yandex.ru

Егоров Николай Сергеевич — докт. биол. наук, проф. Международного биотехнологического центра МГУ имени М.В. Ломоносова. Тел.: 8-495-939-30-33; e-mail: nsegorov21@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. Желаям 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

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

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

Тезисы докладов (материалы) конференции:

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

Автореферат диссертации:

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

Электронный ресурс:

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

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

Электронная публикация:

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

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

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

Особенности оформления

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

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

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

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

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

Подготовка к печати

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

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

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

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

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

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

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