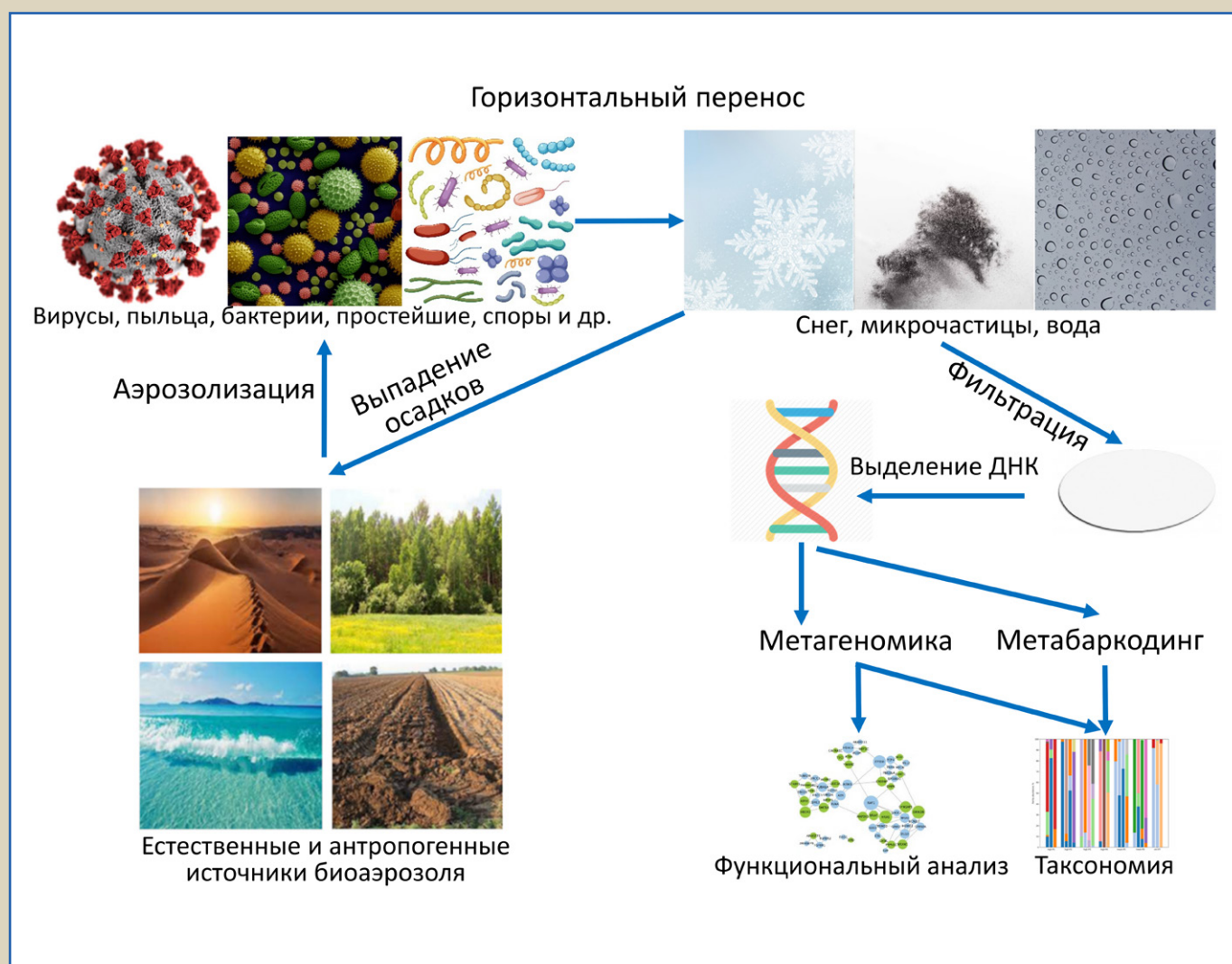


Acta Naturae

О биоразнообразии микробиома воздуха



**КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ
СТРОМАЛЬНЫХ И
СЫВОРОТОЧНЫХ МАРКЕРОВ
ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА
СТР. 75**

**СМЕЩЕНИЕ РЕПЕРТУАРА ГЕНОВ
ЗАРОДЫШЕВОЙ ЛИНИИ В-КЛЕТОЧНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ ПРИ РАССЕЯННОМ
СКЛЕРОЗЕ
СТР. 84**

Объемные аддукты в составе кластерных повреждений ДНК: причины устойчивости к удалению системой NER

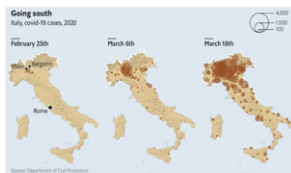
Н. В. Науменко, И. О. Петрусева, О. И. Лаврик

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) удаляет из ДНК различные объемные повреждения, которые вызывают существенные искажения регулярной структуры двойной спирали. В обзоре проанализированы данные о формировании кластерных повреждений, содержащих объемные аддукты, потенциальной биологической значимости таких повреждений, а также о методах оценки их количества, рассмотрены причины подавления катализируемой системой NER эксцизии объемных повреждений из состава кластеров.



Схематическое изображение узнавания поврежденного участка ДНК белком XPC

Потенциальная связь отложенного воздействия катастрофических техногенных выбросов токсичных газов и клинического течения COVID-19



Карта распространения COVID-19 в Италии

Дж. Суччи, В. Педрич, А. П. Богачук, А. Г. Тормасов, А. А. Белогуров, А. Спаллоне
Пандемия, вызванная коронавирусом D-19 (COronaVIrus Disease 2019, COVID-19), серьезно затронула почти все страны мира. В первую волну распространения инфекции аномально высокий уровень смертности был зарегистрирован в Италии, что требует убедительного объяснения. В 1976 году в небольшом городе Севезо, расположенном в Ломбардии, в результате крупной техногенной аварии произошел выброс диоксида. Промышленная катастрофа оказала существенное негативное воздействие на жителей близлежащих районов, более того, в последующие годы наблюдался рост онкологических заболеваний среди пострадавшего населения. Сформулировано положение о роли выброса диоксида в качестве значимого негативного кофактора осложненного клинического течения COVID-19.

Flow-seq-метод: особенности и применение в изучении бактериальной трансляции

Е. С. Комарова, О. А. Донцова, Д. В. Пышный, М. Р. Кабилов, П. В. Сергиев

Метод Flow-seq основан на использовании библиотек репортерных конструкций, где определенный элемент, регулирующий экспрессию генов флуоресцентных репортерных белков, представлен во многих тысячах вариантов. Библиотеки репортерных конструкций внедряют в клетки, сортируют по уровню флуоресценции, а затем проводят их высокопроизводительное секвенирование. Таким образом, появляется возможность в одном эксперименте на десятках и сотнях тысяч репортерных конструкций выявлять закономерности, определяющие эффективность экспрессии. В обзоре проведен сравнительный анализ метода Flow-seq и других методов, используемых для оценки эффективности трансляции мРНК.

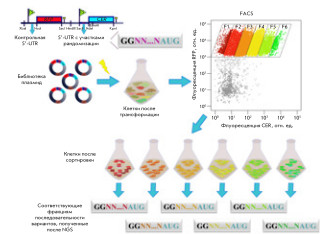
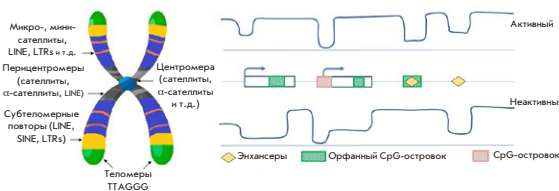


Схема метода Flow-seq

Метилирование ДНК: распределение в геноме, механизм регуляции и мишень для терапии



Профиль метилирования ДНК и повторяющиеся последовательности

Д. С. Каплун, Д. Н. Калюжный, Е. Б. Прохорчук, С. В. Женило
Метилирование ДНК является важнейшей эпигенетической модификацией, вовлеченной в регуляцию транскрипции, импринтинга, установление X-инактивации, формирование структуры хроматина. В обзоре обобщаются исследования о профиле метилирования ДНК в геноме, обсуждается, почему некоторые участки ДНК избегают метилирования, какие факторы могут влиять на уровень метилирования ДНК или ее интерпретацию, а значит, могут рассматриваться в качестве мишени для терапии.

Acta Naturae

ТОМ 14, № 4 (55), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2022
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев
Главные редакторы: А.Г. Габитов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2022

Номер подписан в печать 29 декабря 2022 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,

г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал Acta Naturae входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.204

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Д. С. Каплун, Д. Н. Калюжный,
Е. Б. Прохорчук, С. В. Женило
**Метилирование ДНК: распределение
в геноме, механизм регуляции
и мишень для терапии 4**
- Е. С. Комарова, О. А. Донцова,
Д. В. Пышный, М. Р. Кабилов, П. В. Сергиев
**Flow-seq-метод: особенности и применение
в изучении бактериальной трансляции 20**
- Н. В. Науменко, И. О. Петрусева,
О. И. Лаврик
**Объемные аддукты в составе кластерных
повреждений ДНК: причины устойчивости
к удалению системой NER 38**
- Н. Б. Наумова, М. Р. Кабилов
О биоразнообразии микробиома воздуха . . 50

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Д. Л. Атрошенко, Д. И. Головина,
Е. П. Сергеев, М. Д. Шеломов,
А. Г. Ельченинов, И. В. Кубланов,
Т. А. Чубарь, А. А. Пометун, С. С. Савин,
В. И. Тишков
**Биоинформационно-структурный
подход к поиску новых оксидаз
D-аминокислот** 57
- С. В. Зубова, Н. И. Косякова, С. В. Грачев,
И. Р. Прохоренко
**Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus*
PG блокирует эффекты липотейхоевой
кислоты – агониста Toll-подобного
рецептора 2** 69
- О. В. Ковалева, П. А. Подлесная,
В. Л. Чанг, Н. А. Огнерубов, А. Н. Грачев,
Н. А. Козлов, И. С. Стилиди, Н. Е. Кушлинский
**Комплексный анализ стромальных
и сывороточных маркеров
при раке желудка** 75
- Я. А. Ломакин, Л. А. Овчинникова,
М. Н. Захарова, М. В. Иванова,
Т. О. Симанив, М. Р. Кабилов, Н. А. Быкова,
В. С. Мухина, А. Н. Каминская, А. Е. Тупикин,
М. Ю. Захарова, А. В. Фаворов,
С. Н. Иллариошкин, А. А. Белогууров,
А. Г. Габибов
**Смещение репертуара генов
зародышевой линии В-клеточных
рецепторов при рассеянном склерозе** 84
- П. Ю. Поварнина, А. А. Волкова,
О. Н. Воронцова, А. А. Каменский,
Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин
**Низкомолекулярный миметик BDNF,
дипептид ГСБ-214, предотвращает
ухудшение памяти у крыс на моделях
болезни Альцгеймера** 94

Дж. Суччи, В. Педрич, А. П. Богачук,
А. Г. Тормасов, А. А. Белогууров,
А. Спаллоне

**Потенциальная связь отложенного
воздействия катастрофических
техногенных выбросов токсичных газов
и клинического течения COVID-19** 101

С. Н. Щелкунов, А. А. Сергеев,
К. А. Титова, С. А. Пьянков,
Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова,
Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков,
Л. И. Карпенко, С. Н. Якубицкий
**Сравнение эффективности
трансэпидермальной и интрадермальной
иммунизации мышей вирусом
осповакцины** 111

Правила для авторов 119

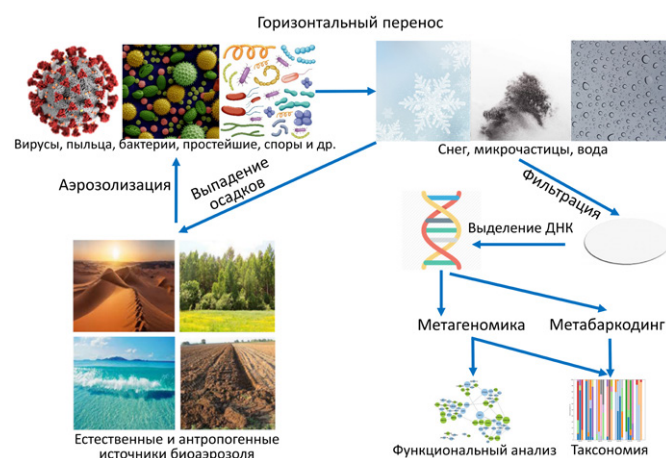


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Наумовой и др.)

УДК 577.218

Метилирование ДНК: распределение в геноме, механизм регуляции и мишень для терапии

Д. С. Каплун^{1,2}, Д. Н. Калюжный³, Е. Б. Прохорчук^{1,2}, С. В. Женило^{1,2}¹ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, 119071 Россия²Институт биологии гена РАН, Москва, 119991 Россия³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

E-mail: zhenilo@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 07.10.2022

Принята к печати 29.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11822

РЕФЕРАТ Метилирование – важнейшая эпигенетическая модификация ДНК, участвующая в регуляции транскрипции, импринтинге, установлении X-инактивации, формировании структуры хроматина. Метилирование ДНК в геноме чаще всего ассоциировано с подавлением транскрипции и с формированием закрытого гетерохроматина. Однако результаты полногеномных исследований профиля метилирования ДНК, транскрипционной активности генов заставили пересмотреть эту парадигму. Промоторы многих генов остаются активными, несмотря на их метилирование. Отличия в распределении метилирования ДНК в норме и патологии позволяют рассматривать метилирование в качестве диагностического маркера или терапевтической мишени. Все это повышает интерес к изучению факторов, влияющих на метилирование ДНК и участвующих в его интерпретации. За последнее время найдено большое количество белковых факторов, способность которых связываться с ДНК зависит от метилирования. Многие из этих белков выступают не только как активаторы или репрессоры транскрипции, но и влияют на уровень метилирования ДНК. Эти факторы рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени при заболеваниях, в основе которых лежат или изменение метилирования ДНК, или изменение активности белков, связывающихся с метилированной ДНК. Помимо белковых факторов, на метилирование ДНК может влиять вторичная структура ДНК, которая также служит терапевтической мишенью. В представленном обзоре обобщены результаты последних исследований профиля метилирования геномной ДНК, обсуждаются причины избегания метилирования некоторыми участками ДНК, а также факторы, способные влиять на уровень метилирования ДНК и использоваться в качестве мишени для терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метилирование ДНК, транскрипционный фактор, ДНК-метилтрансферазы, G-квадруплексы, ТЕТ-диоксигеназы, метил-ДНК-связывающие белки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТФ – транскрипционные факторы.

ВВЕДЕНИЕ

Самой распространенной модификацией ДНК в клетках млекопитающих является метилирование остатков цитозина, который называют пятым основанием ДНК. Чаще всего метилированию подвергаются остатки цитозина в составе CpG-динуклеотидов. Однако в стволовых клетках и нейронах метилированные цитозины, в виде CpG-динуклеотидов, могут составлять 25–50% от всех mC [1]. У млекопитающих около 70–80% цитозинов в CpG-динуклеотидах метилированы [2]. Метилирование ДНК осуществляется *de novo* ДНК-метилтрансферазами DNMT3a/3b, которые не являются взаимозаменяемыми и отвечают

за метилирование разных участков генома [3, 4]. При репликации метилирование ДНК поддерживается с помощью DNMT1 ДНК-метилтрансферазы. Деметилирование ДНК происходит как пассивно при делении клеток, так и активно за счет действия ферментов. Основными факторами, участвующими в активном деметилировании, являются диоксигеназы ТЕТ1,2,3. ТЕТ-белки окисляют метилцитозин до гидроксиметилцитозина, затем формилцитозина и карбоксицитозина, которые за счет эксцизионной репарации тимин-ДНК-гликозилазой (TDG/NEIL) переходят в цитозин (рис. 1) [5]. Производные метилцитозина рассматриваются не только как промежуточные состояния между метилированным

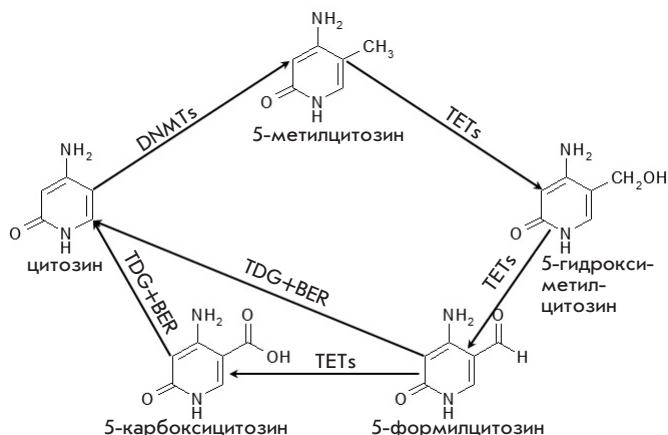


Рис. 1. Схема метилирования и деметилирования цитозина

и неметилированным основанием, но и как модификации ДНК, которые влияют на связывание факторов транскрипции, участвуя в регуляции экспрессии генов. (Производные метилцитозина рассмотрены в обзоре [6].)

Основные изменения метилирования ДНК происходят в ходе развития организма, при дифференцировке клеток. Для дифференцированных клеток характерен стабильный профиль метилирования ДНК, который тем не менее может варьировать при внешнем воздействии, различных патологических процессах, старении [7–11]. Динамическое изменение метилирования ДНК в дифференцированных клетках обнаружено также при обучении и формировании памяти в нервных клетках [12, 13]. Во всех остальных случаях метилирование ДНК

в дифференцированных клетках остается стабильным. Это позволяет рассматривать метилирование ДНК в качестве мишени для лечения и диагностики различных патогенетических состояний, в основе которых лежат нарушения в уровне метилирования ДНК, влияющие на транскрипцию генов.

В данном обзоре приведены основные характеристики распределения метилирования ДНК в геноме. На основании последних опубликованных данных проанализированы факторы, влияющие на установление метилирования ДНК, его поддержание или деметилирование. Обсуждается возможность терапевтического использования этих факторов.

1. ПРОФИЛЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Около 90% всех метилированных CpG в геноме млекопитающих находятся в различных повторяющихся последовательностях, таких, как сателлитные повторы и мобильные элементы [14]. Наибольшее количество CpG-богатых повторяющихся элементов расположено в структурных областях хромосом: центромерных, околоцентромерных и субтеломерных (рис. 2А). Нанопоровое полногеномное секвенирование генома человека позволило не только прочесть последовательности повторяющихся элементов, но и провести анализ их метилирования в геноме: в норме они в значительной степени метилированы [2, 15]. Отметим, что метилирование дублированных/повторяющихся последовательностей, находящихся на разных хромосомных участках, может сильно отличаться [2], то есть для установления определенного профиля метилирования повторяющихся последовательностей

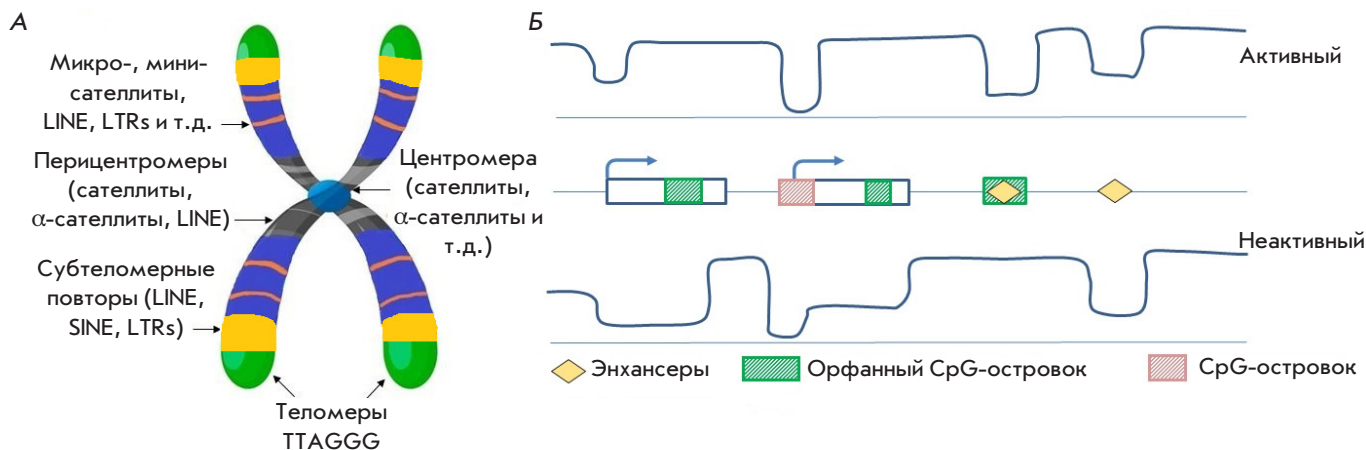


Рис. 2. Профиль метилирования ДНК и повторяющиеся последовательности (А). Расположение различных повторяющихся последовательностей на хромосоме. Б — профиль метилирования ДНК в геноме в зависимости от активности промоторов и энхансеров и наличия CpG-островков

важна не только сама последовательность, но и ее хромосомное окружение. Гипометилирование различных повторяющихся элементов характерно для различных патологических состояний, включая онкотрансформацию клеток, иммунодефицитные состояния, аутоиммунные, неврологические и психиатрические заболевания [7–9, 16, 17]. Необходимость метилирования сателлитных повторов в центромерных и околотромерных областях связывают с правильным расхождением хромосом при репликации [18]. Метилирование же мобильных элементов, транспозонов, ретротранспозонов направлено на подавление их транскрипции. Деметилирование этих повторов приводит к их активной транскрипции, транспозиции, что влияет на возникновение нестабильности генома. Возможно, этот механизм избыточен, так как для эволюционно ранних транспозонов, ретротранспозонов, характерно наличие мутаций или делеций в последовательностях, кодирующих транспозазу, что приводит к образованию неактивной формы белка.

В геноме млекопитающих есть CpG-динуклеотиды, которые избегают метилирования. Такие CpG обычно входят в состав так называемых CpG-островков. CpG-островок – участок ДНК, в котором уровень GC-пар превышает 50%, а соотношение ожидаемое/наблюдаемое количество CpG больше 0.6. Примерно 60% промоторов содержат CpG-островки. Для этих участков, независимо от активности промотора, характерна модификация активного хроматина – триметилирование четвертого остатка лизина в молекуле гистона H3 (H3K4me3) [19]. Активный хроматин представляет собой участок ДНК, в котором такие модификации гистонов, как ацетилирование H3K4me3, приводят к доступности ДНК для активаторов транскрипции. Наличие H3K4me3 в промоторных областях неактивных генов способствует инициации транскрипции, но не синтезу мРНК. При этом существует целый ряд промоторов неактивных генов, содержащих неметилированные CpG-островки, в которых не детектируется H3K4me3. Чаще всего к этому классу относятся гены, расположенные в кластерах с тремя или более гомологичными генами, кодирующими обонятельные рецепторы, кератины, апополипротеины, интерлейкины и антигены лейкоцитов [19]. Метилирование CpG-островков в промоторных районах коррелирует с подавлением транскрипции и может возникать как в норме, например, при развитии организма, так и при патологии [20]. Так, для злокачественной трансформации клеток и метастазирования характерно гиперметилирование CpG-островков в промоторах генов-онкосупрессоров, белков, участвующих в клеточной адгезии, в репарации

ДНК. В большинстве случаев гиперметилирование CpG-островков в промоторах приводит к подавлению транскрипции. Однако отметим, что в опухолях гиперметилирование может затрагивать промоторы генов, транскрипционно неактивных в данной ткани в норме, то есть их гиперметилирование не влияет на подавление экспрессии, а скорее закрепляет неактивный статус [21].

Промоторы, содержащие небольшое количество CpG-динуклеотидов, характерны для тканеспецифических генов и генов, вовлеченных в развитие организма. Метилирование таких промоторов не всегда коррелирует с подавлением транскрипции [22]. При сравнительном анализе клеток мозга и сетчатки было найдено, что метилирование 66% дифференциально метилированных промоторов отрицательно коррелирует с транскрипцией. Таким образом, метилирование этих промоторов соответствует подавлению транскрипции. В то же время для 34% транскрипционно активных генов наблюдалось метилирование их промоторов [22].

CpG-островки, которые не пересекаются с промоторными участками, называются орфанными, или сиротскими. Количество орфанных CpG-островков примерно в 2 раза меньше, чем промоторных. Орфанные CpG-островки часто содержат модификацию активного хроматина H3K4me3 и могут давать начало новым транскриптам [23]. Во время развития организма многие орфанные CpG-островки подвергаются метилированию, теряя модификации активного хроматина. Метилирование орфанного CpG-островка, расположенного внутри гена, препятствует возникновению сайтов инициации транскрипции внутри гена и коррелирует с активной транскрипцией [24]. Метилирование внутри генов может предотвращать связывание белков Polycomb репрессорного комплекса PRC2, что также способствует активной транскрипции [25]. Около 90% орфанных CpG-островков могут выступать в роли тканеспецифических энхансеров [26]. Присутствие CpG-островка усиливает регуляторную активность энхансеров [27]. Активные энхансеры, содержащие орфанные CpG-островки, гипометилированы, в то время как классические энхансеры, работающие во всех типах тканей, имеют переменное метилирование [27] (рис. 2Б).

Построенные карты метилирования всей геномной ДНК в различных типах клеток, наряду с информацией об активности регуляторных элементов, позволяют рассматривать метилирование ДНК как инструмент регуляции транскрипционной активности при коррекции или для определения различных патогенетических состояний, связанных с изменением метилирования ДНК.

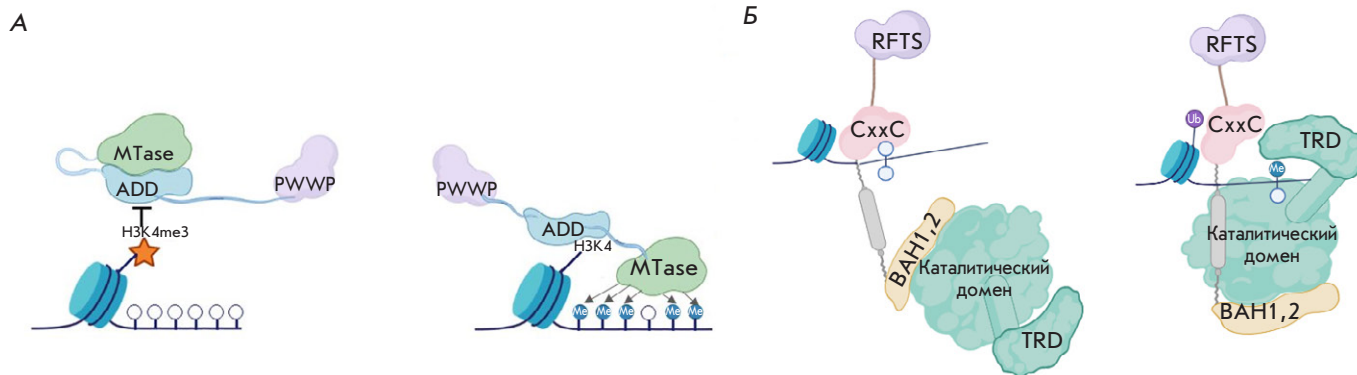


Рис. 3. Схема связывания DNMT3a/3b с немодифицированным H3K4 (A), наличие H3K4me3 препятствует связыванию ADD-домена с ДНК, что приводит к аутоингибированию фермента; DNMT1 с ДНК (Б), взаимодействие с неметилированной ДНК приводит к ингибированию каталитического домена [29, 30]

2. ГОМЕОСТАЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Гомеостаз метилирования ДНК основан на сложной регуляторной сети, уравнивающей метилирование и деметилирование. Основные механизмы, поддерживающие гомеостаз метилирования ДНК при пролиферации, дифференцировке клеток, представляют собой 1) пассивное деметилирование всего генома и поддержание профиля его метилирования DNMT1 при репликации; 2) направленное *de novo* метилирование и активное деметилирование отдельных участков. В данной главе мы рассмотрим факторы, вовлеченные в гомеостаз метилирования ДНК.

2.1. Поддержание участков ДНК в неметилированном состоянии

Около 20% CpG-динуклеотидов, большинство из которых расположены в CpG-островках, избегают метилирования. К основным факторам, препятствующим их метилированию, относятся модификации гистонов, взаимодействие ДНК с определенными факторами транскрипции (ТФ), первичная и вторичная структура ДНК.

2.1.1. Триметилирование четвертого лизина H3.

Одна из причин устойчивости CpG-островков к *de novo* метилированию вне зависимости от того, расположены они в транскрипционно активном регионе или нет, заключается в наличии в них триметилированного H3K4. H3K4me3 препятствует привлечению к ДНК *de novo* ДНК-метилтрансфераз DNMT3a/3b и их регулятора DNMT3L, который сам по себе не обладает каталитической активностью [28]. В состав ДНК-метилтрансфераз DNMT3a/3b входят каталитический домен, обладающий метилтрансферазной активностью (MTase), домены ADD и PWWP,

участвующие в связывании с хроматином. В несвязанном с ДНК состоянии ДНК-метилтрансферазы неактивны, поскольку подвергаются аутоингибированию: ADD-домен взаимодействует с каталитическим доменом, препятствуя его активности (рис. 3). ADD-домен не может взаимодействовать с H3K4me3. При этом немодифицированный H3K4 взаимодействует с ADD-доменом DNMT3a/3b, нарушая связывание ADD с каталитическим доменом и способствуя проявлению метилтрансферазной активности [28, 29]. Таким образом, метилирование ДНК и метилирование H3K4 являются взаимно исключательными событиями (рис. 3А).

Другая ситуация наблюдается для поддерживающей ДНК-метилтрансферазы DNMT1. DNMT1 локализуется в промоторных участках, содержащих неметилированные CpG-островки, не принимая участие в их метилировании. В состав DNMT1 входят домены RFTS (replication foci-targeting sequence), ZF-CxxC, два BAN- (bromo-adjacent homology) домена и каталитический домен. CxxC-домен DNMT1 может связываться с последовательностями, содержащими неметилированные CpG-динуклеотиды. При этом BAN1-домен физически препятствует взаимодействию каталитического домена и ДНК, предотвращая *de novo* метилирование (рис. 3Б) [30].

Характерная особенность CpG-островков – способность связываться с ТФ и ферментами, содержащими домен ZF-CxxC (CFP1, MLL1/2, KDM2A/2B, TET1/TET3, DNMT1) [31]. Многие из этих факторов связывают или сами являются гистон-метилтрансферазами, модифицирующими H3K4, что препятствует привлечению ДНК-метилтрансфераз. Отметим, что чем менее активен промотор гена, тем более важно присутствие H3K4me3 для поддержания его неметилированного состояния [32, 33].

2.1.2. ТЕТ-диоксигеназы. ТЕТ-диоксигеназы (ten-eleven translocation) – это ферменты, которые окисляют метилцитозин для дальнейшей эксцизионной репарации. ТЕТ-белки привлекаются к ДНК различными способами. ТЕТ связываются с CpG-островками через свой SxxC-домен или другие факторы транскрипции, содержащие SxxC-домен. При этом ТЕТ-белки могут привлекаться к ДНК, независимо от CpG-островков через белки-посредники, такие, как Klf4, Nanog, REST, GADD45, SEBP α и др., например, ТЕТ1 и ТЕТ2 привлекаются к ДНК, связываясь с ТФ Nanog, что приводит к деметилированию регуляторных областей генов, вовлеченных в поддержание плюрипотентного состояния клеток [34]. Отметим, что ТЕТ-белки, как и многие SxxC-содержащие белки, влияют на триметилирование H3K4. ТЕТ взаимодействуют с OGT-трансферазой (O-GLCNAc transferase), которая в свою очередь образует комплекс с SET1 и MLL гистонметилтрансферазами, триметилирующими H3K4 [35].

Большую роль в деметилировании ДНК ТЕТ-диоксигеназами играют так называемые факторы-пионеры [36]. Факторы-пионеры взаимодействуют с закрытым, неактивным хроматином, изменяя его доступность для активаторов транскрипции. Наибольшую активность факторы-пионеры проявляют при развитии организма, созревании иммунной системы, онкотрансформации клеток, репрограммировании соматических клеток. Факторами-пионерами являются FOXA1, FOXO, Sox, Pax, GATA, Oct4, PU1, SEBP α и другие ТФ [37]. Основной особенностью факторов-пионеров является способность узнавать не просто последовательность ДНК, а участок ДНК в контексте нуклеосом [38, 39]. Это объясняет, почему метилирование ДНК не всегда важно для привлечения факторов-пионеров. Действительно, многие факторы-пионеры имеют участки узнавания, не содержащие CpG-динуклеотиды, либо они нечувствительны к метилированию. К таким факторам можно отнести ASCL1, FOXA1 [40, 41]. Тем не менее, факторы-пионеры Oct4 и Klf4 взаимодействуют как с последовательностями, не содержащими CpG, так и с участками, в состав которых входят CpG. В последнем случае Oct4 и Klf4 связываются только с метилированными сайтами [42]. Среди факторов-пионеров, способных образовывать комплекс с ТЕТ-диоксигеназами, найдены Klf4, SEBP α и TFSP211 [37]. Показана функциональная значимость взаимодействия ТЕТ2 с Klf4 и SEBP при репрограммировании соматических клеток. Факторы-пионеры Klf4 и SEBP α привлекают диоксигеназу ТЕТ2 к метилированным энхансерным последовательностям, что приводит к их деметилированию и активации [37]. Причем в опре-

деленных областях хроматина, включая участки связывания Klf4, сначала снижается метилирование, а затем происходит ремоделирование хроматина. Клетки с нокаутом гена *TET2* не подвергаются репрограммированию [37]. Таким образом, деметилирование ДНК ферментами ТЕТ является одним из ключевых этапов репрограммирования клеток.

Несмотря на то что белки ТЕТ вовлечены в деметилирование многих участков, их удаление не приводит к катастрофическому изменению полного уровня метилирования ДНК. Основные изменения в метилировании ДНК при нокауте ТЕТ касаются дистальных регуляторных элементов, энхансерных последовательностей [43].

2.1.3. Вторичная структура ДНК. Одним из факторов, играющих роль в поддержании неметилированного состояния CpG-островков, является изменение конформации, вторичной структуры ДНК.

Один из таких факторов – R-петля, которая представляет собой гибрид РНК-ДНК и вытесненную нить ДНК. GADD45A, связываясь с R-петлей в промоторе гена опухолевого супрессора TCF21, привлекает ТЕТ1, что способствует локальному деметилированию данного участка [44]. Таким образом, вторичная структура ДНК может влиять на деметилирование ДНК за счет связывания с диоксигеназами ТЕТ.

G-квадруплексы также могут влиять на метилирование как CpG-островков, так и CpG-динуклеотидов, не входящих в островки. Известно, что регуляторные области эукариотических геномов, обогащенные GC-парами, способны изменять локальную конформацию ДНК, перестраиваясь в альтернативные структуры в виде G-квадруплексов (G4) [45]. G-квадруплексная (G4) вторичная структура ДНК формируется гуанинбогатыми последовательностями. Попарное хугстиновское взаимодействие гуанинов приводит к образованию гуаниновых квартетов, стопки таких квартетов, стабилизированных катионами калия, формируют ядро G4-структуры. Термодинамическая стабильность таких структур зависит от нуклеотидной последовательности и порой превышает стабильность двойной спирали ДНК. Существует несколько теоретических и экспериментальных подходов к определению потенциальных G4-участков. Стабильные G4, которые образуются в геномной ДНК в присутствии ионов калия, служат барьером для прохождения ДНК-полимеразы. Это зачастую затрудняет проведение ПЦР-амплификации областей генома, содержащих GC-богатые участки, потенциально склонных к образованию G4-структур [46]. Подход, основанный на высокопроизводитель-

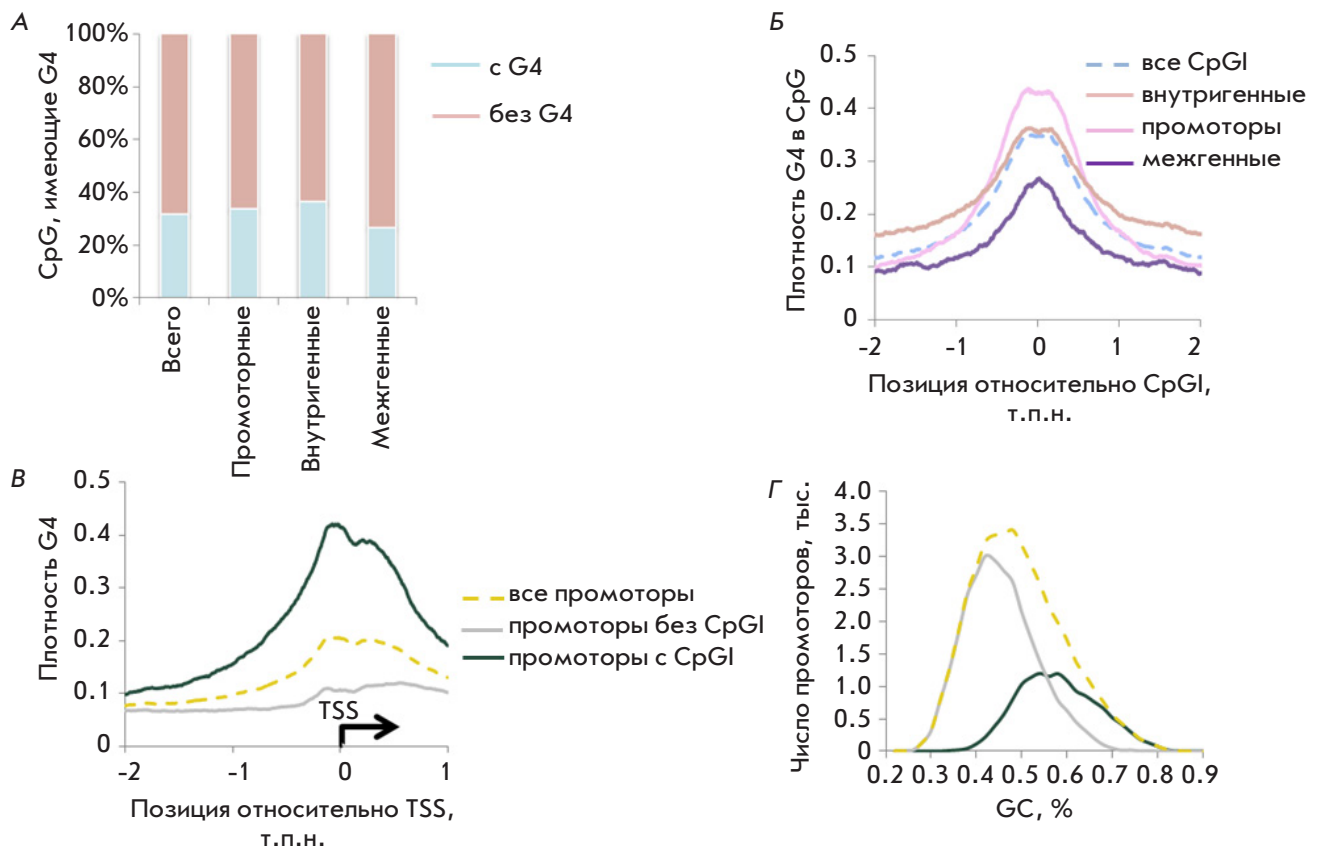


Рис. 4. Анализ распределения потенциальных G4-последовательностей в CpG-островках. А – доля CpG-островков с G4; Б – плотность распределения G4 в окрестностях CpG-островков в зависимости от локализации в геноме; В – плотность G4 и Г – GC-состав в промоторных участках в зависимости от наличия CpG-островков

ном секвенировании ошибок, возникающих в присутствии ионов калия, в настоящее время является лучшим экспериментальным предсказанием потенциала рефолдинга G4-областей геномной ДНК [47]. Изменение конформации ДНК влияет на ее физико-химические свойства и сродство разнообразных белков, специфичных к определенной нуклеотидной последовательности. Метилирование в CpG-контексте может изменять энергетический барьер для переходов между состоянием двойной спирали ДНК и образованием неканонических структур ДНК, таких, как G4 в частности [48]. Около 30% CpG-островков содержат нуклеотидные последовательности, способные образовывать G4-структуры (рис. 4А). Квадруплексными последовательностями наиболее обогащены внутригенные CpG-островки, в то время как вероятность встретить такие последовательности в межгенных CpG-островках снижается. Наибольшая плотность G4 детектируется в промоторных CpG-островках (рис. 4Б), где значительно превосходит среднюю плотность по всем промоторам (рис. 4В). Максимальная плотность G4

наблюдается вблизи сайта старта транскрипции (TSS). Снижение вероятности встретить G4 в промоторных областях без CpG-островков может быть связано с различием в GC-составе промоторов, пересекающихся с CpG-островками и расположенных вне их (рис. 4Г). Вероятность встретить потенциальный G4-квадруплекс в значительной степени зависит от GC-состава даже случайно сгенерированной последовательности нуклеотидов. Для случайной последовательности с GC-составом 40% вероятность встретить потенциальный G4 составляет около одного G4 на миллион пар оснований, в то время как увеличение GC-состава случайной последовательности до 70% повышает вероятность встречи G4 до одного на тысячу пар оснований [49]. В геномах высших организмов вероятность встретить G4-последовательность превышает случайную. Эти последовательности могут играть важную регуляторную роль, что подтверждается положительным отбором в процессах эволюции [50]. Наличие G4 в промоторах часто ассоциировано с подавлением транскрипции [51]. Тем не менее, в стволовых

клетках G4 детектируется на активных промоторах и на участках, взаимодействующих с ними, энхансерах, суперэнхансерах, участках связывания ТФ, которые определяют тип клетки. G4 найдены не только на активных регуляторных элементах, но и на участках с бивалентными модификациями хроматина, то есть содержащими как активные, так и неактивные модификации хроматина. При дифференцировке клеток снижение уровня детектируемых G4-структур коррелирует с появлением закрытого хроматина [48, 52]. Квадруплексные структуры могут взаимодействовать с ДНК-метилтрансферазами DNMT1, DNMT3A, DNMT3B *in vitro* [53, 54]. Действительно, неметилированные последовательности в CpG-островках, содержащие квадруплексы, обогащены участками связывания ДНК-метилтрансферазы DNMT1. При этом взаимодействие DNMT1 с G4 приводит к инактивации ее ДНК-метилтрансферазной активности [53]. Таким образом, формирование G4 препятствует метилированию ДНК. Это подтверждается корреляцией наличия стабильных квадруплексов, расположенных в открытом хроматине, с гипометилированием ДНК. Такая корреляция характерна, в первую очередь, для CG-бедных участков. Для CpG-островков, расположенных в закрытом хроматине, содержащих квадруплексы, также характерен более низкий уровень метилирования по сравнению с участками без квадруплексов [55].

На данный момент не ясно, какая из активностей DNMT1: связывание с неметилированными CpG, при котором расположение доменов препятствует каталитической активности, или взаимодействие с неканоническими структурами ДНК, является ключевой в поддержании неметилированного статуса CpG-островков. Отметим, что в геноме существуют участки, где DNMT1, связываясь с ДНК, проявляет *de novo* метилтрансферазную активность. К таким участкам относятся LTR-ретротранспозоны, обогащенные H3K9me3 и TRIM28. Здесь *de novo* активность DNMT1 регулируется UHRF1 [56]. Таким образом, для проявления *de novo* активности DNMT1 важно не только пространственное расположение ее доменов, но и наличие кофакторов.

2.1.4. Конкуренция транскрипционных факторов с ДНК-метилтрансферазами. ТФ, связываясь с ДНК, могут препятствовать привлечению ДНК-метилтрансфераз, защищая таким образом ДНК от метилирования. Классическим примером такой конкуренции между связыванием ТФ и ДНК-метилтрансфераз является Sp1. Sp1 взаимодействует с неметилированными последовательностями CCGCCC, которыми обогащены

CpG-островки, и препятствует привлечению ДНК-метилтрансфераз [57]. Мутация сайта связывания Sp1 приводит к увеличению метилирования данного участка и снижению транскрипции [58]. Таким образом, Sp1 рассматривается как ТФ, который предотвращает метилирование CpG-островков. Однако отсутствие современного полногеномного анализа метилирования ДНК при удалении Sp1 не позволяет подтвердить необходимость Sp1 для поддержания неметилированного статуса многих CpG-островков.

Еще один фактор, влияющий на поддержание неметилированного состояния ДНК, – CTCF. CTCF идентифицирован как ТФ, который связывается с неметилированными последовательностями и может действовать и как активатор, и как репрессор транскрипции. CTCF выполняет также роль инсультатора, блокируя действие энхансеров на промоторы, он принимает участие в формировании структуры хроматина [59]. В импринтированных локусах CTCF связывается с неметилированным аллелем, предотвращая взаимодействие энхансера с промотором. Связывание CTCF с неметилированным материнским аллелем локуса H19/Igf2 важно не только для взаимодействия энхансера с промотором, оно влияет и на поддержание материнского аллеля в неметилированном состоянии. Мутации сайтов связывания CTCF в этом локусе приводили к увеличению уровня метилирования материнского аллеля после оплодотворения яйцеклетки, но в герминальных клетках метилирование локуса H19/Igf2 не нарушено [60]. Снижение уровня самого CTCF в ооците с помощью РНК-интерференции (RNAi) приводило к увеличению уровня метилирования на материнском аллеле в данном локусе [61, 62]. Таким образом, CTCF важен для поддержания неметилированного состояния материнского аллеля локуса H19/Igf2. Потеря CTCF в раковых клетках приводит также к гиперметилированию участков связывания белка [63]. Согласно данным полногеномного анализа, в стволовых клетках мыши CTCF локализуется в основном на неметилированных или слабо метилированных участках. Тем не менее, часть участков связывания CTCF высокометилирована [64]. Оказалось, что метилирование препятствует взаимодействию CTCF с ДНК, только если расположено в определенных позициях сайта связывания [65]. Мутация метилированных участков связывания CTCF не приводит к изменению уровня их метилирования, хотя наличие CTCF на метилированных последовательностях коррелирует с более низким уровнем метилирования по сравнению с участками, не содержащими сайты узнавания CTCF [66]. Таким образом, взаимодействие CTCF с метилированными

последовательностями не связано с поддержанием метилирования этих участков. Отметим, что в клетках с нокаутом генов ДНК-метилтрансфераз, в которых снижен уровень метилирования ДНК, не наблюдалось перераспределения участков связывания CTCF на деметилированные участки [67]. Таким образом, само метилирование ДНК не является препятствием для связывания CTCF. В импринтированном локусе H19/Igf2 также найдены участки, с которыми CTCF может связываться *in vitro* вне зависимости от уровня их метилирования. Возможно CTCF не детектируется на метилированном аллеле *in vivo* из-за конкурентного связывания метил-чувствительных белков [68]. Таким образом, CTCF проявляет различную ДНК-связывающую активность, но связываясь с неметилированными последовательностями, поддерживает низкий уровень их метилирования.

Поиск факторов, которые по аналогии с CTCF или Sp1 защищают ДНК от гиперметилирования, позволит исследовать новые механизмы поддержания ДНК в неметилированном состоянии и рассматривать их как мишень для влияния на метилирование ДНК и транскрипционную активность генов при состояниях, связанных с нарушением метилирования ДНК.

2.2. Поддержание участков ДНК в метилированном состоянии

В этой главе мы рассмотрим процессы установления и поддержания метилирования ДНК, что важно для различных повторяющихся последовательностей, импринтированных участков, регуляторных элементов. В *de novo* метилирование ДНК вовлечены метилтрансферазы DNMT3a и DNMT3b, хотя, как отмечено ранее, DNMT1 также может проявлять *de novo* активность. ДНК-метилтрансфераза DNMT3a отвечает за установление метилирования в повторяющихся последовательностях, регуляторных элементах и телах генов, служащих мишенями белков Polycomb. DNMT3b важен для установления метилирования в области сателлитных повторов, последовательностей на инактивированной X-хромосоме [3, 4]. Для привлечения ДНК-метилтрансфераз важны модификации гистонов, взаимодействие с факторами транскрипции. В роли посредников, регулирующих связывание *de novo* метилтрансфераз с ДНК, могут также выступать длинные некодирующие РНК, PIWI-взаимодействующие некодирующие РНК [69].

2.2.1. Модификации гистонов. Привлечение DNMT3 к ДНК осуществляется с использованием разных механизмов, включающих модификации

гистонов. Как уже говорили ранее, немодифицированный H3K4 способствует связыванию ДНК-метилтрансфераз через ADD-домен и активации их каталитической активности. Также метилирование ДНК регулируется модификациями H3K36me3/me2 гистонов. DNMT3 метилируют CpG-богатые внутригенные последовательности активно транскрибируемых генов в участках, для которых характерно наличие гистонов с модификацией H3K36me3. В межгенных участках для связывания и метилирования ДНК DNMT3a необходим H3K36me2. За взаимодействия с H3K36me2/me3 отвечает PWWP-домен DNMT3 [70, 71].

Связывание DNMT3 с гетерохроматином, с повторяющимися последовательностями опосредовано метилированием H3K9. ДНК-метилтрансферазы привлекаются к ДНК за счет взаимодействия как с гистонметилтрансферазами, метилирующими H3K9 (Suv39h1/2, G9a/GLP, Setdb1), так и за счет связывания с белками HP1 α и HP1 β , узнающими метилированный H3K9 [72].

2.2.2. Транскрипционные факторы привлекают DNMT к ДНК. DNMT3a и DNMT3b не являются взаимозаменяемыми и мутации в них или делеции каждого из них приводят к изменению метилирования специфичных участков наряду с общими [3, 4]. Это связано с тем, что они могут привлекаться к ДНК за счет взаимодействия с различными ТФ. На данный момент открыто множество ТФ, способных взаимодействовать с обеими ДНК-метилтрансферазами или только с одной из них, или входят в комплекс с ними, но не взаимодействуют напрямую [73]. Интересно, что эти ТФ влияют лишь на метилирование ограниченного количества прямых мишеней, а во многих случаях лишь на единичные гены-мишени. Это позволяет рассматривать такие ТФ в качестве мишеней для точечной регуляции метилирования их генов-мишеней. Рассмотрим несколько таких факторов.

GCNF

Фактор GCNF (germ nuclear factor) участвует в установлении и поддержании метилирования различных промоторных участков за счет прямого взаимодействия с метилтрансферазами DNMT3a/3b [74]. Также GCNF может опосредованно привлекать метилтрансферазы DNMT3. При дифференцировке стволовых клеток GCNF связывается с промотором гена *Oct4* и взаимодействует с MBD2 и MBD3, которые, в свою очередь, входят в комплекс с DNMT3. Это приводит к метилированию промотора *Oct4* и подавлению его транскрипции в дифференцированных клетках. При дифференцировке стволовых

клеток с нокаутом GCNF MBD2/MBD3 не могут связаться с промотором *Oct4*, и ген продолжает активно работать [75]. Способность GCNF регулировать метилирование промотора *Oct4* может быть использовано для анализа статуса плюрипотентности клеток. Так, при репрограммировании соматических клеток наблюдается деметилирование промотора гена *GCNF*, что позволяет ему активироваться при дифференцировке клеток и эффективно подавлять транскрипцию гена *Oct4*. Такие плюрипотентные клетки являются зрелыми. Однако если в них репрограммирование прошло не до конца, то метилирование промотора *GCNF* сохраняется, он не может активироваться при дифференцировке, и *Oct4* будет оставаться активным в дифференцированных клетках, что делает клетки потенциально онкогенными. Таким образом, GCNF, а точнее метилирование его промотора, может рассматриваться в качестве маркера зрелости плюрипотентных клеток.

Kaiso (ZBTB33)

Белки, содержащие домен типа цинковых пальцев, часто выступают не только в роли метил-ДНК-связывающих белков, но и как факторы, влияющие на гомеостаз метилирования ДНК [42, 76]. Характерной чертой этих белков является способность узнавать не только метилированные, но и неметилированные участки, которые зачастую отличаются по нуклеотидной последовательности. Структура цинковых пальцев позволяет специфично распознавать метилированные CG, чаще всего в определенном контексте для каждого ТФ [77]. Первыми белками, содержащими домен цинковые пальцы, взаимодействующие с метилированными последовательностями, были Kaiso-подобные белки: Kaiso (ZBTB33), ZBTB4 и ZBTB38. Помимо цинковых пальцев в их состав на N-конце входит домен VTB/POZ, отвечающий за белок-белковое взаимодействие [78–80]. Позднее нашли и другие белки с цинковыми пальцами, взаимодействующие с метилированной ДНК, в том числе Znf57, CTCF, Klf4, Wt1, Egr1. Наибольшее сродство к метилированной ДНК имеют Kaiso и Znf57. Они связываются с метилированными последовательностями более чем в 20 раз лучше, чем с неметилированными последовательностями, в то время как чувствительность остальных белков с цинковыми пальцами к метилированным последовательностям всего в 1.5–3 раза выше или такая же, как у неметилированной последовательности [81, 82].

Kaiso связывается с метилированными последовательностями и с участками, содержащими CTCNA [78, 80]. Этот белок может действовать как репрессор транскрипции за счет N-концевого

VTB/POZ-домена, привлекая корепрессорные комплексы NcoR, SMRT, и как активатор транскрипции [83–85]. Одна из мишеней Kaiso – импринтированный локус H19/Igf2. Kaiso связывается с метилированным аллелем этого локуса, причем удаление Kaiso приводит к снижению метилирования ICR1 в этом локусе [86, 87]. Возможно, снижение метилирования при удалении Kaiso основано на конкуренции с CTCF, который может связываться с метилированными последовательностями и приводить к их деметилированию. При нокауте гена Kaiso наблюдается снижение метилирования в промоторе гена *Oct4* в эмбриональных фибробластах мыши и в промоторе гена *TRIM25* в эмбриональных клетках почки человека, в телах генов, энхансерах и участках, не содержащих гистоновые модификации [83, 88, 89]. Показано, что деметилирование промотора гена *TRIM25*, вызванное удалением Kaiso, обратимо, оно восстанавливается при экспрессии экзогенного Kaiso, способного входить в комплекс с DNMT3a/3b [83, 89]. Отметим, что в клетках рака почки человека удаление Kaiso также приводит к небольшому увеличению уровня метилирования всего генома. Подобное равномерное распределение может быть связано со снижением транскрипции гена диоксигеназы TET1, то есть Kaiso может влиять на изменение уровня метилирования ДНК в обоих направлениях. Таким образом, Kaiso не только поддерживает нужный уровень метилирования, но и участвует в установлении метилирования различных локусов, взаимодействуя с ДНК-метилтрансферазами 3a и 3b [89].

Роль Kaiso в регуляции метилирования ДНК может быть связана также с его способностью взаимодействовать с убиквитин-подобными белками SUMO1,2,3. Белки SUMO ковалентно связываются с остатками лизина в белках-мишенях, как и убиквитин. При этом сумоилирование обычно не приводит к деградации белков, что наблюдается при убиквитинировании, а влияет на клеточную локализацию, на активность и взаимодействие с другими факторами. Сумоилирование Kaiso влияет на его транскрипционные свойства [83]. Наличие в аминокислотной последовательности Kaiso шести участков, взаимодействующих с SUMO (SIM-SUMO interacting motifs), и нековалентное взаимодействие Kaiso с SUMO1 позволяет предположить, что Kaiso может выступать в роли E3-лигазы SUMO. Участки SIM представляют собой последовательность из нескольких гидрофобных аминокислотных остатков, окруженных остатками серина или кислых аминокислот. Так называемые неканонические SUMO E3-лигазы содержат SIM и нековалентно взаимодействуют с SUMO [90]. Сумоилирование многих

белков происходит в так называемых PML и/или PcG-тельцах [90, 91]. Kaiso локализуется в PcG-тельцах при экспрессии экзогенного SUMO [92]. Это позволяет предположить, что Kaiso не только участвует в регуляции транскрипции и поддержании уровня метилирования ДНК, но и может участвовать в регуляции активности других факторов, влияя на их посттрансляционные модификации. Например, сумоилирование ДНК-метилтрансфераз увеличивает их каталитическую активность, способствуя повышению уровня метилирования ДНК [93]. С другой стороны, сумоилирование белка системы эксцизионной репарации XRC11 необходимо для эффективного удаления 5-формил- и 5-карбокситозинон при дифференцировке стволовых клеток, а значит, для эффективного деметилирования ДНК [94]. Поэтому изучение Kaiso с точки зрения E3-лигазы SUMO, поиск его потенциальных мишеней позволят выявить новые пути регуляции активности различных факторов, в том числе белков, влияющих на уровень метилирования ДНК.

Znf57

В отличие от Kaiso, Znf57 содержит на N-конце домен KRAB (Krueppel-associated box). Связываясь с метилированными последовательностями, Znf57, используя KRAB-домен, привлекает корепрессор TRIM28 (KAP1), который формирует комплекс с H3K9 гистонметилтрансферазой SETDB1 и ДНК-метилтрансферазами – как поддерживающей DNMT1, так и с *de novo* DNMT3a/3b [95]. Такой репрессорный комплекс формируется в области транспозонов, импринтированных локусов, на неактивных энхансерах [96, 97]. Удаление Znf57 приводит к деметилированию импринтированных локусов и к эмбриональной гибели [96]. Отметим, что Znf57 отвечает за поддержание уровня метилирования, но не за его установление.

UHRF1

UHRF1 играет ключевую роль в поддержании метилирования ДНК при репликации. Этим объясняется профиль его экспрессии: UHRF1 детектируется только в активно делящихся клетках (например, в клетках костного мозга), в которых необходимо устанавливать метилирование ДНК на дочерней цепи при репликации, и не детектируется в терминально дифференцированных клетках (нейроны, гепатоциты). UHRF1 связывается с метилированной и полуметилированной ДНК с помощью домена SRA (SET and RING-associated domain). В состав UHRF1 также входят несколько доменов, участвующих в белок-белковых взаимодействиях: UBL (ubiquitin-like domain), TTD (tandem tudor domain), PHD (plant

homeodomain), RING (really interesting new gene domain). Эти домены обеспечивают взаимодействие с поддерживающей ДНК-метилтрансферазой DNMT1, с PCNA, гистондеацетилазой HDAC1, гистонметилтрансферазами G9a и SUV39H1, с PARP1 и др. [98]. Связываясь с полуметилированной ДНК в ходе репликации, UHRF1 убиквитинирует H3K18 и H3K23, привлекает метилтрансферазу DNMT1 для установления профиля метилирования на дочерней цепи ДНК. Активность DNMT1 регулируется взаимодействием с H3K18ub и H3K23ub [99]. При патогенетических опухолевых состояниях UHRF1 может также влиять на установление метилирования промоторов ряда генов [100]. Удаление UHRF1 приводит к геномной нестабильности, остановке клеточного цикла в фазе G2/M, апоптозу. Также наблюдается отсутствие репарации двухцепочечных разрывов в клетке [101]. Таким образом, UHRF1 влияет на установление и поддержание метилирования ДНК.

MBD-белки

Среди белков, не только узнающих метилированную ДНК, но и способных влиять на метилирование участков связывания, найдены метил-ДНК-связывающие белки, содержащие MBD (methyl DNA binding domain). Большинство белков MBD вовлечены в формирование и функционирование нервной системы. Среди факторов, принадлежащих к этому семейству, только четыре (MBD1, MBD2, MBD4 и MeCP2) могут связываться с метилированной ДНК. Наибольшее сродство эти MBD-белки проявляют к метилированным CpG-островкам [102]. В большинстве случаев эти белки выступают в качестве интерпретаторов метилирования: привлекают корепрессоры либо конкурируют за связывание с ДНК с активаторами транскрипции. Однако в последнее время появляются работы, показывающие, что данные факторы могут влиять на установление и поддержание статуса метилирования ДНК. Показано, что нокаут MeCP2 приводит к появлению как гипо-, так и гиперметилированных участков в различных типах нейронов мыши [103]. Механизм влияния MBD белков на уровень метилирования не изучен. MBD1 регулирует метилирование промоторов генов рецептора серотонина Htr2c и фактора роста bFGF [104, 105]. Нокаут MBD1 приводит к реактивации Htr2c, что рассматривается как одна из причин отклонений в нейрогенезе в гиппокампе, нарушений при обучении и появления аутистических симптомов, связанных с изменением социального поведения, дефицитом внимания, нарушениями в активации серотонина в нокаутных животных [104]. Реактивация фактора роста bFGF при нокауте

MBD1 влияет на способность поддерживать плюрипотентное состояние стволовых клеток, регуляция которого важна для последующей дифференцировки в клетки нервной системы [105].

Таким образом, есть факторы, такие, как UHRF1, которые влияют на поддержание метилирования во всем геноме, и есть факторы (белки MBD, Kaiso, GCNF), регулирующие метилирование определенного спектра мишеней. Последние представляют особый интерес: поиск их участков связывания, метилирование которых изменяется при инактивации или мутациях данных факторов, позволит, варьируя их активность, влиять на уровень метилирования их мишеней. Интересно, что целевое изменение метилирования ДНК может также регулироваться модулированием активности ДНК-метилтрансфераз с помощью посттрансляционных модификаций: Kaiso является потенциальной E3-лигазой SUMO.

3. РЕДАКТИРОВАНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

Одним из способов изменения транскрипционной активности отдельных участков является изменение их метилирования с помощью современных методов редактирования ДНК. Таким образом можно менять активность промоторов, энхансеров. Для этого используют мутантную эндонуклеазу dCas9, не способную вносить разрывы в ДНК. Для гиперметилирования ДНК dCas9 соединяют с каталитическим доменом DNMT3, обладающим метилтрансферазной активностью, которую направляют на выбранный участок [106]. Вместо dCas9 применяют также TALEN и домен цинковых пальцев, но наиболее доступной остается система редактирования на основе dCas9. Основными проблемами при таком редактировании являются: 1) недостаточно высокий уровень метилирования, 2) деметилирование ДНК после определенного числа делений клетки. Для решения этих проблем к каталитическому домену DNMT3 добавляют DNMT3L, выступающий в роли кофактора, усиливающего метилирование ДНК. Поддержание высокого уровня метилирования при продолжительном делении клеток достигается также введением в клетки химерной конструкции dCas9-Ezh2 или dCas9-KRAB. Ezh2 триметилирует H3K27, KRAB-домен фактора Znf57 служит основой для сборки репрессорного комплекса, модифицирующего гистоны и метилирующего ДНК [107]. Необходимо также определить, какой из факторов, Ezh2 или KRAB, будет более эффективно подавлять транскрипционную активность целевого участка [107].

Для деметилирования ДНК dCas9 соединяют с каталитическим доменом белков TET [108]. Введение каталитического домена TET приводит не только к деметилированию, но и к образованию

5-гидроксиметилцитозина, который вносит свой вклад в привлечение ТФ [109]. Для более надежного деметилирования ДНК (без появления промежуточных форм цитозина) можно использовать dCas9 с каталитическим доменом ROS1 ДНК-гликозилазы *Arabidopsis* [110].

Главное преимущество редактирования метилирования ДНК по сравнению с редактированием ДНК состоит в том, что вносимые изменения не затрагивают нуклеотидную последовательность, изменяют лишь модификацию ДНК, которая является обратимой и позволяет редактировать практически любую последовательность в геноме.

4. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ СОСТОЯНИЯ

За последние годы была обнаружена взаимосвязь между механизмом регуляции метилирования ДНК и различными патогенетическими состояниями, особенно с онкотрансформацией клеток, развитием ревматоидного артрита и различных неврологических заболеваний [11, 111]. Можно выделить две категории клинической значимости изменений уровня метилирования ДНК. Первая включает случаи, когда метилирование ДНК может выступать в роли маркера развития патогенетических состояний. Вторая категория включает случаи, когда, изменяя уровень метилирования ДНК и активность метил-ДНК-связывающих белков, мы влияем на прогрессирование и течение болезни.

4.1. Метилирование ДНК как диагностический и прогностический маркер развития заболеваний

В качестве маркеров развития заболеваний выбирают участки ДНК, изменения в уровне метилирования которых детектируются как в поврежденном органе или ткани, так и в геномной ДНК крови, в ДНК из различных биологических жидкостей и в свободно циркулирующей ДНК. Подобранные маркеры, позволяющие с высокой вероятностью детектировать онкологическое заболевание на ранних стадиях, оценивать эффект терапии и выявлять рецидивы, а в некоторых случаях определять даже тип опухоли [112–114].

4.2. Метилирование ДНК как мишень для лечения различных патогенетических состояний

При онкотрансформации клеток часто детектируется гиперметилирование CpG-островков, расположенных в промоторах генов-супрессоров, что приводит к их инактивации. Активировать гены опухолевых супрессоров можно, хотя и не всегда, деметилируя их промоторы. Так, при лечении

острого миелоидного лейкоза и миелодисплазии применяют децитабин, действующим веществом в котором является 5-азацитидин, который снижает уровень метилирования ДНК. Однако этот препарат действует не на определенный ген, а на весь геном, приводя к его нестабильности, повреждению ДНК, что может иметь серьезные последствия для пациента [115]. Снизить уровень метилирования промоторов генов-супрессоров опухолевого роста можно путем инактивации каталитической активности, поддерживающей ДНК-метилтрансферазы. Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы DNMT1 RG108 и SG102 менее токсичны, чем 5-азацитидин, они не изменяют уровень метилирования сателлитных повторов, но влияют на деметилирование промоторов, в том числе некоторых промоторов генов-супрессоров [116, 117]. Основным ограничением применения таких ингибиторов является небольшое количество их мишеней – регуляторных элементов генов-супрессоров. Подавить каталитическую активность DNMT1 можно также с использованием олигонуклеотидов, формирующих квадруплексную структуру [53]. Предпринимаются попытки влиять на метилирование ДНК с помощью системы редактирования. Основная трудность этого подхода заключается в доставке dCas9 или его аналогов в нужные органы и ткани [118]. Одной из самых доступных мишеней являются клетки печени гепатоциты, в которые редактирующая система может быть доставлена инъекцией (например, в хвостовую вену мышей). Описаны попытки снижения уровня метилирования промотора гена *Fgf21* в печени мыши. *Fgf21* кодирует фактор, участвующий в метаболизме глюкозы и холестерина. Введение dCas9 с каталитическим доменом TET1 приводило к кратковременному снижению уровня метилирования промотора на шестой день после инъекции, а уже на 14-й день уровень метилирования восстанавливался [119]. Таким образом, пока не удастся добиться стабильного редактирования метилирования ДНК в живом организме.

4.3. Метил-ДНК-связывающие белки как новые терапевтические мишени

При выборе мишеней для терапии следует учитывать, насколько инактивация данного фактора критична для функционирования организма. Нокаут или мутации в метил-ДНК-связывающих белках MBD1, MBD2, MeCP2, Kaiso приводят, в первую очередь, к поведенческим отклонениям, не нарушающим жизненно важные процессы, которые могут быть восстановлены при возобновлении их экспрессии как в случае с MeCP2 [120, 121]. При этом при их инактивации общий уровень метилирования

меняется незначительно, не приводя к геномной нестабильности, реактивации повторяющихся элементов. Поэтому белки семейства MBD, Kaiso и его гомолог ZBTB4 имеют преимущество с точки зрения потенциальных мишеней. Поиск генов-мишеней данных факторов, ассоциированных с патогенетическими состояниями, является перспективным направлением.

Так, изучение участков связывания метил-ДНК-связывающих белков позволило выявить ген гамма-глобина как метил-зависимую мишень. В ходе развития человека происходит постепенное переключение форм гемоглобина: в эмбриональный период транскрибируется ген эпсилон-глобина, при рождении – гамма-глобина и во взрослом состоянии бета-глобина. У пациентов с серповидно-клеточной анемией и бета-талассемией нарушена экспрессия или мутирован ген бета-глобина, что приводит к тяжелым последствиям. Реактивация нормальной формы гамма-глобина позволила бы восстановить нормальный уровень гемоглобина в крови. Метил-ДНК-связывающий белок MBD2 регулирует привлечение корепрессорного комплекса NuRD к промотору гена гамма-глобина в клетках крови и поддерживает его в неактивном состоянии у взрослых [122]. Удаление MBD2 приводит к увеличению уровня экспрессии гена гамма-глобина в 20 раз [123]. Нарушая связывание MBD2 с корепрессорным комплексом NuRD и его компонентами с помощью ингибиторов, можно активировать транскрипцию гена гамма-глобина (рис. 5). На различных моделях показано, что инактивация только MBD2 не влияет на работу всего организма. У мышей с нокаутом гена *MBD2* наблюдается нарушение материнского поведения при уходе и вскармливании потомства [120, 124]. При этом удаление MBD2 не вызывает каких-либо более выраженных неврологических отклонений. Поэтому можно ожидать, что ингибирование MBD2 не приведет к серьезным побочным эффектам у человека. Таким образом, метил-ДНК-связывающую репрессорную активность MBD2 можно использовать для восстановления уровня гемоглобина у пациентов с серповидно-клеточной анемией и бета-талассемией. Однако не всегда необходимо отключать активность метил-ДНК-связывающих белков, как в случае, описанном выше. Так, мутации или инактивация гена метил-ДНК-связывающего белка MeCP2 приводят к развитию синдрома Ретта. Нокаут MeCP2 у мышей, как и мутации в этом гене у человека, вызывают неврологические изменения. Причем изменения, которые возникают в нервных клетках при мутации или удалении MeCP2, обратимы [125]. В число мутаций в MeCP2, идентифи-

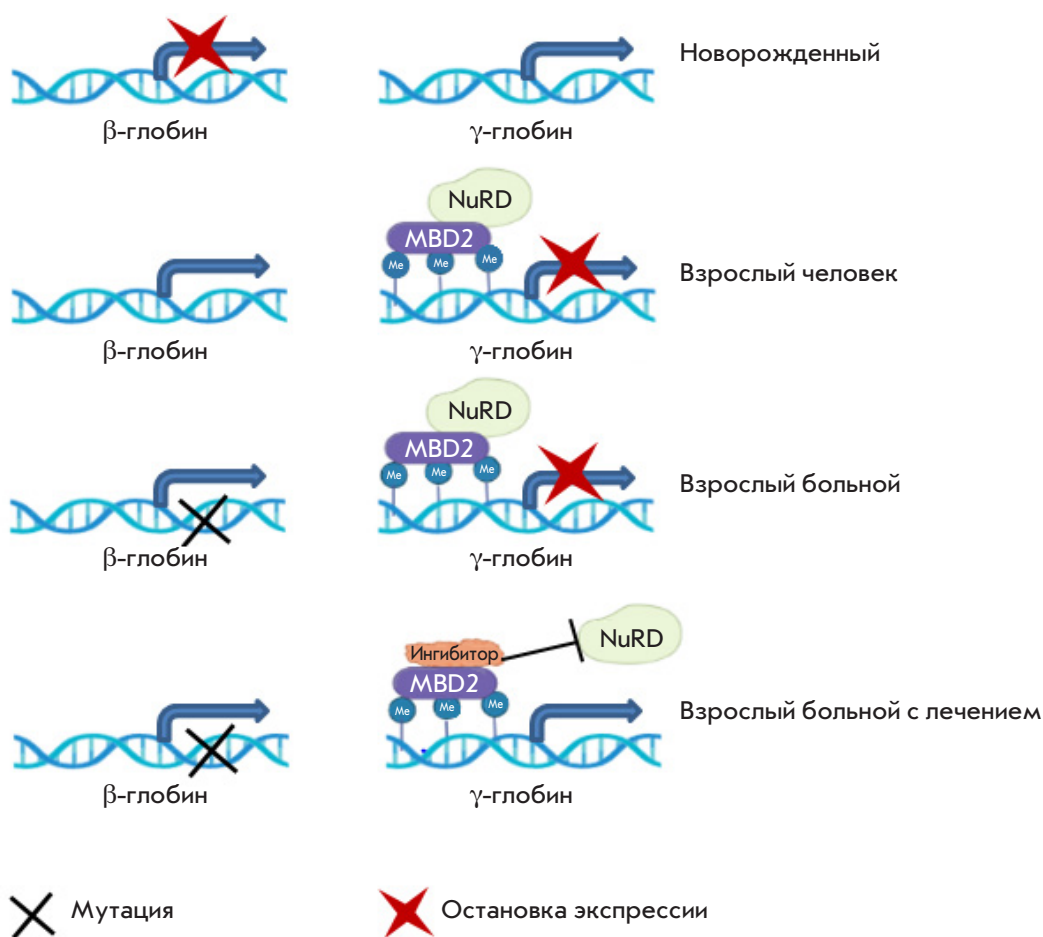


Рис. 5. Модель функционального значения взаимодействия белка MBD2 и репрессивного комплекса NuRD в регуляции гена гамма-глобина при бета-талассемии [122, 123]

цированных у пациентов с синдромом Ретта, входят и точечные мутации, которые приводят к деградации белка MeCP2, но не влияют на структуру его ДНК-связывающего и репрессорного доменов [126]. Такой белок, если его стабилизировать, будет способен выполнять свои функции [127]. Поиск малых молекул, связывающихся с местами убиквитинирования MeCP2, позволит предотвратить его убиквитинирование, последующую деградацию, восстановит функциональную активность белка.

Таким образом, поиск и характеристика участков связывания метил-ДНК-связывающих белков необходимы для выявления потенциальных мишеней, активность которых регулируется метилированием ДНК, формированием репрессорных комплексов. Дальнейший анализ различных патогенетических состояний, ассоциированных с генами-мишенями метил-ДНК-связывающих белков, позволяет рассматривать метил-ДНК-связывающие белки в качестве терапевтических мишеней. Исследование мутаций в метил-ДНК-связывающих белках позволяет понять, в каких случаях можно скомпенсировать

функциональные изменения, вызванные мутацией, а когда это невозможно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метилирование ДНК – регуляторный элемент, важный для экспрессии генов, стабилизации генома, инактивации повторяющихся последовательностей, установления импринтинга и X-инактивации. Методы современного полногеномного секвенирования позволили определить профиль метилирования ДНК во всем геноме, включая различные повторяющиеся последовательности. Это открыло новые возможности по определению и характеристике регуляторных элементов, работа которых может нарушаться при тех или иных патогенетических состояниях. На данный момент найдено большое число ТФ, которые участвуют в установлении, поддержании, деметилировании или интерпретации метилированной ДНК. Метилирование может как способствовать привлечению ТФ, так и наоборот препятствовать ему, то есть уровень метилирования ДНК влияет на выбор белковых факторов, которые

будут взаимодействовать с ДНК, переключая привлечение активаторов и репрессоров транскрипции к ДНК. Обнаружение новых факторов, зависящих от метилирования ДНК, изучение репрессорных или активирующих комплексов, в которые они входят, позволяют рассматривать эти факторы как новые терапевтические мишени, влияя на которые мы можем достигать более узконаправленного эффекта, чем ингибируя метилирование ДНК во всем геноме. Таким образом, исследование новых метил-ДНК-чувствительных белков позволит искать новые подходы, терапевтические мишени для лечения

различных патогенетических состояний, связанных с изменением регуляции или установления метилирования ДНК. ●

*Работа выполнена при поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 19-29-04139) (главы 3–4),
Российского научного фонда
(грант №19-74-30026) (главы 1–2).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lister R., Mukamel E.A., Nery J.R., Urich M., Puddifoot C.A., Johnson N.D., Lucero J., Huang Y., Dwork A.J., Schultz M.D., et al. // *Science*. 2013. V. 341. № 6146. 1237905.
- Gershman A., Sauria M.E.G., Guitart X., Vollger M.R., Hook P.W., Hoyt S.J., Jaun M., Shumate A., Razaghi R., Koren S., et al. // *Science*. 2022. V. 376. № 6588. eabj5089.
- Yagi M., Kabata M., Tanaka A., Ukai T., Ohta S., Nakabayashi K., Shimizu M., Hata K., Meissner A., Yamamoto T., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3199.
- Kato Y., Kaneda M., Hata K., Kumaki K., Hisano M., Kohara Y., Okano M., Li E., Nozaki M., Sasaki H. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 19. P. 2272–2280.
- Dodd T., Yan C., Kossmann B.R., Martin K., Ivanov I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 23. P. 5974–5979.
- Shi D.-Q., Ali I., Tang J., Yang W.-C. // *Front. Genet.* 2017. V. 8. P. 100.
- Velasco G., Grillo G., Touleimat N., Ferry L., Ivkovic I., Ribierre F., Deleuze J.-F., Chantalat S., Picard C., Francastel C. // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 14. P. 2409–2424.
- Sun Z., Wu Y., Ordog T., Baheti S., Nie J., Duan X., Hojo K., Kocher J.-P., Dyck P.J., Klein C.J. // *Epigenetics*. 2014. V. 9. № 8. P. 1184–1193.
- Wang X., Zhao C., Zhang C., Mei X., Song J., Sun Y., Wu Z., Shi W. // *Cell Commun. Signal*. 2019. V. 17. № 1. P. 1183–1193.
- Salameh Y., Bejaoui Y., Hajj E.N. // *Front. Genet.* 2020. V. 11. P. 171.
- Nishiyama A., Nakanishi M. // *Trends Genet.* 2021. V. 37. № 11. P. 1012–1027.
- Hwang J.-Y., Zukin R.S. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2018. V. 48. P. 193–200.
- Day J.J., Sweatt D.J. // *Nat. Neurosci.* 2010. P. 1319–1323.
- Rollins R.A., Haghghi F., Edwards J.R., Das R., Zhang M.Q., Ju J., Bestor T.H. // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 2. P. 157–163.
- Toubiana S., Larom G., Smoom R., Duszynski R.J., Godley L.A., Francastel C., Velasco G., Selig S. // *Hum. Mol. Genet.* 2020. V. 29. № 19. P. 3197–3210.
- Toubiana S., Velasco G., Chityat A., Kaindl A.M., Hershtig N., Tzur-Gilat A., Francastel C., Selig S. // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 20. P. 3568–3581.
- Rajshekar S., Yao J., Arnold P.K., Payne S.G., Zhang Y., Bowman T.V., Schmitz R.J., Edwards J.R., Goll M. // *eLife*. 2018. V. 7. e39658. doi: 10.7554/elife.39658
- Scelfo A., Fachinetti D. // *Cells*. 2019. V. 8. № 8. P. 912.
- Guenther M.G., Levine S.S., Boyer L.A., Jaenisch R., Young R.A. // *Cell*. 2007. V. 130. № 1. P. 77–88.
- Mohn F., Weber M., Rebhan M., Roloff T.C., Richter J., Stadler M.B., Bibel M., Schübeler D. // *Mol. Cell*. 2008. V. 30. № 6. P. 755–766.
- Sproul D., Nestor C., Culley J., Dickson J.H., Dixon M., Harrison D.J., Meehan R.R., Sims A.H., Ramsahoye B.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 4364–4369.
- Wan J., Oliver V.F., Wang G., Zhu H., Zack D.J., Merbs S.L., Qian J. // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. № 1. P. 49.
- Illingworth R.S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., Kerr A.R.W., James K.D., Turner D.J., Smith C., Harrison D.J., Andrews R., Bird A.P., et al. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. № 9. e1001134.
- Jeziorska D.M., Murray R.J.S., De Gobbi M., Gaentzsch R., Garrick D., Ayyub H., Chen T., Li E., Telenius J., Lynch P.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 36. P. E7526–E7535.
- Wu H., Coskun V., Tao J., Xie W., Ge W., Yoshikawa K., Li E., Zhang Y., Sun Y.E. // *Science*. 2010. V. 329. № 5990. P. 444–448.
- Bell J.S.K., Vertino P.M. // *Epigenetics*. 2017. V. 12. № 6. P. 449–464.
- Pachano T., Sánchez-Gaya V., Ealo T., Mariner-Faulí M., Bleckwehl T., Asenjo H.G., Respuela P., Cruz-Molina S., Muñoz-San Martín M., Haro E., et al. // *Nat. Genet.* 2021. V. 53. № 7. P. 1036–1049.
- Zhang Y., Jurkowska R., Soeroes S., Rajavelu A., Dhayalan A., Bock I., Rathert P., Brandt O., Reinhardt R., Fischle W., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 13. P. 4246–4253.
- Otani J., Nankumo T., Arita K., Inamoto S., Ariyoshi M., Shirakawa M. // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. № 11. P. 1235–1241.
- Zhang Z.-M., Liu S., Lin K., Luo Y., Perry J.J., Wang Y., Song J. // *J. Mol. Biol.* 2015. V. 427. № 15. P. 2520–2531.
- Long H.K., Blackledge N.P., Klose R.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 3. P. 727–740.
- Brown D.A., Di Cerbo V., Feldmann A., Ahn J., Ito S., Blackledge N.P., Nakayama M., McClellan M., Dimitrova E., Turberfield A.H., et al. // *Cell Rep.* 2017. V. 20. № 10. P. 2313–2327.
- Clouaire T., Webb S., Skene P., Illingworth R., Kerr A., Andrews R., Lee J.-H., Skalnik D., Bird A. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 15. P. 1714–1728.
- Costa Y., Ding J., Theunissen T.W., Faiola F., Hore T.A., Shliha P.V., Fidalgo M., Saunders A., Lawrence M., Dietmann S., et al. // *Nature*. 2013. V. 495. P. 370–374.
- Deplur R., Delatte B., Schwinn M.K., Defrance M., Méndez J., Murphy N., Dawson M.A., Volkmar M., Putmans P., Calonne E., et al. // *EMBO J.* 2013. V. 32. № 5. P. 645–655.

36. Sardina J.L., Collombet S., Tian T.V., Gómez A., Di Stefano B., Berenguer C., Brumbaugh J., Stadhouders R., Segura-Morales C., Gut M., et al. // *Cell Stem Cell*. 2018. V. 23. № 6. P. 727–741.e9.
37. Fernandez Garcia M., Moore C.D., Schulz K.N., Alberto O., Donague G., Harrison M.M., Zhu H., Zaret K.S. // *Mol. Cell*. 2019. V. 75. № 5. P. 921–932.e6.
38. Michael A.K., Grand R.S., Isbel L., Cavadini S., Kozicka Z., Kempf G., Bunker R.D., Schenk A.D., Graff-Meyer A., Pathare G.R., et al. // *Science*. 2020. V. 368. № 6498. P. 1460–1465.
39. Donovan B.T., Chen H., Jipa C., Bai L., Poirier M.G. // *Elife*. 2019. V. 8. № 7. e43008.
40. VandenBosch L.S., Wohl S.G., Wilken M.S., Hooper M., Finkbeiner C., Cox K., Chipman L., Reh T.A. // *Sci. Rep.* 2020. V. 1. P. 13615.
41. Metzakopian E., Bouhali K., Alvarez-Saavedra M., Whitsett J.A., Picketts D.J., Ang S.-L. // *Development*. 2015. V. 142. № 7. P. 1315–1324.
42. Yin Y., Morgunova E., Jolma A., Kaasinen E., Sahu B., Khund-Sayeed S., Das P.K., Kivioja T., Dave K., Zhong F., et al. // *Science*. 2017. V. 356. № 6337. aaj2239.
43. Lu F., Liu Y., Jiang L., Yamaguchi S., Zhang Y. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. № 19. P. 2103–2119.
44. Arab K., Karaulanov E., Musheev M., Trnka P., Schäfer A., Grummt I., Niehrs C. // *Nat. Genet.* 2019. V. 51. P. 217–223.
45. Marsico G., Chambers V.S., Sahakyan A.B., McCauley P., Boutell J.M., Antonio M.D., Balasubramanian S. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 8. P. 3862–3874.
46. Чашина Г.В., Бениаминов А.Д., Калужный Д.Н. // *Биохимия*. 2019. Т. 84. № 5. С. 730–738.
47. Chambers V.S., Marsico G., Boutell J.M., Di Antonio M., Smith G.P., Balasubramanian S. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 8. P. 877–881.
48. Isaakova E., Varizhuk A., Pozmogova G. // *Signif. Bioeng. Biosci.* 2018. V. 1. № 3. P. 1–7.
49. Chashchina G.V., Shchyolkina A.K., Kolosov S.V., Beniaminov A.D., Kaluzhny D.N. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 647851.
50. Wu F., Niu K., Cui Y., Li C., Lyu M., Ren Y., Chen Y., Deng H., Huang L., Zheng S., et al. // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 1. P. 98.
51. Stevens A.J., de Jong L., Kennedy M.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 5. P. 2407.
52. Hasegawa H., Sasaki I., Tsukakoshi K., Ma Y., Nagasawa K., Numata S., Inoue Y., Kim Y., Ikebukuro K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 23. P. 13159.
53. Mao S.-Q., Ghanbarian A.T., Spiegel J., Martínez Cuesta S., Beraldi D., Di Antonio M., Marsico G., Hänsel-Hertsch R., Tannahill D., Balasubramanian S. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. V. 25. P. 951–957.
54. Cree S.L., Fredericks R., Miller A., Pearce F.G., Filichev V., Fee C., Kennedy M.A. // *FEBS Lett.* 2016. V. 590. № 17. P. 2870–2883.
55. Jara-Espejo M., Line S.R. // *FEBS J.* 2020. V. 287. № 3. P. 483–495.
56. Haggerty C., Kretzmer H., Riemenschneider C., Kumar A.S., Mattei A.L., Bailly N., Gottfreund J., Giesselmann P., Weigert R., Brändl B., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2021. V. 28. № 7. P. 594–603.
57. Tian H.-P., Lun S.-M., Huang H.-J., He R., Kong P.-Z., Wang Q.-S., Li X.-Q., Feng Y.-M. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 31. P. 19173–19183.
58. Lienert F., Wirbelauer C., Som I., Dean A., Mohn F., Schübeler D. // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. № 11. P. 1091–1097.
59. Braccioli L., de Wit E. // *Essays Biochem.* 2019. V. 63. № 1. P. 157–165.
60. Schoenherr C.J., Levorse J.M., Tilghman S.M. // *Nat. Genet.* 2003. V. 33. № 1. P. 66–69.
61. Fedoriw A.M., Stein P., Svoboda P., Schultz R.M., Bartolomei M.S. // *Science*. 2004. V. 303. № 5655. P. 238–240.
62. Freschi A., Del Prete R., Pignata L., Cecere F., Manfredola F., Mattia M., Cobellis G., Sparago A., Bartolomei M.S., Riccio A., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2021. V. 30. № 16. P. 1509–1520.
63. Damaschke N.A., Gawdzik J., Avilla M., Yang B., Svaren J., Roorpa A., Luo J.-H., Yu Y.P., Keles S., Jarrard D.F., et al. // *Clin. Epigenetics*. 2020. V. 12. № 1. P. 80.
64. Luo X., Zhang T., Zhai Y., Wang F., Zhang S., Wang G. // *Front. Genet.* 2021. V. 12. P. 639461.
65. Hashimoto H., Wang D., Horton J.R., Zhang X., Corces V.G., Cheng X. // *Mol. Cell*. 2017. V. 66. № 5. P. 711–720.
66. Stadler M.B., Murr R., Burger L., Ivanek R., Lienert F., Schöler A., van Nimwegen E., Wirbelauer C., Oakeley E.J., Gaidatzis D., et al. // *Nature*. 2011. V. 480. P. 490–495.
67. Reshef Y.A., Finucane H.K., Kelley D.R., Gusev A., Kotliar D., Ulirsch J.C., Hormozdiari F., Nasser J., O'Connor L., van de Geijn B., et al. // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 10. P. 1483–1493.
68. Kurukuti S., Tiwari V.K., Tavosoidana G., Pugacheva E., Murrell A., Zhao Z., Lobanenkov V., Reik W., Ohlsson R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 28. P. 10684–10689.
69. Schmitz K.-M., Mayer C., Postepska A., Grummt I. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 20. P. 2264–2269.
70. Baubec T., Colombo D.F., Wirbelauer C., Schmidt J., Burger L., Krebs A.R., Akalin A., Schubeler D. // *Nature*. 2015. V. 520. P. 243–247.
71. Weinberg D.N., Papillon-Cavanagh S., Chen H., Yue Y., Chen X., Rajagopalan K.N., Horth C., McGuire J.T., Xu X., Nikbakht H. // *Nature*. 2019. V. 573. P. 281–286.
72. Li Y., Chen X., Lu C. // *EMBO Rep.* 2021. V. 22. № 5. e51803.
73. Hervouet E., Vallette F.M., Cartron P.-F. // *Epigenetics*. 2009. V. 4. № 7. P. 487–499.
74. Sato N., Kondo M., Arai K.-I. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 344. № 3. P. 845–851.
75. Gu P., Le Menuet D., Chung A.C.-K., Cooney A.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 24. P. 9471–9483.
76. Tullius T., Parker S. // *Faculty Opinions – Post-Publication Peer Review of the Biomedical Literature*. 2013. V. 152. № 1–2.
77. Hudson N.O., Buck-Koehntop B.A. // *Molecules*. 2018. V. 23. № 10. P. 2555.
78. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jørgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 13. P. 1613–1618.
79. Filion G.J.P., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defossez P.-A. // *Mol. Cell Biol.* 2006. V. 26. № 1. P. 169–181.
80. Daniel J.M., Spring C.M., Crawford H.C., Reynolds A.B., Baig A. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 13. P. 2911–2919.
81. Nikolova E.N., Stanfield R.L., Dyson H.J., Wright P.E. // *Biochemistry*. 2018. V. 57. № 14. P. 2109–2120.
82. Liu Y., Toh H., Sasaki H., Zhang X., Cheng X. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. № 21. P. 2374–2379.
83. Zhenilo S., Deyev I., Litvinova E., Zhigalova N., Kaplun D., Sokolov A., Mazur A., Prokhortchouk E. // *Cell Death Differ.* 2018. V. 25. № 11. P. 1938–1951.
84. Yoon H.-G., Chan D.W., Reynolds A.B., Qin J., Wong J. // *Mol. Cell*. 2003. V. 12. № 3. P. 723–734.

85. Raghav S.K., Waszak S.M., Krier I., Gubelmann C., Isakova A., Mikkelsen T.S., Deplancke B. // *Mol. Cell.* 2012. V. 46. № 3. P. 335–350.
86. Bohne F., Langer D., Martín U., Eider C.S., Cencic R., Begemann M., Elbracht M., Bülow L., Eggermann T., Zechner U., et al. // *Clin. Epigenet.* 2016. V. 8. P. 47.
87. Prokhortchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Guo Meng F., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 1. P. 199–208.
88. Каплун Д.С., Фок Р.Э., Коростина В.С., Прохорчук Е.Б., Женило С.В. // *Биохимия.* 2019. Т. 84. № 3. С. 404–412.
89. Kaplun D., Starshin A., Sharko F., Gainova K., Filonova G., Zhigalova N., Mazur A., Prokhortchouk E., Zhenilo S., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 14. P. 7587.
90. Shi X., Du Y., Li S., Wu H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 7. P. 3639.
91. Kagey M.H., Melhuish T.A., Wotton D. // *Cell.* 2003. V. 113. № 1. P. 127–137.
92. Zhenilo S., Kaplun D., Prokhortchouk E. // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8 (S1). P. 134.
93. Lee B., Muller M.T. // *Biochem. J.* 2009. V. 421. № 3. P. 449–461.
94. Steinacher R., Barekati Z., Botev P., Kuśnierczyk A., Slupphaug G., Schär P. // *EMBO J.* 2019. V. 38. № 1. e99242.
95. Quenneville S., Verde G., Corsinotti A., Kapopoulou A., Jakobsson J., Offner S., Baglivo I., Pedone P.V., Grimaldi G., Riccio A., et al. // *Mol. Cell.* 2011. V. 44. № 3. P. 361–372.
96. Riso V., Cammisa M., Kukreja H., Anvar Z., Verde G., Sparago A., Acuzio B., Lad S., Lonardo E., Sankar A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 17. P. 8165–8178.
97. Shi H., Strogantsev R., Takahashi N., Kazachenka A., Lorincz M.C., Hemberger M., Ferguson-Smith A.C. // *Epigenetics Chromatin.* 2019. V. 12. № 1. P. 49.
98. Mancini M., Magnani E., Macchi F., Bonapace I.M. // *Nucl. Acids Res.* 2021. V. 49. № 11. P. 6053–6068.
99. Qin W., Wolf P., Liu N., Link S., Smets M., La Mastra F., Forné I., Pichler G., Hörl D., Fellinger K., et al. // *Cell Res.* 2015. V. 25. № 8. P. 911–929.
100. Beck A., Trippel F., Wagner A., Joppien S., Felle M., Vokuhl C., Schwarzmayr T., Strom T.M., von Schweinitz D., Längst G., et al. // *Clin. Epigenetics.* 2018. V. 10. P. 27.
101. Tian Y., Paramasivam M., Ghosal G., Chen D., Shen X., Huang Y., Akhter S., Legerski R., Chen J., Seidman M.M., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 10. № 12. P. 1957–1966.
102. Baubec T., Ivánek R., Lienert F., Schübeler D. // *Cell.* 2013. V. 153. P. 480–492.
103. Jin Y., Su K., Kong H.E., Ma W., Wang Z., Li Y., Li R., Allen E.G., Wu H., Jin P. // *Hum. Mol. Genet.* 2022. ddac189.
104. Allan A.M., Liang X., Luo Y., Pak C., Li X., Szulwach K.E., Chen D., Jin P., Zhao X. // *Hum Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 13. P. 2047–2057.
105. Li X., Barkho B.Z., Luo Y., Smrt R.D., Santistevan N.J., Liu C., Kuwabara T., Gage F.H., Zhao X. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 41. P. 27644–27652.
106. Katayama S., Andou M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2021. V. 581. P. 20–24.
107. O'Geen H., Bates S.L., Carter S.S., Nisson K.A., Halmaj J., Fink K.D., Rhie S.K., Farnham P.J., Segal D.J. // *Epigenetics Chromatin.* 2019. V. 12. P. 26.
108. Choudhury S.R., Cui Y., Lubecka K., Stefanska B., Irudayaraj J. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 29. P. 46545–46556.
109. Kang J.G., Park J.S., Ko J.-H., Kim Y.-S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 11960.
110. Devesa-Guerra I., Morales-Ruiz T., Pérez-Roldán J., Parrilla-Doblas J.T., Dorado-León M., García-Ortiz M.V., et al. // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. № 7. P. 2204–2216.
111. Ciechomska M., Roszkowski L., Maslinski W. // *Cells.* 2019. V. 8. № 9. P. 953.
112. Jung G., Hernández-Illán E., Moreira L., Balaguer F., Goel A. // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020. V. 17. № 2. P. 111–130.
113. Müller D., Györfy B. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2022. V. 1877. № 3. 188722.
114. Taryma-Leśniak O., Sokolowska K.E., Wojdacz T.K. // *Clin Epigenetics.* 2020. V. 12. № 1. P. 107.
115. Brocks D., Schmidt C.R., Daskalakis M., Jang H.S., Shah N.M., Li D., Li J., Zhang B., Hou Y., Laudato S., et al. // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 7. P. 1052–1060.
116. Graça I., Sousa E.J., Baptista T., Almeida M., Ramalho-Carvalho J., Palmeira C., Henrique R., Jerónimo C. // *Curr. Pharm. Des.* 2014. V. 20. № 11. P. 1803–1811.
117. Segura-Pacheco B., Perez-Cardenas E., Taja-Chayeb L., Chavez-Blanco A., Revilla-Vazquez A., Benitez-Bribiesca L., Duenas-González A. // *J. Transl. Med.* 2006. V. 4. P. 32.
118. Ansari I., Chaturvedi A., Chitkara D., Singh S. // *Semin. Cancer Biol.* 2022. V. 83. P. 570–583.
119. Hanzawa N., Hashimoto K., Yuan X., Kawahori K., Tsujimoto K., Hamaguchi M., Tanaka T., Nagaoka Y., Nishina H., Morita S., et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 5181.
120. Wood K.H., Johnson B.S., Welsh S.A., Lee J.Y., Cui Y., Krizman E., Brodtkin E.S., Blendy J.A., Robinson M.B., Bartolomei M.S., et al. // *Epigenomics.* 2016. V. 8. № 4. P. 455–473.
121. Kulikov A.V., Korostina V.S., Kulikova E.A., Fursenko D.V., Akulov A.E., Moshkin M.P., Prokhortchouk E.B. // *Behav. Brain Res.* 2016. V. 297. P. 76–83.
122. Gnanapragasam M.N., Scarsdale J.N., Amaya M.L., Webb H.D., Desai M.A., Walavalkar N.M., Wang S.Z., Zhu S.Z., Ginder G.D., Williams Jr., D.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 18. P. 7487–7492.
123. Yu X., Azzo A., Bilinovich S.M., Li X., Dozmorov M., Kurita R., Nakamura Y., Williams Jr., D.C., Ginder G.D. // *Haematologica.* 2019. V. 104. № 12. P. 2361–2371.
124. Hendrich B., Guy J., Ramsahoye B., Wilson V.A., Bird A. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. № 6. P. 710–723.
125. Robinson L., Guy J., McKay L., Brockett E., Spike R.C., Selfridge J., De Sousa D., Merusi C., Riedel G., Bird A., et al. // *Brain.* 2012. V. 135. P. 9. P. 2699–2710.
126. Scarsdale J.N., Webb H.D., Ginder G.D., Williams D.C., Jr. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 15. P. 6741–6752.
127. Ghosh R.P., Horowitz-Scherer R.A., Nikitina T., Gierasch L.M., Woodcock C.L. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 29. P. 20523–20534.

УДК 577.2;577.21

Flow-seq-метод: особенности и применение в изучении бактериальной трансляции

Е. С. Комарова¹, О. А. Донцова^{2,3,4,5}, Д. В. Пышный⁶, М. Р. Кабилов⁶, П. В. Сергиев^{1,2,3,4}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва, 119234 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119234 Россия

³Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, Сколково, 121205 Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119234 Россия

⁵Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

⁶Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Центр коллективного пользования «Геномика», Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: petya@genebee.msu.ru, kabilov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 04.10.2022

Принята к печати 11.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11820

РЕФЕРАТ Метод Flow-seq основан на использовании библиотек репортерных конструкций, где определенный элемент, регулирующий экспрессию генов флуоресцентных репортерных белков, представлен во многих тысячах вариантов. Библиотеки репортерных конструкций внедряют в клетки, сортируют по уровню флуоресценции, а затем проводят их высокопроизводительное секвенирование. Таким образом, появляется возможность в одном эксперименте на десятках и сотнях тысяч репортерных конструкций выявлять закономерности, определяющие эффективность экспрессии. Этот метод нашел активное применение в оценке эффективности биосинтеза белка множеством вариантов мРНК одновременно. Однако этим возможностями метода Flow-seq не исчерпываются. В представленном обзоре проведен сравнительный анализ метода Flow-seq и других методов, используемых для оценки эффективности трансляции мРНК, а также рассмотрены особенности применения и результаты, получаемые с помощью Flow-seq.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Flow-seq, NGS, высокопроизводительное секвенирование, проточная цитометрия, трансляция, бактерии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TIR – Translation Initiation Region (участок инициации трансляции); RBS – Ribosome Binding Site (сайт посадки/связывания рибосомы на мРНК); SD – Shine-Dalgarno sequence (последовательность Шайна–Дальгарно); 5'-UTR – 5'-untranslated region (5'-нетранслируемая область); ORF – open reading frame (открытая рамка считывания); NGS – next-generation sequencing (высокопроизводительное секвенирование/секвенирование нового поколения/глубокое секвенирование); Flow-seq – flow cytometry and next-generation sequencing (метод, совмещающий проточную цитометрию и высокопроизводительное секвенирование).

ВВЕДЕНИЕ

Трансляция – ключевой процесс в жизнедеятельности всех организмов, в ходе которого в клетках с помощью сложного макромолекулярного рибонуклеопротеидного комплекса, называемого рибосомой, синтезируются белки. Рибосома декодирует информацию, записанную в мРНК, и переводит ее в последовательность аминокислот, образующих белок [1].

При этом мРНК не только участвует в данном процессе в качестве пассивного носителя информации, но и предопределяет эффективность трансляции [2].

Одним из участков мРНК, определяющих эффективность ее трансляции, является 5'-нетранслируемая область (5'-UTR) (рис. 1А) [3]. В 5'-UTR находится сайт посадки рибосомы (RBS), содержащий в канонических мРНК последовательность

Шайна–Дальгарно (SD) [4–13], комплементарную 3'-концу 16S рРНК [14, 15]. Для высокой эффективности биосинтеза белка SD должна располагаться на оптимальном расстоянии от стартового кодона и иметь оптимальную длину [16–18]. Иногда в одной 5'-UTR можно найти несколько последовательностей Шайна–Дальгарно [2, 17]. Для эффективной трансляции участок инициации трансляции (TIR) должен быть либо полностью одноцепочечным, либо укладываться во вторичную структуру, которую легко разрушить [19–22]. Известны и другие элементы, способные влиять на эффективность трансляции, такие, как богатая остатками аденина и урацила (AU-богатая) область мРНК, с которой взаимодействует рибосомный белок bS1 [23–25], а также начальный участок кодирующей области, следующий сразу за стартовым кодоном [26–28]. Для 5'-UTR эффективно транслируемых мРНК характерно низкое содержание остатков цитидина и наличие повторов с пуриновыми основаниями (AG-повторов) [2].

На сегодняшний день известны различные методы, позволяющие изучать функциональную значимость отдельных участков мРНК для биосинтеза белка. В число этих методов входят сайт-направленный мутагенез [29] или рандомизация [30, 31] участков в 5'-UTR, как правило, перед геном флуоресцентного белка и оценка интенсивности его свечения *in vitro* (или *in vivo*), отражающей эффективность трансляции. С применением термодинамического моделирования *in silico* [18, 32–36], оценивающего силу молекулярных взаимодействий комплекса 30S с мРНК-транскриптом и предсказывающего скорость инициации трансляции, можно определить величины, связанные с эффективностью трансляции. Результаты моделирования можно выборочно проверить экспериментально с использованием репортерных конструкций. Появление такого метода, как проточная цитометрия, позволило оценивать одновременно различные параметры *in vivo* большого количества клеток и по сходству определенных параметров, например, по уровню экспрессии гена флуоресцентного белка, выделять отдельные фракции [37]. Развитие высокопроизводительного секвенирования (NGS) способствовало разработке новых сложных подходов к изучению геномов, определению корреляции между генотипом и фенотипом, в частности таких, как полногеномное секвенирование, секвенирование библиотек плазмидных ДНК, РНК-секвенирование для профайлинга клеточного транскриптома и выделения эффективно транслирующихся мРНК, ChIP-секвенирование для определения сайтов связывания ДНК-ассоциированных белков [38, 39].

РАЗНООБРАЗИЕ ПОДХОДОВ К ИЗУЧЕНИЮ РОЛИ 5'-UTR В ЭФФЕКТИВНОСТИ ТРАНСЛЯЦИИ

Широкомасштабный анализ генов *E. coli* показал, что большинство мРНК содержат последовательность Шайна–Дальгарно (SD) (рис. 1Б), открытую в 1970-х в нескольких бактериальных мРНК [4] и существенной для эффективной инициации трансляции [16–18]. Последовательность SD является самым изученным регуляторным элементом. SD располагается на расстоянии 5–8 нуклеотидов перед стартовым кодоном (8–11 нуклеотидов, если считать от центрального G в SD [7]) и служит местом взаимодействия бактериальной 30S субчастицы, в отличие от эукариотической рибосомы, связывающейся на 5'-конце мРНК для начала сканирования [6]. Разные мРНК *E. coli* содержат SD разной длины, варьирующей в пределах 4–8 нуклеотидов. При этом наиболее вероятный состав последовательности SD agGa.

Зависимость эффективности биосинтеза белка от длины последовательности SD и ее расстояния от старт-кодона изучали различными методами. Например, с помощью двойной генно-инженерной конструкции (рис. 1В), содержащей гены двух флуоресцентных белков, где первый, RFP (красный флуоресцентный белок), служил внутренним контролем, а второй, CER (циановый флуоресцентный белок), выступал в качестве сенсора эффектов, связанных с изменением элементов 5'-UTR мРНК [17]. При этом вычисляли отношение измеренных интенсивностей флуоресценции двух белков CER/RFP *in vivo*, что позволяло нивелировать эффекты, обусловленные размером бактериальной клетки и флуктуациями копийности репортерной плазмиды. Этот подход, основанный на молекулярном клонировании, в котором используются 16 репортерных конструкций с четырьмя последовательностями SD (2, 4, 6 и 8) разной длины, расположенными на разных расстояниях от инициаторного кодона гена белка CER (7, 10, 13 и 16), и еще одна контрольная конструкция без комплементарных к анти-SD участков, позволил экспериментально изучить влияние длины SD, расстояния от SD до стартового кодона и их сочетаний на биосинтез белка CER. Таким образом показано, что эффективность трансляции мРНК с SD длиной 8 нуклеотидов снижается с увеличением расстояния от старт-кодона до SD, для SD длиной 6 нуклеотидов оптимально расстояние в 10 нуклеотидов. В случае SD средней длины (4 нуклеотида) наблюдается такая же зависимость, как у длинной (8 нуклеотидов). В случае короткой SD (2 нуклеотида) влияние расстояния несущественно, при этом роль этой SD в эффективности биосинтеза белка сохраняется: обеспечивает на порядок большую эф-

фективность, чем контрольная конструкция без SD. Варьирование этих параметров дает возможность изменять уровень трансляции вплоть до четырех порядков, что указывает на их важность в определении уровня многих белков в клетке [17].

Для быстрого и достаточно простого количественного анализа экспрессии генов *in vitro* можно использовать многочисленные варианты участка в 5'-UTR, получаемые с помощью сайт-направленного мутагенеза, на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). При этом продукт ПЦР, содержащий T7-промотор, тестируемый вариант 5'-UTR и ген флуоресцентного белка eGFP, напрямую используется в системе сопряженной транскрипции-трансляции *in vitro* из клеток *E. coli* [29]. Эффективность трансляции в такой системе можно оценить по интенсивности флуоресценции белка eGFP. Таким образом были получены 54 варианта последовательностей 5'-UTR, из них 18 и 36 с измененными SD- и AU-богатыми последовательностями соответственно, которые обеспечили диапазон относительных уровней экспрессии от 0.1 до 2.0 и показали влияние различных сайтов посадки рибосомы (RBS) на эффективность трансляции [29]. Однако такой точный подход сильно ограничен небольшим набором проверяемых вариантов, не позволяя приблизиться ко всему разнообразию природных 5'-UTR, предшествующих генам, число которых у *E. coli* составляет около 4×10^3 [8].

Позднее разработали экспериментальную систему (*рис. 1Г*) [30], основанную на трансляции *in vitro*, которая позволила отбирать наиболее эффективно транслируемые мРНК из большой выборки искусственных последовательностей. Для этого использовали модельную мРНК, содержащую 5'-UTR из 81 нуклеотида, 18 из которых, локализованных перед стартовым кодоном, были полностью рандомизированы, что помогло получить библиотеку из $\sim 6.9 \times 10^{10}$ различных последовательностей. Модельная мРНК кодирует гибридный белок, содержащий примерно в середине домен, связывающий мальтозу, и FLAG-эпитоп, позволяющий проводить аффинную очистку рибосом, синтезирующих этот гибридный белок. После домена, используемого для аффинной очистки, находится фрагмент белка TolA, служащий исключительно спейсером, достаточным для того, чтобы по окончании синтеза полноразмерного гибридного белка из пептидного туннеля был экспонирован аффинный домен. Эта мРНК не содержит стоп-кодон, поэтому она оставалась связанной с рибосомой после завершения синтеза. Таким образом, мРНК могла быть экстрагирована из аффинно-связанных рибосом и в дальнейшем амплифицирована. Ключевым параметром

отбора мРНК служило ограниченное время трансляции: только мРНК, транслируемые быстро, могли быть аффинно очищены и использованы в следующем раунде селекции [30]. Удивительно, что из отобранных последовательностей, обеспечивающих наиболее быструю трансляцию в *in vitro* системе, 76% не содержали SD и имели С-богатые короткие участки, комплементарные 16S рРНК. Однако мРНК с такими С-богатыми последовательностями не экспрессировались на высоком уровне *in vivo*, возможно, из-за разного среднестатистического соотношения в *in vitro* и *in vivo* системах рибосом и мРНК, конкурирующих, наряду с С-богатыми RBS, за связывание с рибосомами [30]. Тот же самый эксперимент проведен с использованием библиотеки более коротких мРНК с 5'-UTR длиной 40 нуклеотидов [31], наиболее частой в мРНК *E. coli* [40, 41]. Применение секвенирования нового поколения и статистических методов позволило определить мотивы связывания мРНК и рибосомы. Отобранные по скорости трансляции мРНК из библиотеки с более короткими 5'-UTR чаще содержали SD наряду с G/U-богатыми последовательностями [31]. Полученные результаты также указывают на влияние длины 5'-UTR на эффективность инициации биосинтеза белка.

Последовательность 5'-UTR мРНК может определять различную укладку участка перед стартовым кодоном. Связь между стабильностью вторичных структур в TIR и эффективностью трансляции подтвердили крупномасштабным вычислительным анализом [19], указывающим на тенденцию прокариотических и эукариотических генов, особенно с высоким уровнем экспрессии, к дестабилизации вторичной структуры мРНК вблизи инициаторного кодона [20]. Варьирование стабильности (< -12 ккал/моль) шпильчатой структуры, содержащей RBS, с помощью сайт-направленного мутагенеза и последующий анализ *in vivo* выхода белка показали, что чем выше стабильность вторичной структуры, содержащей участок связывания рибосомы, тем ниже эффективность трансляции. Таким образом, показана возможность 500-кратного изменения экспрессии при замене только одного нуклеотида, приводящей к стабилизации вторичной структуры мРНК. Как следствие, наблюдалась полная зависимость начала трансляции от спонтанного разворачивания всего участка инициации мРНК [21]. Однако эта спонтанность была обусловлена присутствием всех необходимых элементов комплекса инициации [22]. Такого рода анализ 12 мРНК с разной стабильностью вторичной структуры и с SD разной длины либо без SD выявил необходимость самой SD, старт-кодона, инициаторной тРНК с форми-

лированным метионином, фактора инициации IF2, связанного с GTP, в комплексе с 30S субчастицей рибосомы для разворачивания вторичных структур мРНК. Вклад каждого индивидуального элемента в нарушение укладки TIR мРНК оценен с использованием константы диссоциации фрагмента мРНК с последовательностью SD из 6 нуклеотидов [22]. Далее методом FRET проведен анализ этого же фрагмента с 5'- и 3'-концами, меченными Су3 и Су5, при добавлении 30S субъединицы вместе со всеми элементами, необходимыми для инициации трансляции. Оценка проводилась относительно контрольной мРНК без SD, но с близкой по стабильности вторичной структурой. В результате анализа была выявлена значимость последовательности SD в разворачивании вторичной структуры мРНК. При этом показана высокая эффективность FRET для свернутой мРНК, концы которой образовывали комплементарное взаимодействие SD с анти-SD, и слабая для развернутой формы мРНК [22].

Эффективность связывания субъединиц рибосомы с той или иной последовательностью 5'-UTR мРНК оценивают с помощью так называемого метода тоупринтинга/тоупринта (рис. 2А). Этот метод основан на использовании флуоресцентно или изотопно меченных праймеров, комплементарных 3'-концу мРНК. После сборки инициаторного комплекса на мРНК проводится реакция обратной транскрипции с последующим электрофоретическим анализом удлиненных кДНК в реакционной смеси. Обратная транскриптаза доходит до 5'-конца мРНК, если мРНК не связана с рибосомой, и образует более короткие продукты при остановке ревертазы, встретившей рибосому. По соотношению длинных и укороченных тоупринтов можно судить о доле мРНК, связавшихся с рибосомой [42, 43].

По мере накопления экспериментальных результатов и развития методов их анализа все большую роль начинают играть биоинформатические подходы, позволяющие работать с большими массивами данных. Наблюдаемая в ходе экспериментов инициация трансляции прокариотических мРНК, в 5'-UTR которых не определена последовательность SD, происходит независимо от взаимодействий с анти-SD и под влиянием рибосомного белка bS1. При этом биоинформатический анализ показал снижение стабильности вторичных структур таких последовательностей 5'-UTR, что облегчает образование инициаторного комплекса, компенсируя отсутствие взаимодействий SD и анти-SD [44, 45].

Известно, что существуют так называемые безлидерные прокариотические мРНК, которые не содержат 5'-UTR, а следовательно, и SD. При этом широкомасштабный *in silico* анализ макроэволюции

показывает уменьшение числа таких генов у бактерий в ходе эволюции. Рассмотрены участки инициации трансляции всех генов 953 бактериальных и 72 архейных геномов, распределенных по группам, согласно их расстояниям до корня (между бактериями и археями) на филогенетическом древе 16S рРНК. Была рассчитана средняя доля «генов без лидера» в каждой группе: сначала она быстро падает, а затем колеблется на низком уровне [46].

Активное развитие методов секвенирования нового поколения и накопленные навыки работы с системой трансляции позволили разработать метод рибосомного профилирования/профайлинга (Ribo-seq) (рис. 2Б), основанного на высокопроизводительном секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых транслирующей рибосомой [47]. Этот подход оказался эффективным для изучения экспрессии генов на уровне и транскрипции, и трансляции одновременно, в том числе в ответ на различные воздействия [48–50]. Метод Ribo-seq дает информацию о местоположении рибосом на мРНК с однонуклеотидным разрешением. Такая точность позволяет не только выявлять трансляцию участков мРНК вне аннотированной рамки считывания, но и трансляцию перекрывающихся рамок считывания и смысловое декодирование стоп-кодонов. С помощью Ribo-seq транслируемые рамки считывания выявлены в РНК, ранее считавшихся некодирующими. Также оказалось возможным оценивать влияние разных условий и факторов на трансляцию мРНК в клетках, например, разных сред, модификаций исследуемых белков, антибиотиков [51–56].

Активное использование метода Ribo-seq позволило выявить ряд сложностей и артефактов, связанных с методологией эксперимента и обработкой результатов [57–59]. Многообещающая технология рибосомного профилирования для изучения скорости декодирования рибосом характеризуется наличием нечастых высоких пиков плотности рибосомного футпринта и длинных промежутков при выравнивании соответствующих последовательностей мРНК. Для уменьшения влияния неоднородности данных разработан способ нормализации, эффективный при наличии гетерогенного шума, позволивший выявить существенные различия в распределении ридов (прочитанных последовательностей) по мРНК, и детерминант частот рибосомного футпринта в 30 общедоступных наборах данных рибосомного профайлинга, тем самым ставя под сомнение надежность данного метода как точного представления локальной плотности рибосом без предварительного контроля качества [57]. Такое наблюдение указывает на неполное понимание того, как параметры протокола влияют на плотность рибосомных футпринтов.

Возможно, наиболее известная причина этого наблюдения заключается в смещении последовательностей, возникающем во время создания библиотеки рибосомных футпринтов и ее конверсии в кДНК, и последующего секвенирования [58]. Перечисленные стадии вовлекают ряд реакций с использованием ферментов, обладающих сиквенс-специфичностью, как например, нуклеазы [60]. В то же время некоторые антибиотики, которыми рибосомы обрабатывают перед профилированием, обладают такой же сиквенс-специфичностью [61–63], что необходимо учитывать при постановке эксперимента.

С применением метода рибосомного профайлинга на бактериях показано существенное увеличение покрытия рибосомами после последовательностей Шайна–Дальгарно, встречающихся по случайным причинам в кодирующей области [64]. В то время как SD, предшествующие старт-кодону, играют хорошо охарактеризованную роль в инициации трансляции, полученные данные свидетельствуют о том, что элонгация замедляется временным образованием пар оснований между мотивами SD внутри открытых рамок считывания и последовательностью анти-SD в 16S рРНК, причем такие паузы составляли более 70% сильных остановок по всему геному, что привело к выводу о том, что такие паузы были основной детерминантой трансляционных остановок у бактерий [64].

Позднее с использованием усовершенствованного варианта метода Ribo-seq с улучшенным разрешением показали, что ранее наблюдаемое обогащение покрытия мотивов SD рибосомами можно объяснить паузами на глициновых кодонах и невозможностью выделить всю популяцию фрагментов мРНК, защищенных рибосомой. Сделан вывод о том, что мотивы SD не являются, вероятно, основной причиной множества трансляционных остановок *in vivo* [65].

Биофизические модели позволяют оценить эффективность взаимодействия биомолекул, в том числе и мРНК с рибосомой. Примером может служить термодинамическая модель (рис. 2B) [32], которая одновременно оценивает силу молекулярных взаимодействий 30S комплекса с мРНК-транскриптом, рассчитывает свободную энергию Гиббса для каждого элемента в составе конкретной мРНК и предсказывает скорость инициации трансляции: чем большую энергию надо затратить для разворачивания элементов мРНК, тем ниже скорость инициации трансляции. Представленная модель может быть использована как для предсказания относительной скорости инициации трансляции существующей 5'-UTR с определенным RBS, так и для дизайна последовательности RBS, обеспечивающей требуемую скорость инициации трансляции [18, 32].

Применение метода Flow-seq для библиотеки плазмид, содержащих гены флуоресцентных белков, первый из которых служит внутренним контролем, а экспрессия второго изменяется в зависимости от влияния последовательностей, полученных в результате рандомизации 30 нуклеотидов в кодирующей области гена сразу после стартового кодона, позволило разделить полученную библиотеку (более 30×10^3 вариантов мРНК) по эффективности трансляции [28]. Дальнейший анализ показал снижение эффективности трансляции мРНК, содержащих SD-подобные последовательности, и уменьшение доли таких мРНК в наборе эффективно транслирующихся, демонстрируя отрицательное влияние SD в данной области мРНК на биосинтез белка и поддерживая, в свою очередь, более ранние наблюдения, полученные на ограниченном наборе модельных мРНК [66].

Примечательно, что распределение энергий связывания анти-SD-последовательностей среди мРНК с эффективной трансляцией сходно с распределением у природных генов *E. coli*. Более того, созданы отдельные конструкции с SD в скользящем окне начального кодирующего участка сразу после старт-кодона и со схожей энергией укладки вторичной структуры, эффективность трансляции которых оценена. Таким образом, получены результаты, согласующиеся с результатами анализа данных после применения метода Flow-seq [28].

СХЕМА МЕТОДА FLOW-seq, ОСОБЕННОСТИ И РЕЗУЛЬТАТЫ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

С целью определения влияния какого-либо фактора или набора факторов на уровень экспрессии того или иного гена часто используют тысячи репортерных конструкций, перебирающих различные варианты промоторов, 5'-нетранслируемых областей, а также отдельных участков в них, включая сайты посадки рибосомы (RBS), предшествующие им области (standby sites) или следующие за ними спейсерные участки, начальных «разгонных» участков кодирующей области (ramp region), по отдельности или одновременно (табл. 1). Как правило, такие плазмиды содержат два гена флуоресцентных белков: первый из них выступает в роли сенсора, экспрессия которого чувствительна к переменным участкам, а второй используется в качестве неизменного внутреннего контроля. Полученными наборами конструкций трансформируют штамм бактерий, подходящий для последующей экспрессии и сортировки. Далее с помощью проточной цитометрии оценивают интенсивности флуоресценции двух белков в пуле клеток и формируют группы/фракции клеток с приблизительно одинаковым отношением измеренных

Таблица 1. Применение метода Flow-seq для анализа эффективности трансляции

Элементы мРНК	Количество вариантов в полученных библиотеках в итоге после Flow-seq	Типы вариантов	Результаты	Ссылка
Промоторы и сайты посадки рибосомы (RBS) в 5'-UTR	11894 (94%) из 12653 возможных с комбинациями 114 промоторов и 111 RBS (одна комбинация привела к несовместимому сайту рестрикции)	Взяты из доступных баз данных и сгенерированные с помощью RBS Calculator	Диапазон изменения экспрессии 10^4 раз. Выбор промотора оказывает наибольшее влияние на уровень РНК и в меньшей степени на уровень белка, так как на эффективность его трансляции влияет и выбор сайта посадки рибосомы, и, возможно, другие факторы. 55% из нескольких сотен проверенных отдельных колоний безошибочно определены при Flow-seq-анализе	[67]
Промоторы и сайты посадки рибосомы (RBS) в 5'-НТО	~ 500 комбинаций из 14 промоторов и 22 RBS для двух детектируемых флуоресцентных белков и более 1200 комбинаций из рандомизированной библиотеки	Конкретные варианты и с участками рандомизации в изучаемых элементах	Динамический диапазон экспрессии 10^3 раз. Получаемые комбинации приводят к экспрессии произвольного гена в пределах двукратного изменения уровня с надежностью 93%	[75]
Шесть нуклеотидов в спейсерном участке за SD в 5'-UTR и перед старт-кодоном и первые шесть нуклеотидов, следующих за ним (кодоны в положениях +2 и +3 кодирующей области (CDS)) ...-SD-GAC-6N-AUG-6N ^{syn} -...	13914 (56%) для одного белка и 25861 (53%) для другого из 24576 и 49152 возможных соответственно	Рандомизированные спейсерные участки и кодоны в положениях +2 и +3 с синонимическими заменами, не изменяющими кодирующую последовательность двух сенсорных белков	Диапазон изменения экспрессии 10^3 раз. Низкое содержание GC-нуклеотидов и уменьшение стабильности вторичной структуры изучаемых элементов важны для высокого уровня экспрессии, не ограниченного данными детерминантами. Распределение уровней флуоресценции белка, измеренных в нескольких десятках колоний с помощью планшетного ридера, совпадает с результатами Flow-seq	[71]
Четыре нуклеотида в спейсерном участке за SD в 5'-UTR и перед старт-кодоном ...-SD-C-4N-CAU-AUG-...	249 (97%) из 256 возможных	Рандомизированные	Диапазон изменения экспрессии 10^2 раз. Преобладание доли аденозинов и уменьшение доли цитидинов в эффективно транскрибирующихся вариантах. Низкое содержание GC-нуклеотидов и уменьшение стабильности вторичной структуры изучаемых элементов важны для высокого уровня экспрессии. SD-подобные последовательности также встречаются только в вариантах с высокой экспрессией	[39]
SD длиной 6 нуклеотидов в 5'-UTR	4066 (99%) из 4096 возможных	Рандомизированные	Измеренные уровни белков (флуоресцентного и пяти природных) для 91% вариантов последовательностей были в пределах двукратного изменения предсказанного уровня экспрессии в EMOPEC, учитывающего контекстное окружение SD, сводящего к минимуму изменения вторичной структуры	[76]
Standby-сайты различной длины (20–164 нуклеотида) перед SD, дистальные в 5'-UTR	136 5'-UTR с разной длиной и вторичной структурой, формой и числом модулей	Смоделированные варианты	Диапазон изменения эффективности трансляции 10^2 раз. Скорость инициации трансляции мРНК контролируется площадью поверхности одноцепочечных участков, частичным разворачиванием структуры РНК для минимизации штрафа по свободной энергии связывания рибосомы, отсутствует кооперативное связывание и, возможно, скольжение рибосомы в рассматриваемом участке. Разработана и проверена экспериментально биофизическая модель предсказания скорости инициации трансляции. Рибосома может легко связываться с отдаленными от старт-кодона модулями standby-сайтов и обеспечивать высокую эффективность трансляции	[34]
Сайт посадки рибосомы (RBS) в 5'-UTR с фиксированной последовательностью SD (5 нуклеотидов) и изменяющимся standby-сайтом (4 нуклеотида) и спейсерным участком из 6 нуклеотидов RRRV-AGGAG-R-6N-AUG (R: A/G, V: A/G/C, N:A/U/C/G)	Более 20000 (10%) из ~ 200000 возможных вариантов для двух флуоресцентных белков	Рандомизированные и частично конкретные позиции с неполными вариациями	Диапазон изменения эффективности трансляции 10^4 раз. На эффективность трансляции значительно влияет консервативность SD, тогда как AC-богатый спейсерный участок слабо зависит от контекста. Для высокой экспрессии наблюдалась низкая стабильность вторичной структуры изучаемого участка. Замена репортерного белка другим зачастую не влияла на общую тенденцию распределения последовательностей, задающих тот или иной уровень биосинтеза белка	[74]

Таблица 1 (продолжение).

Элементы мРНК	Количество вариантов в полученных библиотеках в итоге после Flow-seq	Типы вариантов	Результаты	Ссылка
Почти полная последовательность 5'-UTR длиной 22 или 32 нуклеотида GG-20N/30N-AUG...	11692 (10 ^{-6%} из возможных вариантов), 11889 (10 ^{-12%}) для 20N и 30N, соответственно, 48 вариантов природных с вариациями	Рандомизированные, природные, конкретные	Диапазон изменения эффективности трансляции 10 ⁴ -кратный. Наблюдались низкая стабильность вторичной структуры и консервативность последовательности SD у вариантов с высокой экспрессией. Наличие AU-богатых энхансеров на 5'-конце в standby-сайте, низкая доля цитидиновых оснований, множественные SD, AG-повторы в 5'-UTR мРНК в отдельных случаях обеспечивают высокую эффективность трансляции	[2]
Последовательности 5'-UTR длиной 2–60 нуклеотидов первых генов оперонов <i>E. coli</i> с GG на самом 5'-конце, сохранившихся при транскрипции GG-natural 5'-UTR	648 (91%) из 713 возможных длиной 2–60 нуклеотидов, (45%) из всех 1451 природных 5'-UTR первых генов оперонов	Природные	Диапазон изменения эффективности трансляции 30-кратный. Наблюдалось влияние вторичной структуры РНК и последовательности SD на эффективность трансляции, но с меньшей вариабельностью по сравнению с рандомизированными библиотеками. Низкая стабильность вторичной структуры и консервативность последовательности SD в вариантах с высокой экспрессией. Результаты оценки эффективности трансляции в случае с теми или иными 5'-UTR коррелировали с результатами, полученными с помощью рибосомного профилирования	[77]
Участки в промоторной области, standby-сайт длиной 10/20/30 нуклеотидов, спейсерный участок из 8 нуклеотидов 10N/20N/30N-SD-8N	~ 12000 (очень маленький процент из возможных)	Рандомизированные	Диапазон изменения эффективности трансляции 10 ³ раз. При высоком уровне экспрессии наблюдалась низкая стабильность вторичной структуры изучаемого участка	[72]
Промоторы, сайты посадки рибосомы (RBS), первые 13 аминокислот кодирующей области белка	14234 комбинации из двух промоторов, четырех сайтов посадки рибосомы (RBS) и последовательностей N-концевых пептидов, соответствующих первым 13 аминокислотам 137 природных генов <i>E. coli</i>	Природные	Диапазон изменения эффективности трансляции более 10 ² . Использование редких кодонов на N-конце может увеличивать экспрессию в 14 раз независимо от RBS, обеспечивающих ту или иную эффективность трансляции. Уменьшение стабильности вторичной структуры, а не сама редкость кодонов отвечает за увеличение экспрессии	[78]
Первые шесть кодонов, следующих за старт-кодоном, в кодирующей области	10	Природные	Уменьшение стабильности вторичной структуры, а не сама редкость кодонов отвечает за увеличение эффективности трансляции. Редкие кодоны часто A/T-богаты в третьем положении, что чаще коррелирует с увеличением экспрессии, чем синонимичные кодоны, оканчивающиеся на G/C	[81]
Первые 10 кодонов, следующих за старт-кодоном, в кодирующей области	Более 30000	Рандомизированные	Уменьшение стабильности вторичной структуры, а не сама редкость кодонов отвечает за увеличение эффективности трансляции. Сильное влияние на экспрессию оказывают кодоны ближе к стартовому. Дополнительные старт-кодоны в рамках считывания способствуют трансляции. Наличие в N-концевой области белка аминокислот, на синтез которых клетка тратит много ресурсов, отрицательно сказывалось на эффективности синтеза таких белков	[28]

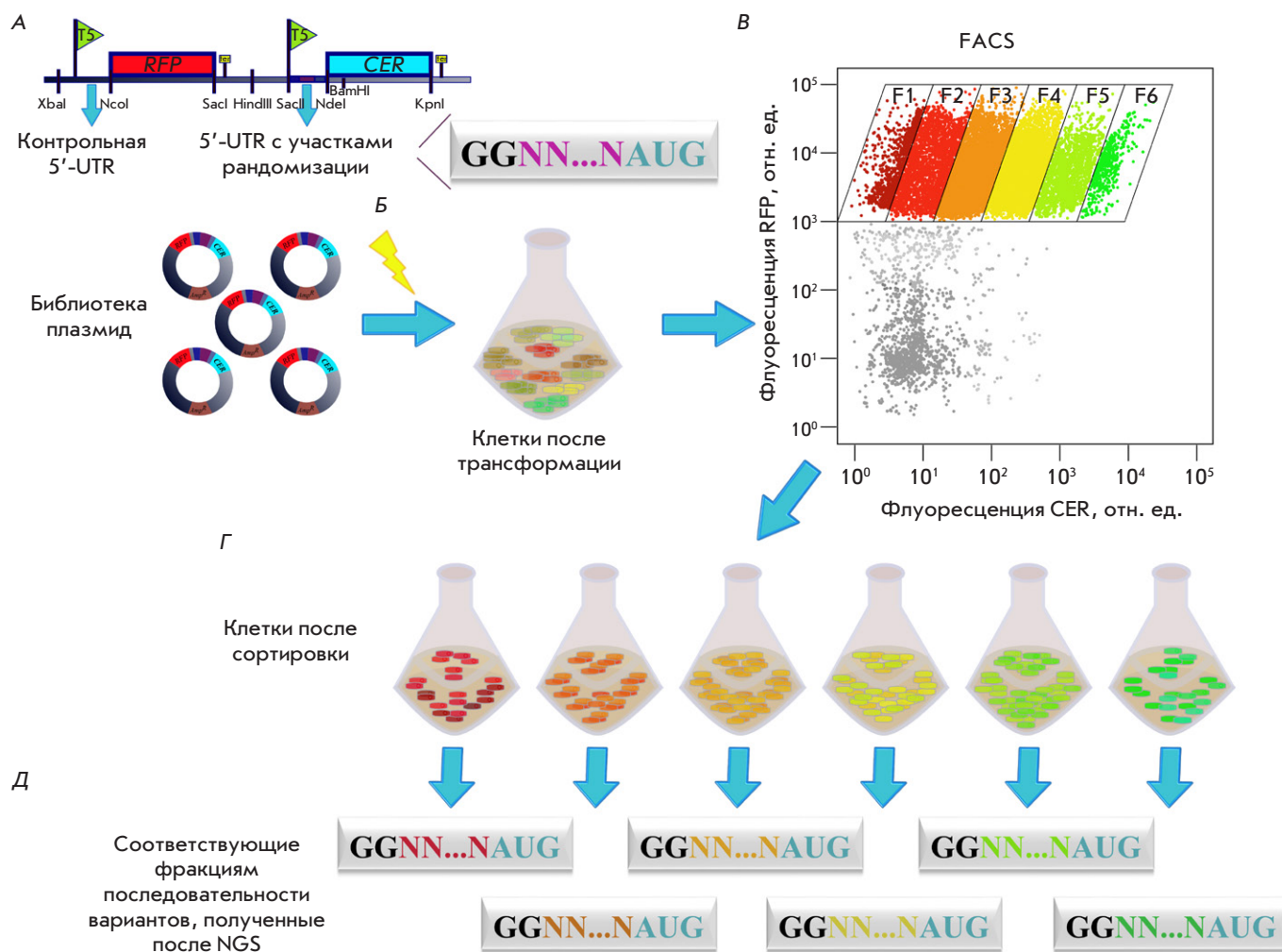


Рис. 3. Схема метода Flow-seq (на примере работы с рандомизированными 5'-UTR перед геном белка CER и контрольной 5'-UTR перед геном белка RFP). Представлены этапы конструирования библиотеки плазмид, трансформации, сортировки и секвенирования. А – клонирование рандомизированного ДНК-фрагмента в репортерный вектор перед геном белка CER. Перед геном белка RFP сохраняется константная 5'-UTR. Б – электропорация целой библиотеки плазмид в клетки *E. coli*. В – разделение клеток на основе отношения интенсивностей флуоресценции белков CER/RFP клеточным сортером. Г – сбор фракций с клетками (например, F1–F6) согласно соотношению CER/RFP. Д – выделение ДНК и амплификация рандомизированного участка с последующим высокопроизводительным секвенированием (NGS). Рисунок выполнен в программе Inkscape

уровней флуоресценции этих белков. После наращивания количества собранных клеток из них выделяют плазмиды, переменный участок которых амплифицируют и подвергают высокопроизводительному секвенированию с целью определения последовательностей ДНК/РНК, попавших в конкретную фракцию и обеспечивающих тот или иной уровень экспрессии репортерного гена (рис. 3).

Этот подход применили для создания ряда конструкций с различными комбинациями сайтов посадки рибосомы и промоторов одновременно. Количество РНК и зеленого флуоресцентного белка (GFP), синтезируемых клетками, трансформированными каждой из конструкций, относили к количе-

ству соответствующей ДНК, таким образом определяя эффективность транскрипции и трансляции. Также в конструкцию включали ген флуоресцентного белка mCherry, используемого в качестве внутреннего контроля, с консервативным промотором и сайтом посадки рибосомы (RBS) [67]. В итоге был получен набор из 12653 плазмид с различными комбинациями 114 промоторов и 111 вариантов RBS. Чтобы оценить уровни ДНК и РНК в стационарной фазе проводили глубокое секвенирование ДНК (DNA-seq) и РНК (RNA-seq) из клеток в этой фазе. Для оценки уровней двух флуоресцентных белков клетки сортировали по соотношению интенсивностей флуоресценции GFP/mCherry. Из со-

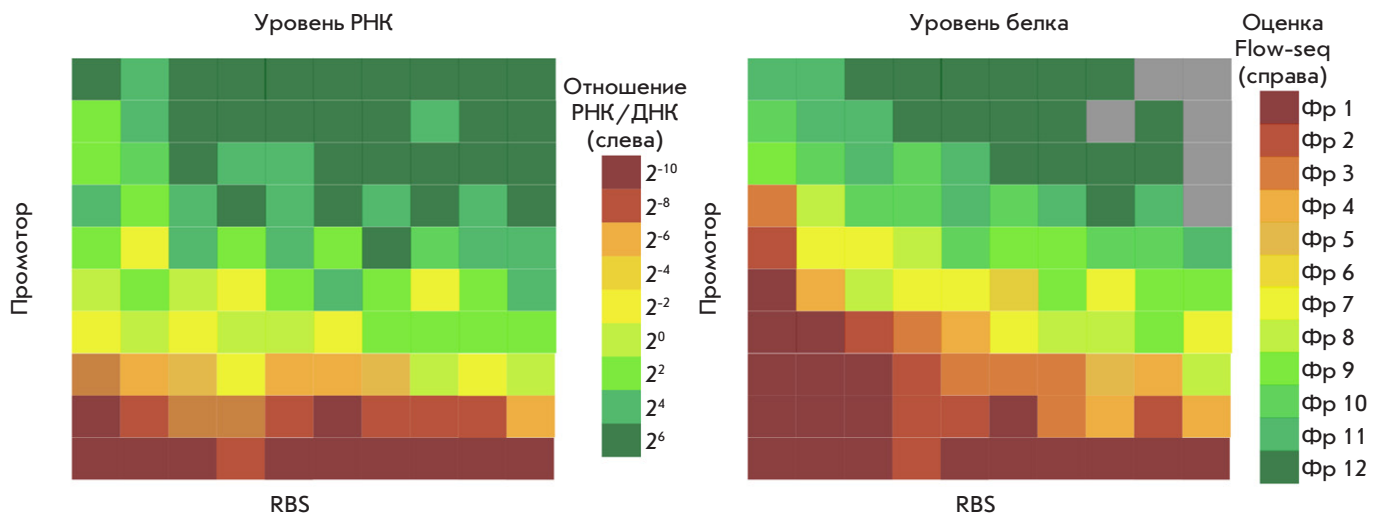


Рис. 4. Схематическое изображение примерных репрезентативных карт уровней эффективности синтеза РНК и белка. Уровни РНК (слева) и белка (справа) для небольшого набора конструкций размещены на сетке согласно идентичности промоторов (ось Y) и сайтов посадки рибосом (RBS, ось X). Промоторы и RBS отсортированы по возрастанию средних значений эффективности синтеза РНК и белка соответственно. Серые клетки указывают на конструкции, соответствующие уровням, лежащим ниже эмпирически заданного порога. Шкалы уровней РНК (отношения РНК к ДНК) и белка (отношения флуоресценции белков GFP (зеленый) к RFP (красный)) показаны справа от соответствующих им карт. Рисунок выполнен, опираясь на источник [67], в программе Inkscaper

вокупностей клеток со сходными соотношениями интенсивности флуоресценции GFP/mCherry выделяли плазмидную ДНК и проводили ее глубокое секвенирование. При этом на экстрагированные последовательности, принадлежащие конкретной группе, «довешивали» специфические для каждой отдельной группы баркодные последовательности, которые служили в дальнейшем для поиска и сортировки последовательностей по ранее определенным группам при анализе ридов, полученных в результате секвенирования. Затем оценивали уровни двух флуоресцентных белков в группах, отношение GFP/mCherry определяли как меру эффективности трансляции, делили клетки по величине этого отношения на три вида: слабые, средние и сильные, и определяли соответствующие им последовательности. При этом, как и ожидалось, клетки в библиотеке содержали примерно одинаковые уровни белка mCherry, интенсивности флуоресценции которого имели нормальное/гауссовское распределение и изменялись в пределах одного порядка, в то время как уровни экспрессии гена *gfp* различались на 4 порядка. С помощью секвенирования были верифицированы 282 отдельные колонии, 55% из которых были правильными, т.е. содержали константные участки без ошибок, и для которых определяли ожидаемые варианты промоторов и сайтов посадки рибосомы без мутаций. Измеряли уровни флуоресценции большинства из этих 55% правильных комбинаций промоторов и RBS и использовали их в дальнейшем в качестве контрольного набора.

Результаты, полученные после крупномасштабного секвенирования ДНК, РНК, измерения уровней экспрессии генов флуоресцентных белков, использовали на следующем этапе в качестве основы для построения репрезентативных карт. При их построении для каждого типа конструкций с конкретными вариантами промотора и сайта связывания рибосомы определяли уровни транскрипции и трансляции (рис. 4). Дальнейший анализ позволил оценить самые эффективные и неэффективные сочетания, содержащиеся в библиотеке полученных конструкций (табл. 2) [67]. Был проведен подробный дисперсионный анализ (ANOVA) [68] уровней РНК и белка, независимо определяемых как промотором, так и сайтом посадки рибосомы. Такой подход помог учесть и эффекты, показывающие зависимость уровня РНК от скорости трансляции.

Для визуализации полученных оценок использовали программы на языках R [69] и Python [70], адаптированные к работе с большими массивами данных. Результаты анализа дисперсий позволили объяснить различия в уровнях РНК в 92.5% случаев выбором промотора, в 3.8% – выбором сайта посадки рибосомы, а оставшиеся 3.7% не удалось объяснить выбором одного из изменяемых элементов. Различия в уровнях белка GFP в 53.8% случаев объясняются выбором промотора, в 29.6% – выбором RBS, остальной процент не определялся ни одним из этих двух вариативных факторов. Таким образом, сделан вывод, что выбор промотора оказывает наибольшее влияние на уровень РНК и в меньшей

Таблица 2. Примеры последовательностей промоторов и сайтов посадки рибосомы (RBS), обеспечивающих неэффективную и эффективную экспрессию

№	Эффективность экспрессии	Промотор	RBS
1	Неэффективная экспрессия	<u>GGCGCGCCTCGACATTTATCCCTTGCGGCGA</u> ATACTTACAGCCATAGCAA	CACCATACACATATG
2		<u>GGCGCGCCTGATAGCTAGCTCAGTCCTAGG</u> GATTATGCTAGCAGATG	ATCTTAATCTAGCGCGGGACAGTTTCATATG
3		<u>GGCGCGCCTCGACAATTAATCATCCGGCTCG</u> ATACTTACAGCCATCGATT	TCTAGAGAAAGACCCGAGACCCATATG
4		<u>GGCGCGCCCACGGTGTAGACATTTATCCCTT</u> GCGGCGAATACTTACAGCCATGTGAA	ATCTTAATCTAGCTTTGGAGTCTTTCATATG
5		<u>GGCGCGCCTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG</u> GATTGTGCTAGCCAATC	TCTAGAGAAAGATTAGAGTCACCATATG
6		<u>GGCGCGCCCACGGTGTAGACAATTAATCAT</u> CCGGCTCGATACTTACAGCCATGATTC	ATCTTAATCTAGCCCGGGAGCATTTCATATG
7		<u>GGCGCGCCTCGACATCAGGAAAATTTTTCTG</u> ATACTTACAGCCATGCGGA	TCTAGAGAAAGACAGGACCCACCATATG
8		<u>GGCGCGCCCACGGTGTAGACATCAGGAAAA</u> TTTTTCTGATACTTACAGCCATCGACC	TCTAGAGAAAGAGCCGACATACCATATG
9		<u>GGCGCGCCTTTATAGCTAGCTCAGCCCTTGGT</u> ACAATGCTAGCGCCTG	ATCTTAATCTAGCCTGGGATCGTTTCATATG
10		<u>GGCGCGCCTTTATGGCTAGCTCAGTCCTAGGT</u> ACAATGCTAGCCATAC	ATCTTAATCTAGCCAGGAACGTTTCATATG
1	Эффективная экспрессия	<u>GGCGCGCCTTGACATCGCATCTTTTTGTACCT</u> ATAATGTGTGGATAGAGT	AATCTCATATATCAAATATAGGGTGGATCA TATG
2		<u>GGCGCGCCAAAAAGAGTATTGACTTCAGGAA</u> AATTTTTCTGTATAATGTGTGGATGTTCA	AATCTCATATATCAAATATAAGGCGGATCA TATG
3		<u>GGCGCGCCAAAAAGAGTATTGACTATTAATC</u> ATCCGGCTCGTATAATAGATTCATTGAAG	ATTAAAGAGGAGAAATTACATATG
4		<u>GGCGCGCCTTGACATCGCATCTTTTTGTACCT</u> ATAATAGATTCATGATGA	AAAGATCTTTAAGAAGGAGATATACATATG
5		<u>GGCGCGCCTTGACATAAAGTCTAACCTATAG</u> GATACTTACAGCCATACAAG	AAAGAGGAGAAATTACATATG
6		<u>GGCGCGCCTTGACATCAGGAAAATTTTTCTG</u> TAGATTAAACGTATAGGTA	AATCTCATAAATCAAATATAAGGGGGATC ATATG
7		<u>GGCGCGCCAAAAAGAGTATTGACTTCGCATC</u> TTTTTGTACCTATAATAGATTCATTGCTA	GAATTCATTAAGAGGAGAAAGGTCATATG
8		<u>GGCGCGCCAAAAAGAGTATTGACTTCGCATC</u> TTTTTGTACCCATAATTAATTCATTCACA	AATCTCATATCTCAAATATAAGGGGGATCA TATG
9		<u>GGCGCGCCAAAAATTTATTTGCTTTTTATCC</u> CTTGCGGCGATATAATAGATTCATCTTAG	AATCTCATAGATCAAATATAGGGGGGATC ATATG
10		<u>GGCGCGCCAAAAATTTATTTGCTTTTCGCAT</u> CTTTTTGTACCTATAATGTGTGGATAATAA	ATCTTAATCTAGCGGGGAGAAATTCATATG

Примечание: примеры комбинаций последовательностей промотора и сайта посадки рибосомы выбраны с учетом наибольших и наименьших значений уровня РНК и трансляции, соответственно, для эффективной и неэффективной экспрессии белка; подчеркнуты последовательности сайтов рестрикции; последние пять нуклеотидов последовательностей промотора служат уникальным баркодом для определения места начала транскрипции. Последовательности приведены в ориентации 5'→3'.

степени на уровень белка, так как на эффективность трансляции влияет и выбор сайта посадки рибосомы, и, возможно, другие факторы [67].

В ряде работ с применением метода Flow-seq изучено влияние последовательностей 5'-нетранслируемых областей разного размера и их отдельных

участков на эффективность синтеза репортерного флуоресцентного белка [2, 39, 71–74].

Варьирование спейсерных участков, расположенных между последовательностью Шайна–Дальгарно и старт-кодоном, позволило создать библиотеки небольшого размера, где 4 и 6 нуклеотидов данного

участка были рандомизированы. При этом удалось получить 100- [39] и 1000-кратную [71] разницу между самым высоким и самым низким количеством белка на выходе соответственно. В первом случае в число самых эффективных и не эффективных вошли следующие последовательности спейсерного участка: сААААсаи, сGAAAсаи, сАUAAсаи, сАUAUсаи и сССGСсаи, сCUCUсаи, сCGCUсаи, сССGUсаи соответственно, окруженные с 5'-конца последовательностью SD (GGAG), а с 3'-конца старт-кодоном (AUG). Во втором случае среди последовательностей, следующих за SD (AAGAAGGA), предшествующих старт-кодону (AUG) и обеспечивающих наибольшую экспрессию, можно выделить gacUAGAGC, gacUGUAAG, gacAAAACC, gacGUGGUU. Интересно, что в обоих случаях среди самых эффективных встречается последовательность СААААС.

В первом случае для создания библиотеки использовали одноцепочечные олигонуклеотиды с четырьмя рандомизированными нуклеотидами в спейсерном участке и необходимыми сайтами рестрикции для последующего встраивания в вектор перед старт-кодоном гена флуоресцентного белка CER. Полученный таким образом набор клонов подвергали сортировке, а выделенные вариативные участки плазмид использовали для NGS-секвенирования [39].

Во втором случае с целью оптимизации синтеза двух конкретных белков, кодируемых генами *araH^{WT}* и *narK^{WT}*, их кодирующие последовательности были соединены с участком, кодирующим добавочную последовательность TEV-GFP-His₈, где TEV – сайт распознавания протеазой вируса гравировки табака (VTM/TEV – tobacco etch virus), His₈ – восьми-гистидиновый таг для дальнейшей очистки. Таким образом, измеряемая флуоресценция GFP может отражать уровни экспрессии интересующих генов. Для создания библиотеки использовали вектор, включающий описанный сложный кодирующий участок под контролем T7-промотора, и два праймера, обратный из которых был константным, а прямой содержал по шесть вариативных нуклеотидов перед и после старт-кодона, причем последние удовлетворяли синонимичным заменам кодонов. Экспрессию индуцировали ИПТГ, после чего клетки сортировали с помощью FACS на отдельные фракции по интенсивности флуоресценции белка GFP. Далее из полученных фракций выделяли библиотеки плазмидных ДНК и подвергали их высокопроизводительному секвенированию [71].

Анализ результатов секвенирования нескольких десятков тысяч различных вариантов мРНК, полученных в двух описанных выше экспериментах,

показал, что низкое содержание GC-нуклеотидов и отсутствие (или минимизация) вторичной структуры мРНК в исследуемом спейсерном участке способствуют увеличению количества синтезируемого белка [39, 71]. Поэтому для увеличения выхода синтезируемого белка кажется разумным использовать олигоадениловые или другие А-богатые спейсеры между последовательностью SD и старт-кодоном, избегая при этом цитидиновых оснований, хотя не стоит исключать некоторые конкретные мРНК с А-богатыми спейсерными участками, которые могут маскировать сайт инициации трансляции в своей вторичной структуре, если, например, начало кодирующей области будет U-богатым.

Эти результаты необходимо учитывать при дизайне репортерных плазмид, когда уровень экспрессии экзогенных генов планируют регулировать в соответствии с конкретной биотехнологической потребностью. Для коэкспрессии генов, продукты которых должны синтезироваться в определенном стехиометрическом соотношении, например, когда белки являются субъединицами гетеромультимерного комплекса, уровни экспрессии этих генов можно отрегулировать путем правильного подбора спейсерных участков.

Определение чувствительности к незначительным изменениям в последовательности регуляторных элементов в 5'-UTR, таких, как последовательность Шайна–Дальгарно, представляет сложную задачу, поскольку небольшие изменения в составе 5'-UTR могут привести к непредсказуемым изменениям в уровне экспрессии гена [34, 75]. Зависимость эффективности трансляции от последовательности 5'-UTR делает возможной эффективную и мультиплексную инженерию при условии, что создаваемые модели способны адекватно предсказывать эти изменения [73].

В качестве еще одного инструмента для проектирования уровня экспрессии генов в биоинженерии разработана ЕМОРЕС, представляющая собой почти полную базу данных измеренных с помощью Flow-seq уровней экспрессии *gfp* в зависимости от присутствия той или иной последовательности SD [76].

Хорошо известно, что влияние конкретной SD в значительной степени зависит от ее генетического контекста [32]. Соответственно, следует соблюдать особую осторожность при повторном применении измеренных уровней экспрессии в биоинженерии метаболических путей или в синтетической биологии, поскольку сайт связывания рибосомы сильно зависит от локальной вторичной структуры мРНК. Однако если последовательности Шайна–Дальгарно можно модифицировать, минимально воздействуя

при этом на вторичную структуру в данной области мРНК, то относительный порядок силы экспрессии конкретной SD вероятно сохранится [73]. Данные особенности учитываются при использовании алгоритма в базе EMOPEC, что позволяет протестировать широкий спектр уровней экспрессии генов при минимальных изменениях в последовательности SD. Это делает возможным параллельное и эффективное редактирование генома, настраивающее уровень экспрессии генов.

Метод Flow-seq многократно использовался для того, чтобы понять, как нуклеотидные последовательности различных участков 5'-UTR влияют на эффективность трансляции. В частности, такому исследованию подвергали сайты посадки рибосомы с фиксированной последовательностью SD [74], 5'-UTR разной фиксированной длины [2] или природные 5'-UTR разной длины [77], а также standby-сайты и спейсерные участки [72]. Анализ десятков тысяч проверенных вариантов позволил получить разницу в пределах 4 и даже 5 порядков в эффективности синтеза репортерного белка. Причем замена одного репортерного белка другим зачастую не влияла на общую тенденцию распределения последовательностей, задающих тот или иной уровень биосинтеза белка, что указывает на то, что эти изменения определяются именно переменными участками мРНК. Схожие наблюдения, связанные с низкой стабильностью вторичной структуры и консервативностью последовательности SD, прослеживались в случае вариантов, определяющих высокую эффективность трансляции [2]. Те же факторы выявлены как значимые для эффективности трансляции репортерного гена, перед которым находился набор природных 5'-UTR, однако в данном случае переменность эффективности трансляции была значительно меньше, чем в случае библиотеки полностью рандомизованных последовательностей 5'-UTR [77]. Встречались и отдельные случаи, свидетельствующие о присутствии AU-богатых энхансеров на 5'-конце в standby-сайте, низкой доле цитидиновых оснований, множественных SD, AG-повторов в 5'-UTR мРНК, обеспечивающих высокий уровень репортерного белка [2].

Сходный подход использовали и для выяснения влияния редких кодонов в начале кодирующей области мРНК на эффективность трансляции [78]. Согласно наблюдениям, редкие кодоны чаще встречаются в начале кодирующей области природных генов, особенно тех, которые экспрессируются на высоком уровне, что, возможно, важно для обеспечения высокого уровня биосинтеза белка [64, 79–82]. По другим данным, редкость кодонов в начале кодирующей области это просто следствие от-

бора, движущей силой которого служит стремление минимизировать вторичную структуру в начале кодирующей области мРНК [19, 78, 82]. В научной литературе продолжается дискуссия о причинах и следствиях возникновения кластера редких кодонов в начале кодирующих областей и о том, насколько эти кластеры влияют на эффективность трансляции. Возможными причинами расхождения во мнениях могут быть особенности получения данных, на которых эти мнения основаны. В частности, различные научные группы использовали для своих выводов природные [79–84] или синтетические последовательности [80, 85–90], а также несколько различающиеся способы анализа [79–90].

Для выяснения причин повышенной частоты встречаемости редких кодонов в начале кодирующей области генов бактерий и ее функциональной роли на основе массива олигонуклеотидов была создана большая библиотека, насчитывающая 14234 комбинации из двух промоторов (сильного и слабого), четырех сайтов посадки рибосомы (сильного, среднего, слабого и природного) и последовательностей первых 13 кодонов 137 генов *E. coli*. Подобные регуляторные элементы были помещены перед геном эффективно сворачивающегося зеленого флуоресцентного белка (sfGFP) в плазмиде, с которой конститутивно коэкспрессируется белок mCherry [78]. Во всей полученной библиотеке измерили уровни ДНК, РНК и белков с помощью DNA-seq, RNA-seq и Flow-seq соответственно.

Гипотеза о “codon ramp” гласит о медленной трансляции первых N-концевых кодонов кодирующей области, что в дальнейшем способствует уменьшению остановок рибосомы во время биосинтеза белка [79, 88, 89]. Некоторое увеличение эффективности трансляции при наличии редких кодонов в начале кодирующей области можно объяснить изменением вторичной структуры мРНК, а не редкостью кодонов как таковых [78]. Наконец, профили покрытия рибосом показали, что концентрация тРНК, которая, собственно, и предопределяет эффективность использования кодонов, не коррелирует со скоростью трансляции. Специфические редкие кодоны могут создавать внутренние мотивы, похожие на последовательность SD, которые, в свою очередь, могут влиять на эффективность трансляции в клетках *E. coli* [64]. Поиск ассоциации между внутренними SD-схожими мотивами и изменениями экспрессии привел к обнаружению слабой, но статистически значимой связи.

Изучение влияния синонимических мутаций на эффективность трансляции позволило сделать следующий вывод [85]. Присутствие редких кодонов в *E. coli*, часто A/T-богатых в третьем положении,

чаще коррелирует с увеличением экспрессии, чем наличие синонимичных кодонов, оканчивающиеся на G/C, что указывает на связь с вторичной структурой мРНК [85]. Также показано, что уменьшение GC-контента коррелирует с увеличением экспрессии белка [78]. С помощью предсказания вторичной структуры РНК для первых 120 оснований каждого транскрипта с использованием специализированной на укладке нуклеиновых кислот программы NUPACK [91] обнаружено, что увеличение силы вторичной структуры коррелирует с уменьшением уровня экспрессии, что объяснило большую вариацию, чем любое другое изменение, оцененное ранее [78].

Позже проанализировали более 30×10^3 вариантов кодонов в положениях 2–11 кодирующей области репортерного флуоресцентного белка, полученных в ходе рандомизации первых 30 нуклеотидов, следующих за старт-кодоном. Ген второго флуоресцентного белка оставался неизменным и служил внутренним контролем. Созданная библиотека плазмид была исследована с помощью метода Flow-seq [28], что позволило подтвердить отрицательное влияние вторичной структуры мРНК на эффективность трансляции, в то время как положительная роль редких кодонов в начале кодирующей области в экспрессии гена не наблюдалась.

В то же время были выявлены следующие закономерности. Некоторые кодоны, находясь в начале кодирующей области, положительно (AUG, AGA, GUA, GCA, CAC, CGA, UAC, AAA, кодирующие дополнительный Met помимо инициаторного, положительно заряженные аминокислоты Arg, Lys, His, гидрофобные алифатические Ala, Val и ароматический Tyr), а некоторые отрицательно (CUC, CCC, CCG, CUG, GGA, GGG, GGC, GCC, кодирующие гидрофобные алифатические аминокислоты и аминокислоты с большей или меньшей конформационной свободой по сравнению с остальными аминокислотами Leu, Pro, Gly, Ala) влияют на уровень экспрессии. Чем ближе соответствующий кодон к инициаторному, тем сильнее его влияние. Дополнительные старт-кодоны в рамке считывания способствуют трансляции. Присутствие в N-концевой области белка аминокислот, на синтез которых клетка тратит много ресурсов, отрицательно сказывалось на эффективности синтеза таких белков в бедной среде.

Применение метода Flow-seq не ограничивается приведенными примерами. Этот метод применяют также для оценки (с помощью репортерных конструкций как биосенсоров в различных штаммах бактерий, в том числе и нокаутных [92]) эффектов, влияющих на гликолитические процессы, для оценки терминаторных последовательностей [93], определения генов, вовлекаемых в изменения

конкретного метаболического пути (с использованием биосенсорных конструкций [94]) и решения других задач, например, исследования сплайсинга [95].

ВКЛАД FLOW-seq В СИНТЕТИЧЕСКУЮ БИОЛОГИЮ

Синтетическая биология – это недавно появившаяся область науки, связанная с дизайном и созданием живых организмов или отдельных процессов в природных организмах [96–98]. Возникла и развивается данная дисциплина благодаря сочетанию технологий генной инженерии и рекомбинантных ДНК с компьютерным моделированием. Таким образом, синтетическая биология стремится определить поведение организмов и процессов в них, чтобы потом модифицировать и объединять их в сложных конкретных задачах. Для надежной работы синтетических составных систем необходимо, чтобы составляющие систему белки образовывались в заранее заданных соотношениях [97].

Созданы три программы-калькулятора, которые оценивают эффективность трансляции на основе последовательностей 5'-UTR мРНК, так как считается, что общая скорость трансляции пропорциональна скорости инициации. Такие калькуляторы, как показано, дают адекватные оценки уровня биосинтеза белка.

Первым из трех калькуляторов является RBS Calculator [33, 99]. В основу его создания как метода предсказательного дизайна контролируемой инициации трансляции и белкового синтеза в бактериях [32, 33] легла ранее рассмотренная термодинамическая модель. Использование этого метода позволяет изменять эффективность трансляции в диапазоне 5 порядков величины [33, 34]. Однако предсказания, сделанные с помощью RBS Calculator, не всегда совпадают с экспериментальными данными, полученными как с помощью Flow-seq, так и путем тестирования индивидуальных репортерных конструкций [2].

Еще один вычислительный метод моделирования 5'-UTR, способный предсказывать эффективность трансляции по последовательности мРНК с той или иной 5'-UTR – UTR Designer или UTR Library Designer [100, 101]. В этом методе, сходном с программой RBS Calculator, используется термодинамический параметр, определяемый как разница в свободной энергии Гиббса до и после сборки инициаторного комплекса 30S на мРНК, и учитывается аффинность взаимодействия рибосомы и доступность мРНК и рибосомы. Как и RBS Calculator, эта программа имеет два варианта дизайна: в прямом происходит генерирование 5'-UTR с заданным уровнем эффективности трансляции желаемой последовательности белка. В обратном варианте пред-

сказывается уровень биосинтеза белка с введенной последовательности мРНК с 5'-UTR и первыми 35 нуклеотидами белок-кодирующей области. Принцип работы описанного метода создания библиотеки мРНК с различными 5'-UTR заключается в генерировании последовательностей 5'-UTR с помощью рандомизации нуклеотидов, комбинаторного перебора вариантов конструкций с выбором тех, которые будут обеспечивать желаемый уровень трансляции белка. Более того, можно отметить константную часть в 5'-UTR, присутствие которой обязательно в результирующей последовательности, тогда комбинаторный перебор будет затрагивать только ее окружение. Валидация данного метода проведена на двух библиотеках 5'-UTR, содержащих 16 последовательностей с разными уровнями трансляции в заданном диапазоне, с использованием флуоресцентного репортера; результаты предсказания *in silico* хорошо соответствовали измеренным данным *in vivo* [100]. Однако далеко не всегда предсказания описанного подхода коррелируют с результатами, полученными *in vivo* на других выборках последовательностей 5'-UTR в выбранном диапазоне эффективностей биосинтеза белка.

Последний RBS Designer, как и два предыдущих, рассчитывает свободные энергии, но отличается по методу расчета скорости трансляции. Имея в основе стационарную кинетическую модель, этот калькулятор оценивает вероятность связывания конкретной мРНК с рибосомой (эффективность трансляции), исходя из вероятности доступности представленного участка мРНК, содержащего RBS, и аффинности связывания рибосомы. Каждая из этих программ показала схожую точность предсказания [97].

На данный момент представлено несколько моделей предсказаний, построенных благодаря большому количеству данных, полученных методами крупномасштабного секвенирования, анализу различных библиотек и результатам других генно-инженерных методов. В качестве примера можно привести возможное предсказание сайтов инициации трансляции, полезное для локализации белок-кодирующих участков генов при компьютерной аннотации бактериальных и архейных геномов [102], а также предсказание возможных геномных последовательностей, которые соответствуют функциональным мотивам РНК [103], или же предсказание уровня экспрессии генов с новыми комбинациями генетических элементов [75].

Даже экспериментальная проверка эффективности трансляции, определяемой каким-либо участком связывания в модельной системе, не может гарантировать, что такая же эффективность будет

наблюдаться, если заменить последовательность кодирующей области. Так происходит, например, из-за образования вторичных структур при комплементарности кодирующей области и 5'-UTR. Для того, чтобы сделать уровень экспрессии любого гена, экспрессируемого в гетерологичной системе, более предсказуемым, было проведено исследование с помощью специально созданных бицистронных конструкций. В этом исследовании короткая стандартная рамка считывания предшествовала кодирующей области репортера, эффективность экспрессии которого определяли цитофлуориметрически. Рамки перекрывались с помощью рандомизированного участка реинициации трансляции. Таким образом установлено, что использование реинициации снимает зависимость эффективности трансляции от кодирующей области второго гена. В таком искусственном опероне в качестве второго гена использовали как *gfp*, так и *rfp*. Результирующие уровни экспрессии этих разных генов хорошо коррелировали между собой [75].

Таким образом, экспериментальное определение эффективности экспрессии с помощью цитофлуориметрии или Flow-seq можно прямо и надежно использовать при создании экспрессионных конструкций в синтетической биологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Flow-seq-метод комбинирует гибкие способы генной биоинженерии с клеточной сортировкой на основе проточной цитометрии и глубокого секвенирования ДНК, чтобы обеспечить всестороннюю оценку взаимосвязей между генотипом и фенотипом. Одно из применений Flow-seq заключается в изучении влияния специфических регуляторных элементов на синтез белка (табл. 1). Дизайн направленных изменений на основе репортерных конструкций с использованием генов флуоресцентных белков позволяет быстро и эффективно выяснить вклад конкретных вариантов регуляторных последовательностей в эффективность синтеза белка. Как и другие методы изучения влияния элементов 5'-нетранслируемой области мРНК на эффективность трансляции, данный подход имеет свои особенности, которые следует учитывать при планировании комплексного и многоступенчатого эксперимента. Несмотря на большие возможности рассматриваемого метода, его применение имеет свои ограничения, обусловленные прежде всего сложностями, возникающими на разных стадиях: при клонировании библиотеки ДНК, при сортировке клеток с разными соотношениями интенсивностей флуоресценции репортерных белков, при высокопроизводительном секвенировании, анализе полученных ридов и в по-

следующих расчетах. В число ограничений входит и использование всего двух флуоресцентных белков или других детектируемых реагентов такого рода, поскольку существует возможность перекрывания спектров флуоресценции этих белков и, как следствие, ошибок при регистрации сигналов. Тем не ме-

нее, метод Flow-seq широко используется в разных областях научных исследований и не теряет актуальность на протяжении многих лет. ●

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 17-00-00369, 17-00-00366, 17-00-00367.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Saier M.H. Jr. // *J. Bacteriol.* 2019. V. 201. № 15. P. e00091–e119.
- Evfratov S.A., Osterman I.A., Komarova E.S., Pogorelskaya A.M., Rubtsova M.P., Zatsepin T.S., Semashko T.A., Kostryukova E.S., Mironov A.A., Burnaev E., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 6. P. 3487–3502.
- Brenneis M., Soppa J. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 2. P. e4484.
- Shine J., Dalgarno L. // *Nature.* 1975. V. 254. P. 34–38.
- Shine J., Dalgarno L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974. V. 71. № 4. P. 1342–1346.
- Kozak M. // *Gene.* 2005. V. 361. P. 13–37.
- Shultzaberger R.K., Bucheimer R.E., Rudd K.E., Schneider T.D. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. № 1. P. 215–228.
- Rudd K.E. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 60–64.
- Ma J., Campbell A., Karlin S. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. P. 5733–5745.
- Gardner P.P., Eldai H. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 2. P. 691–698.
- Schluenzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F., et al. // *Cell.* 2000. V. 102. P. 615–623.
- Kaminishi T., Wilson D.N., Takemoto C., Harms J.M., Kawazoe M., Schluenzen F., Hanawa-Suetsugu K., Shirouzu M., Fucini P., Yokoyama S. // *Structure.* 2007. V. 15. P. 289–297.
- Arenz S., Wilson D.N. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 9. P. a025361.
- Wegmann U., Horn N., Carding S.R. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 6. P. 1980–1989.
- Nakagawa S., Niimurab Y., Miurac K.-i., Gojobori T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 14. P. 6382–6387.
- Vimberg V., Tats A., Remm M., Tenson T. // *BMC Mol. Biol.* 2007. V. 8. P. 100.
- Osterman I.A., Evfratov S.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. P. 474–486.
- Chen H., Bjerknes M., Kumar R., Jay E. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4953–4957.
- Gu W., Zhou T., Wilke C.O. // *PLoS Comput. Biol.* 2010. V. 6. P. e1000664.
- Gingold H., Pilpel Y. // *Mol. Systems Biol.* 2011. V. 7. P. 481.
- de Smit M.H., van Duin J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 7668–7672.
- Sean M.S., Simpson J. // *Mol. Cell.* 2006. V. 22. P. 105–115.
- Ban N., Beckmann R., Cate J.H., Dinman J.D., Dragon F., Ellis S.R., Lafontaine D.L., Lindahl L., Liljas A., Lipton J.M., et al. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 24. P. 165–169.
- Laursen B.S., Sorensen H.P., Mortensen K.K., Sperling-Petersen H.U. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2005. V. 69. P. 101–123.
- Lauber M.A., Rappsilber J., Reilly J.P. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2012. V. 11. P. 1965–1976.
- Stenström C.M., Isaksson L.A. // *Gene.* 2002. V. 288. P. 1–8.
- Gonzalez de Valdivia E.I., Isaksson L.A. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 17. P. 5198–5205.
- Osterman I.A., Chervontseva Z.S., Evfratov S.A., Sorokina A.V., Rodin V.A., Rubtsova M.P., Komarova E.S., Zatsepin T.S., Kabilov M.R., Bogdanov A.A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2020. V. 48. P. 6931–6942.
- Park Y.S., Seo S.W., Hwang S., Chu H.S., Ahn J.-H., Kim T.-W., Kim D.-M., Jung G.Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 356. № 1. P. 136–141.
- Barendt P.A., Shah N.A., Barendt G.A., Sarkar C.A. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. P. e1002598.
- Barendt P.A., Shah N.A., Barendt G.A., Kothari P.A., Sarkar C.A. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 5. P. 958–966.
- Salis H.M., Mirsky E.A., Voigt C.A. // *Nat. Biotechnol.* 2009. V. 27. № 10. P. 946–950.
- Salis H.M. // *Meth. Enzymol.* 2011. V. 498. P. 19–42.
- Borujeni A.E., Channarasappa A.S., Salis H.M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 4. P. 2646–2659.
- Hofacker I.L. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 13. P. 3429–3431.
- Farasat I., Kushwaha M., Collens J., Easterbrook M., Guido M., Salis H.M. // *Mol. Syst. Biol.* 2014. V. 10. P. 731.
- Nakeff A., Valeriote F., Gray J.W., Grabske R.J. // *Blood.* 1979. V. 53. № 4. P. 732–745.
- Solieri L., Dakal T.C., Giudici P. // *Ann. Microbiol.* 2012. V. 63. P. 21–37.
- Komarova E.S., Chervontseva Z.S., Osterman I.A., Evfratov S.A., Rubtsova M.P., Zatsepin T.S., Semashko T.A., Kostryukova E.S., Bogdanov A.A., Gelfand M.S., et al. // *Microb. Biotechnol.* 2020. V. 13. P. 1254–1261.
- Kim D., Hong J.S.-J., Qiu Y., Nagarajan H., Seo J.-H., Cho B.K., Tsai S.F., Palsson B.Ø. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 8. P. e1002867.
- Lesnik E.A., Fogel G.B., Weekes D., Henderson T.J., Levene H.B., Sampath R., Ecker D.J. // *BioSystems.* 2005. V. 80. P. 145–154.
- Gould P.S., Bird H., Easton A.J. // *BioTechniques.* 2005. V. 38. P. 397–400.
- Shirokikh N.E., Alkalaeva E.Z., Vassilenko K.S., Afonina Z.A., Alekhina O.M., Kisselev L.L., Spirin A.S. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 3. P. e15.
- Wen J.-D., Kuo S.-T., Chou H.-H.D. // *RNA Biol.* 2021. V. 18. № 11. P. 1489–1500.
- Tzareva N.V., Makhno V.I., Boni I.V. // *FEBS Lett.* 1994. V. 337. P. 189–194.
- Zheng X., Hu G.Q., She Z.S., Zhu H. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 361.
- Ingolia N.T., Ghaemmhami S., Newman J.R., Weissman J.S. // *Science.* 2009. V. 324. № 5924. P. 218–223.
- Andreev D.E., O'Connor P.B., Fahey C., Kenny E.M., Terenin I.M., Dmitriev S.E., Cormican P., Morris D.W., Shatsky I.N., Baranov P.V. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e03971.
- Andreev D.E., O'Connor P.B., Zhdanov A.V., Dmitriev R.I., Shatsky I.N., Papkovsky D.B., Baranov P.V. // *Genome Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 90.
- Meydan S., Marks J., Klepacki D., Sharma V., Baranov P.V., Firth A.E., Margus T., Kefi A., Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. // *Mol. Cell.* 2019. V. 74. № 3. P. 481–493.e6.
- Brar G.A., Weissman J.S. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2015. V. 16. № 11. P. 651–664.

52. Reid D.W., Shenolikar S., Nicchitta C.V. // *Methods*. 2015. V. 91. P. 69–74.
53. Ingolia N.T., Husmann J.A., Weissman J.S. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2019. V. 11. № 5. P. a032698.
54. Weaver J., Mohammad F., Buskirk A.R., Storz G. // *mBio*. 2019. V. 10. № 2. P. e02819–18.
55. Meydan S., Klepacki D., Mankin A.S., Vázquez-Laslop N. // *Meth. Mol. Biol.* 2021. V. 2252. P. 27–55.
56. Vazquez-Laslop N., Sharma C.M., Mankin A., Buskirk A.R. // *J. Bacteriol.* 2022. V. 204. № 1. P. e0029421.
57. O'Connor P.B., Andreev D.E., Baranov P.V. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12915.
58. Andreev D.E., O'Connor P.B., Loughran G., Dmitriev S.E., Baranov P.V., Shatsky I.N. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 2. P. 513–526.
59. Glaub A., Huptas C., Neuhaus K., Ardern Z. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 27. P. 8999–9011.
60. Gerashchenko M.V., Gladyshev V.N. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 2. P. e6.
61. Marks J., Kannan K., Roncase E.J., Klepacki D., Kefi A., Orelle C., Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 43. P. 12150–12155.
62. Vázquez-Laslop N., Mankin A.S. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2018. V. 72. P. 185–207.
63. Svetlov M.S., Koller T.O., Meydan S., Shankar V., Klepacki D., Polacek N., Guydosh N.R., Vázquez-Laslop N., Wilson D.N., Mankin A.S. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2803.
64. Li G.W., Oh E., Weissman J.S. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7395. P. 538–541.
65. Mohammad F., Woolstenhulme C.J., Green R., Buskirk A.R. // *Cell Rep.* 2016. V. 14. № 4. P. 686–694.
66. Jin H., Zhao Q., Gonzalez de Valdivia E.I., Ardell D.H., Stenström M., Isaksson L.A. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 60. № 2. P. 480–492.
67. Kosuri S., Goodman D.B., Cambray G., Mutalik V.K., Gao Y., Arkin A.P., Endy D., Church G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 34. P. 14024–14029.
68. Mutalik V.K., Guimaraes J.C., Cambray G., Mai Q.A., Christoffersen M.J., Martin L., Yu A., Lam C., Rodriguez C., Bennett G., Keasling J.D., Endy D., Arkin A.P. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. P. 347–353.
69. Dessau R.B., Pipper C.B. // *Ugeskr. Laeger* 2008. V. 170. P. 328–330.
70. Sanner M.F. // *J. Mol. Graph. Model.* 1999. V. 17. P. 57–61.
71. Mirzadeh K., Martinez V., Toddo S., Guntur S., Herrgard M.J., Elofsson A., Norholm M.H., Daley D.O. // *ACS Synth. Biol.* 2015. V. 4. P. 959–965.
72. Sauer C., van Themaat E.V.L., Boender L.G.M., Groothuis D., Cruz R., Hamoen L.W., Harwood C.R., van Rij T. // *ACS Synth. Biol.* 2018. V. 7. № 7. P. 1773–1784.
73. Klausen M.S., Sommer M.O.A. // *Meth. Mol. Biol.* 2018. V. 1671. P. 3–14.
74. Duan Y., Zhang X., Zhai W., Zhang J., Zhang X., Xu G., Li H., Deng Z., Shi J., Xu Z. // *ACS Synth. Biol.* 2022. V. 11. № 8. P. 2726–2740.
75. Mutalik V.K., Guimaraes J.C., Cambray G., Lam C., Christoffersen M.J., Mai Q.-A., Tran A.B., Paull M., Keasling J.D., Arkin A.P., et al. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. P. 354–360.
76. Bonde M.T., Pedersen M., Klausen M.S., Jensen S.I., Wulff T., Harrison S., Nielsen A.T., Herrgård M.J., Sommer M.O. // *Nat. Meth.* 2016. V. 13. P. 233–236.
77. Komarova E.S., Slesarchuk A.N., Rubtsova M.P., Osterman I.A., Tupikin A.E., Pyshnyi D.V., Dontsova O.A., Kabilov M.R., Sergiev P.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 20. P. 12293.
78. Goodman D.B., Church G.M., Kosuri S. // *Science*. 2013. V. 342. № 6157. P. 475–479.
79. Tuller T., Carmi A., Vestsigian K., Navon S., Dorfan Y., Zaborske J., Pan T., Dahan O., Furman I., Pilpel Y. // *Cell*. 2010. V. 141. № 2. P. 344–354.
80. Allert M., Cox J.C., Hellinga H.W. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 402. № 5. P. 905–918.
81. Pechmann S., Frydman J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 2. P. 237–243.
82. Bentele K., Saffert P., Rauscher R., Ignatova Z., Blüthgen N. // *Mol. Syst. Biol.* 2013. V. 9. P. 675.
83. dos Reis M., Savva R., Wernisch L. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 17. P. 5036–5044.
84. Shah P., Ding Y., Niemczyk M., Kudla G., Plotkin J.B. // *Cell*. 2013. V. 153. № 7. P. 1589–1601.
85. Kudla G., Murray A.W., Tollervey D., Plotkin J.B. // *Science*. 2009. V. 324. № 5924. P. 255–258.
86. Welch M., Govindarajan S., Ness J.E., Villalobos A., Gurney A., Minshull J., Gustafsson C. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. P. e7002.
87. Zhou M., Guo J., Cha J., Chae M., Chen S., Barral J.M., Sachs M.S., Liu Y. // *Nature*. 2013. V. 495. № 7439. P. 111–115.
88. Navon S., Pilpel Y. // *Genome Biol.* 2011. V. 12. № 2. P. R12.
89. Tuller T., Waldman Y.Y., Kupiec M., Ruppin E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 8. P. 3645–3650.
90. Subramaniam A.R., Pan T., Cluzel P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 6. P. 2419–2424.
91. Zadeh J.N., Steenberg C.D., Bois J.S., Wolfe B.R., Pierce M.B., Khan A.R., Dirks R.M., Pierce N.A. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 32. № 1. P. 170–173.
92. Lehning C.E., Siedler S., Ellabaan M.M.H., Sommer M.O.A. // *Metab. Eng.* 2017. V. 42. P. 194–202.
93. Zhai W., Duan Y., Zhang X., Xu G., Li H., Shi J., Xu Z., Zhang X. // *Synth. Syst. Biotechnol.* 2022. V. 7. № 4. P. 1046–1055.
94. Glanville D.G., Mullineaux-Sanders C., Corcoran C.J., Burger B.T., Imam S., Donohue T.J., Ulijasz A.T. // *mSystems*. 2021. V. 6. № 1. P. e00933–20.
95. Cheung R., Insigne K.D., Yao D., Burghard C.P., Wang J., Hsiao Y.E., Jones E.M., Goodman D.B., Xiao X., Kosuri S. // *Mol. Cell*. 2019. V. 73. № 1. P. 183–194.e8.
96. Andrianantoandro E., Basu S., Karig D.K., Weiss R. // *Mol. Systems Biol.* 2006. V. 2. P. 2006.0028.
97. Reeve B., Hargest T., Gilbert C., Ellis T. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014. V. 2. P. 1–6.
98. Chappell J., Jensen K., Freemont P.S. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 5. P. 3471–3481.
99. Zhang L., Lin X., Wang T., Guo W., Lu Y. // *Bioresour. Bioprocess.* 2021. V. 8. № 1. P. 58.
100. Seo S.W., Yang J.S., Kim I., Yang J., Min B.E., Kim S., Jung G.Y. // *Metab. Eng.* 2013. V. 15. P. 67–74.
101. Seo S.W., Yang J.S., Cho H.S., Yang J., Kim S.C., Park J.M., Kim S., Jung G.Y. // *Sci. Rep.* 2015. V. 4. № 1. P. 4515.
102. Zhu H., Wang Q. // *Curr. Bioinform.* 2014. V. 9. P. 155–165.
103. Laserson U., Gan H.H., Schlick T. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 18. P. 6057–6069.

УДК 577.1

Объемные аддукты в составе кластерных повреждений ДНК: причины устойчивости к удалению системой NER

Н. В. Науменко^а, И. О. Петрусева^а, О. И. Лаврик*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

^а Авторам принадлежит равный вклад в написание статьи

*E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.05.2022

Принята к печати 18.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11741

РЕФЕРАТ Система эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) удаляет из ДНК различные объемные повреждения, которые вызывают существенные искажения регулярной структуры двойной спирали. Такие повреждения, в основном ковалентные аддукты, сформированные по азотистым основаниям ДНК, могут появляться под действием ультрафиолетового и ионизирующего излучения, а также в результате взаимодействия ДНК с химически активными веществами эндогенного и экзогенного происхождения. В условиях роста количества повреждений ДНК, например, при проведении интенсивной химио- и комплексной терапии, а также при нарушении процессов репарации ДНК, объемные аддукты могут оказываться в составе кластерных повреждений. Кластерные повреждения представляют собой два или более повреждений, расположенных в пределах одного или двух витков спирали ДНК. Несмотря на то что репарация одиночных повреждений ДНК системой NER в эукариотической клетке изучена достаточно полно, в механизме репарации объемных повреждений, расположенных в составе кластеров, многое остается неясным. Выявление структурных особенностей участков ДНК, содержащих нерепарируемые кластерные повреждения, представляет значительный интерес, в том числе ввиду взаимосвязи между эффективностью действия некоторых противоопухолевых препаратов и активностью клеточных систем репарации. В обзоре проанализированы данные о формировании кластерных повреждений, содержащих объемные аддукты, потенциальной биологической значимости таких повреждений, а также о методах оценки их количества, рассмотрены причины подавления катализируемой системой NER эксцизии объемных повреждений из состава кластеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эксцизионная репарация нуклеотидов, объемные повреждения ДНК, кластерные повреждения ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ B[a]P-dG – аддукт производного бенз[а]пирена с гуанином; BER – эксцизионная репарация оснований; VHD – β-шпилечный домен белка XPC; CPD – циклобутан-пиримидиновый димер; ICL – межцепочечная сшивка ДНК; nAnt – ненуклеотидная вставка в ДНК с объемным антраценилкарбамоильным заместителем; NER – эксцизионная репарация нуклеотидов; nFlu – ненуклеотидная вставка в ДНК с объемным флуоресцеинкарбамоильным заместителем; AP-сайт – апуриновый/апиридининовый сайт; ИИ – ионизирующее излучение.

ВВЕДЕНИЕ

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) удаляет из ДНК разнообразные повреждения, подавляющая часть которых представляет собой объемные аддукты, вносящие существенные искажения в регулярную двухцепочечную структуру ДНК. Инициация процесса NER может проходить по двум путям:

общегеномному (global genome, GG-NER) и сопряженному с транскрипцией (transcription-coupled, TC-NER). В сопряженном с транскрипцией пути узнаются повреждения, расположенные в транскрибируемых цепях активных генов [1, 2]. Процесс TC-NER запускается остановкой комплекса РНК-полимеразы II, которая происходит при встрече фермента с объемным повреждением в транс-

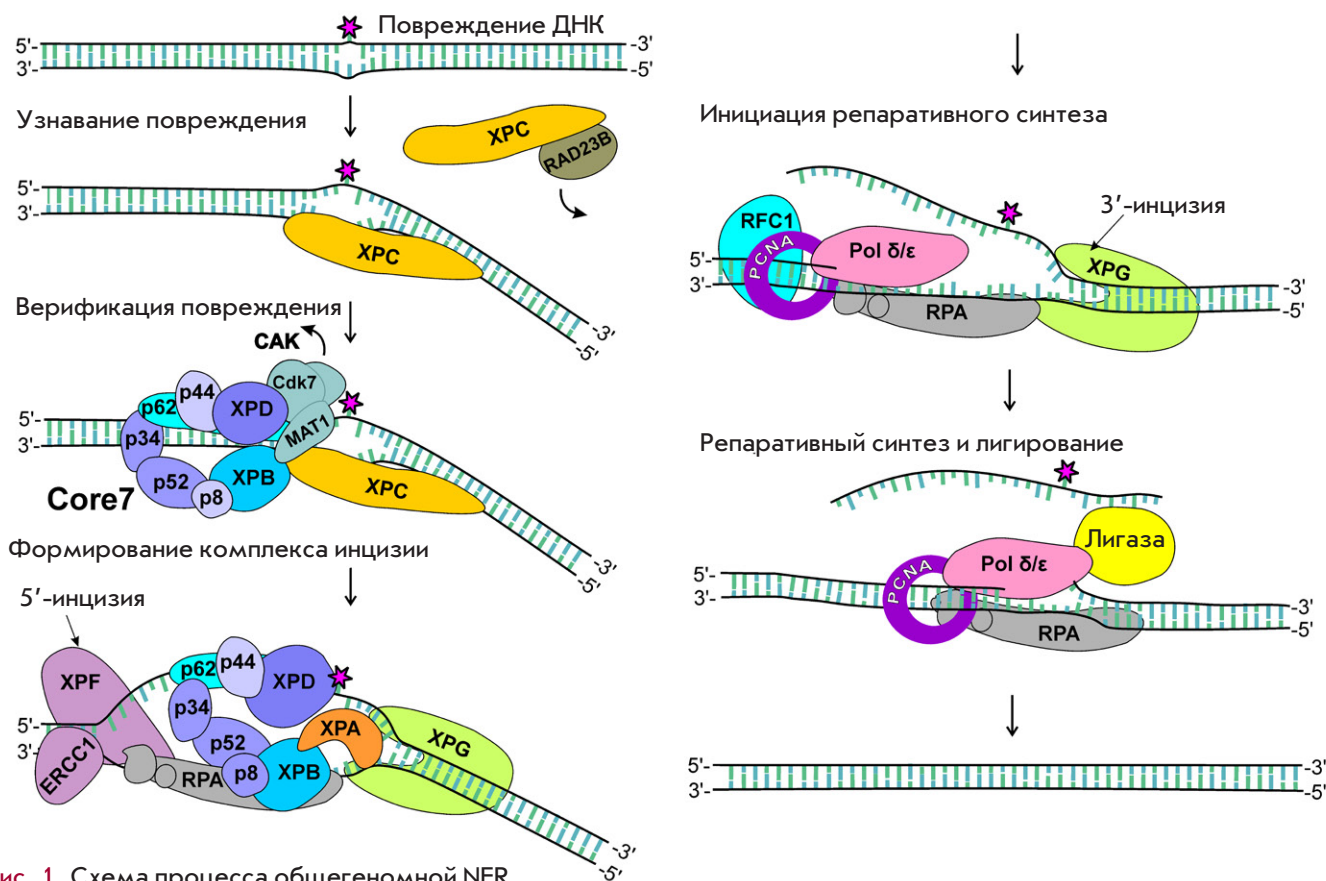


Рис. 1. Схема процесса общегеномной NER

крибируемой цепи ДНК. По пути GG-NER удаляются повреждения, расположенные во всем геноме, включая его нетранскрибируемые участки и молчащий хроматин. Роль сенсора повреждений в GG-NER выполняют комплексы фактора XPC. Начиная со второго этапа репарации – верификации повреждения, процессы GG-NER и TC-NER осуществляются одним набором белковых факторов и ферментов. Повреждения удаляются из ДНК вместе с окружающим их участком цепи длиной 24–32 нуклеотидных звена. Образовавшаяся брешь заполняется с помощью репаративного синтеза (рис. 1) [3, 4]. В общей сложности в процессе NER участвует более 30 ферментов и белковых факторов, последовательно формирующих на ДНК в районе повреждения комплексы переменного состава, вовлекая во взаимодействие обе цепи ДНК на участке, размер которого соответствует двум-трем виткам спирали.

Несколько повреждений, находящихся в пределах одного или двух витков спирали ДНК, называют кластерным повреждением (кластером) [5]. В состав кластеров могут входить различные повреждения: окисленные азотистые основания, AP-сайты и другие «необъемные» повреждения, разрывы цепей ДНК, а также звенья цепи ДНК, содержащие

объемные аддукты [5–7]. В последние годы достигнут большой прогресс в понимании процесса репарации одиночных повреждений системой NER [8]. Механизм удаления объемных повреждений, расположенных в составе кластеров, изучен не так хорошо. В ряде исследований показано, что при появлении дополнительного повреждения ДНК вблизи объемного аддукта часто снижается эффективность его удаления системой NER [9–11]. Кроме того, одновременная эксцизия повреждений, находящихся в противоположных цепях ДНК-дуплекса, может приводить к образованию двухцепочечных разрывов, потенциально летальных для клетки [12]. С другой стороны, высокая активность систем репарации в отношении индуцированных повреждений ДНК опухолевой клетки снижает эффективность действия противоопухолевых препаратов [13, 14]. Исследование механизмов взаимодействия белков репарации с повреждениями, находящимися в составе кластеров, выяснение взаимосвязи между структурой участка ДНК, содержащего повреждения, возникающие в ДНК клетки в процессе терапии, и их устойчивостью к репарации, имеет, таким образом, и практическое значение.

В представленном обзоре проанализированы данные о репарации объемных повреждений ДНК,

входящих в состав кластеров, а также рассмотрена потенциальная биологическая значимость таких повреждений. Приведены примеры подавления эксцизии объемных повреждений в результате непродуктивного для NER связывания сенсорного фактора ХРС с поврежденной ДНК. Проанализированы особенности структуры участков ДНК, содержащих кластерные повреждения, устойчивые к удалению системой NER.

ВИДЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, УДАЛЯЕМЫХ СИСТЕМОЙ NER, И ПРИЧИНЫ ИХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ

Объемные повреждения ДНК – в основном ковалентные аддукты азотистых оснований (рис. 2), образуются в результате воздействия ультрафиолетового излучения (пиримидин-(6,4)-пиримидиновые фотопродукты и цикlobутан-пиримидиновые димеры, структуры повреждений приведены на рис. 2А) и ионизирующего излучения (ИИ) высокой мощности (например, окисленные основания 8,5'-цикло-2'-дезоксипурины, рис. 2Б, слева, и аддукты окисленных метаболитов эстрогенов, рис. 2Б, справа) [15–17]. Объемные повреждения ДНК образуются также при попадании в организм химически активных либо активированных клеточным метаболизмом веществ: продуктов неполного сгорания топлив, например, производных бенз[а]пирена (рис. 2В, слева), компонентов табачного дыма – специфических для табака нитрозаминов (рис. 2В, справа) [18–20], веществ, способствующих формированию сшивок ДНК–белок [21], некоторых природных веществ (например, аристолоховых кислот) [22]. Многие из этих повреждений трудно репарируемы и имеют тенденцию к накоплению в организме [10, 23, 24].

Цитостатическое действие многих химиотерапевтических препаратов основано на их способности формировать объемные аддукты при взаимодействии с ДНК. К таким препаратам относятся Pt-содержащие препараты (карбоксиплатин, оксалиплатин, цисплатин; структура цисплатиновой сшивки двух цепей ДНК представлена на рис. 2Г, сверху) [14, 25], алкилирующие варианты азотистых ипритов (мехлорэтамин, циклофосфамид, ацилфульвен) [25, 26], малобороздочные лиганды, митомицины [27], а также лекарства антрациклинового ряда, способные формировать с ДНК ковалентные аддукты в присутствии эндогенного формальдегида (рис. 2Г, снизу) [28].

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ КОЛИЧЕСТВА ОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ

Определение количества повреждений ДНК является сложной задачей, поскольку содержание поврежденных нуклеотидных звеньев в общем массиве

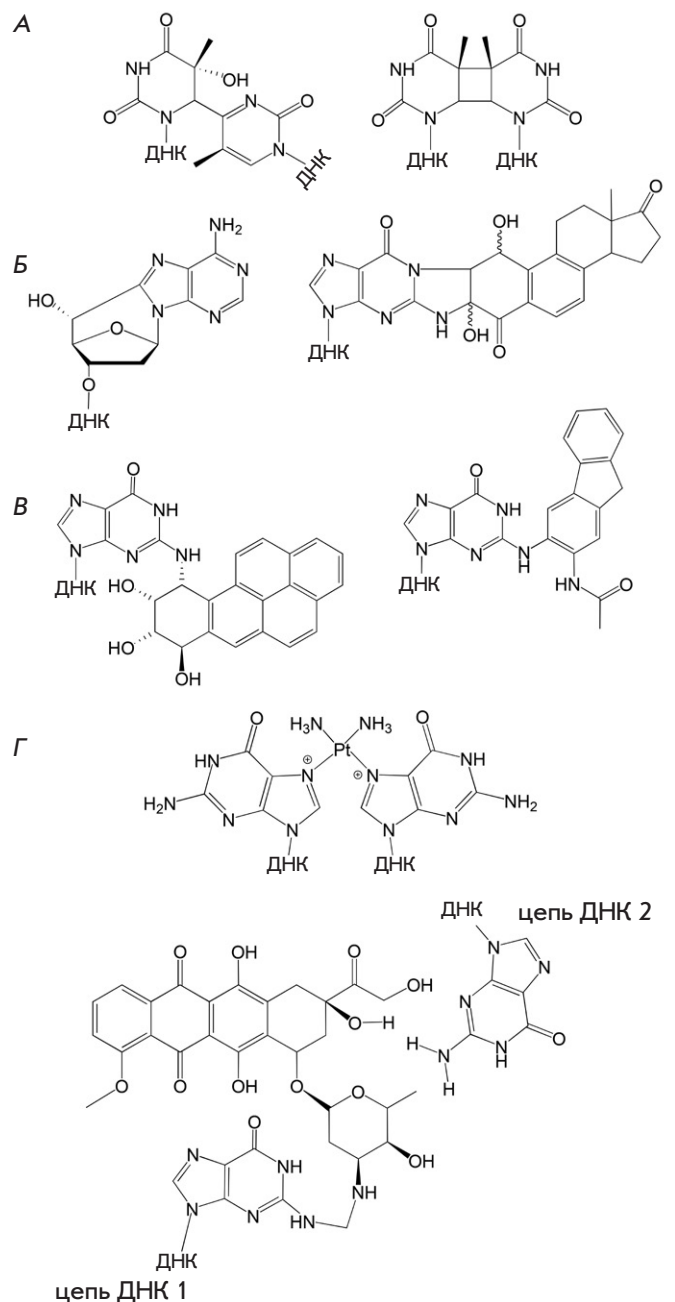


Рис. 2. Примеры повреждений ДНК, удаляемых системой NER. А – УФ-индуцированные повреждения: пиримидин-(6,4)-пиримидиновый фотопродукт (слева) и цикlobутан-пиримидиновый димер (справа). Б – ИИ-индуцированные повреждения: 8,5'-цикло-2'-дезоксиаденозин (слева) и аддукт 4-гидроксиэквиленина с гуанином (справа). В – модификации, возникшие в результате действия на ДНК химически активных метаболитов веществ, попадающих в организм из окружающей среды: аддукт бензо[а]пирендиол-эпоксида с гуанином (слева) и пиридилособутильный аддукт гуанина (справа). Г – повреждения, возникающие при проведении химиотерапии: аддукт цисплатина с ДНК (сверху) и аддукт доксорубицина с ДНК (снизу)

ДНК относительно мало, а их структура и свойства разнообразны. Для обнаружения и определения количества объемных аддуктов, возникающих в ДНК, используется широкий набор методов. Помимо широко известного варианта электрофореза на уровне одной клетки в щелочных условиях («щелочной метод ДНК-комет») [29], применяются методики, основанные на использовании радиоактивного меченя с ограниченной специфичностью, но высокой чувствительностью, детектирующие один аддукт на 10^9 - 10^{10} нуклеотидов [30–32]. Кроме того, применяются более селективные методики, основанные на использовании специфических к повреждению антител (уровень детекции – один аддукт на 10^8 нуклеотидов) [18, 33, 34] и новых вариантов полимеразной цепной реакции [35]. Для определения количества повреждений методом атомной абсорбционной спектроскопии необходим образец объемом 10–50 мкл с предполагаемой концентрацией определяемого элемента от 10^{-3} до 10^{-6} М [36].

Наиболее высокую точность оценки количества и специфичность в отношении типа повреждений обеспечивает применение масс-спектрометрических подходов. Единственное ограничение масс-спектрометрического подхода состоит в том, что для получения количественных данных необходимо использовать изотопно-меченый внутренний стандарт, чтобы можно было учесть образование и потерю повреждений при обработке образца [37–41].

В некоторых случаях результаты количественных оценок расходятся, что может быть связано как с несовершенством использованных методик, так и с особенностями структуры исследуемых повреждений [42]. Подобные расхождения особенно характерны для образцов тканей пациента, опухолевых тканей, перевиваемых опухолей, культивируемых клеток пациента и «жидких биопсий», взятых у пациентов, – особенно в тех случаях, когда используется комплексная (комбинированная) терапия [25]. Дальнейшее совершенствование методов оценки количества повреждений ДНК имеет важное значение как для выявления нежелательных токсических воздействий на ДНК живого организма, так и для получения объективных данных о терапевтическом воздействии, выраженных в количестве индуцированных повреждений, сохранившихся в ДНК.

МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ КЛАСТЕРНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ОБЪЕМНЫЕ АДДУКТЫ

По грубым оценкам, в ДНК человеческой клетки ежедневно образуются 10^4 - 10^6 повреждений [12]. В результате поврежденным оказывается

лишь ~0.0002-0.02% человеческого генома. Однако повреждения ДНК распределяются по геному неравномерно, часто концентрируясь в определенных позициях, называемых «горячие точки мутагенеза». Расположение горячих точек отражает как свойства мутационного процесса – преобладающий тип мутагена, воздействующего на организм, эффективность работы репаративной и репликативной машин, так и структурные и функциональные особенности контекста ДНК [43].

Концентрация повреждений в определенных участках генома обусловлена множеством факторов: структурой и количеством химически активных молекул, действующих на организм, механизмом взаимодействия этих молекул с ДНК, нуклеотидной последовательностью и локальной структурой ДНК, а также степенью компактизации хроматина [43]. Способы взаимодействия малых молекул с ДНК включают интеркаляцию, внедрение в малую и большую бороздки ДНК, связывание с одноцепочечными участками ДНК и сочетание различных типов взаимодействия, а также последующее формирование ковалентных аддуктов с азотистыми основаниями нуклеотидных звеньев [44].

Значительную часть веществ, образующих удаляемые системой NER аддукты, составляют электрофильные соединения, которые взаимодействуют с нуклеофильными атомами в составе ДНК. Наиболее реакционноспособными являются N7, N2, C8 и O6 позиции гуанина, N1, N3 и N7 позиции аденина, O2 и O4 позиции тимина, O2 и N4 позиции цитозина [45]. Так бенз[а]пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид предпочтительно реагирует с экзоциклической N2 аминогруппой гуанина, расположенной в малой бороздке ДНК. Предполагается, что расположенные таким образом трудно репарируемые бенз[а]пиреновые аддукты наиболее часто встречаются в ДНК клеток млекопитающих [46]. Афлатоксин В1 экзо-8,9-эпоксид, активированный метаболит афлатоксина В1, предпочтительно взаимодействует с dG:dC-богатыми регионами ДНК и формирует аддукт с N7 гуанина [47, 48]. Широко известный канцерогенный ароматический амин, N-2-ацетиламинофлуорен, образует аддукты по позиции C8 гуанина [49, 50]. Химиотерапевтические препараты на основе платины после метаболической активации предпочтительно взаимодействуют с dG-богатыми участками ДНК [51].

Вероятность возникновения кластерных повреждений в ДНК существенно возрастает при интенсивных воздействиях на клетку, например, при проведении интенсивной химиотерапии и комплексной терапии, включающей воздействие радиоактивного излучения или дополнительных химиопрепаратов

[5, 52, 53]. Наиболее часто протоколы комбинированной терапии используются в случаях, когда базовыми препаратами являются производные платины, применение которых часто осложняется врожденной или приобретенной устойчивостью к их действию. Комбинированная терапия в этих случаях может включать антимиотики, терминирующие аналоги нуклеозидов, ингибиторы топоизомеразы, а в последнее время такие препараты, как паклитаксел, гемцитабин, а также доксорубин, который преимущественно интеркалирует в сайты, обогащенные dG:dC-парами, формируя водородную связь с dG в одной цепи, а в присутствии формальдегида образует ковалентные аддукты с dG в противоположной цепи (рис. 2Г, снизу) [28].

Повышенный уровень накопления окислительных повреждений характерен для опухолевых [54, 55] и воспаленных тканей [56]. Ионизирующее излучение индуцирует повреждение ДНК как посредством прямой ионизации (30-40% ИИ-индуцированных повреждений), так и путем воздействия свободных радикалов, образующихся при радиолизе воды [57]. Установлено, что действие γ - и рентгеновского излучения может приводить к образованию двух или более AP-сайтов, а также окисленных производных азотистых оснований и разрывов цепей ДНК в пределах двух-трех витков спирали ДНК [58, 59]. При воздействии ИИ кластерные повреждения, состоящие из AP-сайтов и окисленных оснований, образуются примерно в 4 раза чаще, чем двухцепочечные разрывы [60, 61].

AP-сайты, одни из самых многочисленных окислительных повреждений ДНК, возникающих при самых разных типах воздействий [62, 63], могут существовать в виде двух находящихся в равновесии форм: альдегида с открытым кольцом и замкнутого полуацетала. Альдегидная форма обладает высокой реакционной способностью, которая способствует образованию вблизи AP-сайтов дополнительных повреждений. В результате реакции альдегидной формы AP-сайта с экзоциклической аминогруппой остатка аденина или гуанина, находящихся в противоположной цепи, могут возникать опасные повреждения ДНК – межцепочечные сшивки (ICL) [64]. Присутствие 20-40 ICL на клетку смертельно для клеток млекопитающих с дефицитом репарации [65]. Эти повреждения блокируют разделение двух цепей ДНК, что необходимо для протекания процессов транскрипции и репликации. Следовательно, ICL действуют как абсолютный блокатор основных клеточных процессов и особенно вредны для быстро делящихся клеток. Это привело к широкому использованию сшивающих агентов в качестве противоопухолевых средств. Пути репа-

рации ICL до сих пор окончательно не определены; считается, что в покоящихся клетках в репарации ICL участвуют белки системы NER [65]. Кроме того, в результате реакций альдегидной формы AP-сайта образуются такие объемные аддукты, как внутрицепочечные сшивки, моноаддукты и ДНК-белковые сшивки [64, 65].

Препараты-радиомиметики, используемые в химиотерапии онкологических заболеваний, оказывают на ДНК действие, аналогичное радиоактивному излучению. Они также могут способствовать появлению множественных повреждений ДНК, состоящих из одно- и двухцепочечных разрывов и AP-сайтов [66, 67]. В качестве примера таких препаратов можно привести блеомицин – гликопептид с выраженными цитотоксическими и мутагенными свойствами, вырабатываемый бактериями *Streptomyces verticillus*. Одна часть молекулы блеомицина связывается в малой бороздке ДНК и модифицирует ее азотистые основания, в то время как другая способна вступать в реакции с ионами металлов (например, Fe(II)), а также с кислородом. Действие образующихся активных форм кислорода может приводить к возникновению в смежных участках ДНК окислительных повреждений [66, 68].

На процесс возникновения кластерных повреждений влияет также доступность конкретных участков ДНК для воздействия повреждающего агента. Белки хроматина защищают ДНК от повреждающего воздействия ИИ, свободных радикалов и генотоксических химических соединений [69–71].

Присутствие объемных повреждений, напротив, индуцирует значительное локальное ослабление Уотсон–Криковских взаимодействий и, как следствие, облегчает доступность ДНК для окислительных и других повреждающих агентов, повышает вероятность спонтанного гидролиза гликозидных связей и образование AP-сайтов. Таким образом, наличие спонтанно образовавшихся или индуцированных объемных аддуктов повышает вероятность возникновения кластерных повреждений в окружающем их участке ДНК [62, 72]. Показано, например, что воздействие даже низких доз радиоактивного облучения на ДНК, содержащую платиновые аддукты, повышает вероятность возникновения кластерных повреждений в 1.5-2.5 раза [73, 74]. Учитывая, что кластерные повреждения часто трудно репарируемы, такие воздействия при проведении комплексной терапии могут способствовать накоплению платиновых аддуктов в ДНК раковых клеток, несмотря на то, что для раковых клеток в некоторых случаях характерна повышенная активность систем репарации ДНК [75, 76].

УЗНАВАНИЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК СИСТЕМОЙ ОБЩЕГЕНОМНОЙ NER

В процессе общегеномной NER первичное узнавание участка ДНК, содержащего объемное повреждение, происходит без непосредственного контакта белка-сенсора XPC с самим повреждением [3, 77, 78]. Как уже отмечено, объемные повреждения вызывают изменения регулярной структуры дцДНК, которые часто сопровождаются дестабилизацией молекулы и формированием флуктуирующих одноцепочечных участков, к которым XPC проявляет повышенное сродство. При поиске повреждения XPC перемещается вдоль молекулы ДНК в режиме повторяющихся ассоциаций-диссоциаций, формируя с ДНК множество короткоживущих комплексов, что позволяет ему «обходить препятствия» – белки, связанные с ДНК [79].

Более детальное представление о том, как происходит первая стадия процесса NER, получено в результате данных, полученных при проведении биохимических экспериментов, таких, как фотоаффинная модификация и равновесное флуоресцентное титрование, с рекомбинантным белком XPC человека и его дрожжевым ортологом Rad4, а также данных рентгеноструктурного анализа комплекса белка Rad4 с ДНК, содержащей циклобутан-пиримидиновый димер [77, 80]. В структуре XPC присутствуют три домена, содержащих β -шпильки: BHD1, BHD2 и BHD3 (рис. 3) [77]. На первой стадии узнавания повреждения домены BHD1 и BHD2 фактора XPC выявляют участки ДНК с ослабленными водородными связями. Распознавание участков с ослабленной регулярной двухцепочечной структурой ДНК происходит путем последовательного взаимодействия «ароматического сенсора» – расположенных в домене BHD2 аминокислотных остатков Trp690 и Phe733 – с ароматическими гетероциклами азотистых оснований нуклеотидных звеньев [81, 82]. Субдомен, в котором находится ароматический сенсор белка XPC, имеет сходство с олигонуклеотид/олигосахаридсвязывающим мотивом, типичным для белков, предпочтительно взаимодействующих с одноцепочечной ДНК, например RPA [81–83]. Домены BHD1 и трансглутаминазный домен белка XPC связываются с сегментом неповрежденной ДНК протяженностью 11 п.н. с 3'-стороны от повреждения, закрепляя белок на ДНК [82].

Затем происходит формирование более специфического комплекса XPC с ДНК в непосредственной близости от повреждения. В этом комплексе с последовательностью из 4 нуклеотидов неповрежденной цепи, расположенных напротив повреждения, взаимодействуют два β -шпильчных домена, BHD2 и BHD3 (рис. 3) [77, 84]. Структурные исследова-

ния комплекса дрожжевого белка-ортолога Rad4 с поврежденной ДНК [77] позволили заключить, что в результате связывания BHD2/3 не только поврежденное звено, но и два неповрежденных азотистых основания, расположенных в комплементарной цепи, вытесняются из дуплекса ДНК, который принимает вывернутую открытую конформацию. Длинная β -шпилька, выступающая из BHD3, встраивается в ДНК, тем самым стабилизируя структуру, возникшую при выворачивании нуклеотидов. При этом остов ДНК изгибается примерно на 40° . Образуется комплекс XPC–ДНК специфической структуры, в формирование которого вовлечен достаточно протяженный участок ДНК вблизи повреждения (рис. 3).

Селективность поиска повреждений определяется соотношением времени формирования комплексов XPC с ДНК и времени их существования. Как правило, продуктивные для NER комплексы характеризуются более коротким временем формирования и оптимальным по продолжительности временем

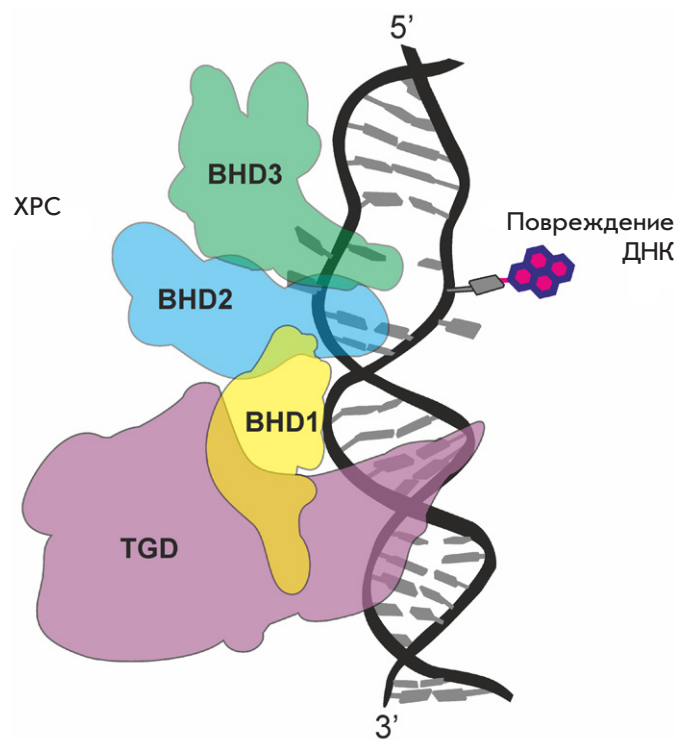


Рис. 3. Схематическое изображение узнавания поврежденного участка ДНК белком XPC. Повреждение ДНК обозначено розовым цветом, трансглутаминазный (TGD) домен фактора XPC выделен фиолетовым цветом, домен BHD1 – желтым; домен BHD2 – голубым; домен BHD3 – зеленым

жизни [85, 86]. Расчеты, проведенные с использованием модели стохастического обратимого формирования нуклеопротеиновых комплексов в процессе NER, показали, что первичное узнавание участка ДНК, содержащего повреждение, – самый медленный этап процесса NER, определяющий скорость удаления повреждения [87]. Эффективность протекания первой стадии NER – узнавания поврежденных звеньев среди огромного массива неповрежденной ДНК, определяет скорость протекания всего процесса репарации [85, 88, 89].

В клетке XPC присутствует в виде комплексов XPC–RAD23B и XPC–RAD23B–Cen2. Субъединица RAD23B стабилизирует белок XPC и делает более эффективным его взаимодействие с ДНК. При связывании XPC с поврежденным участком ДНК субъединица RAD23B диссоциирует из комплекса. Функция субъединицы Cen2 в этих комплексах не до конца понятна, процесс NER *in vitro* может протекать и без ее участия [90]. Известно, однако, что Cen2, хотя и не контактирует с ДНК, стимулирует процесс NER в целом и необходим для эффективного вовлечения в процесс репарации фактора TFIIH [91, 92].

За начальным этапом узнавания повреждения и формированием комплекса XPC–ДНК следует проверка наличия объемного повреждения ДНК фактором TFIIH. Комплекс TFIIH состоит из семисубъединичного ядра Core7, в состав которого входят АТР-зависимые геликазы XPB и XPD и не обладающие ферментативной активностью субъединицы p62, p52, p44, p34 и p8, и так называемого комплекса CDK-активирующей киназы (CAK), включающего субъединицы MAT1, циклин H и Cdk7 [93, 94]. В присутствии CAK субъединицы XPB и XPD соединены через длинную α -спираль белка MAT1, при этом TFIIH находится в жесткой кольцеобразной конформации, которая ограничивает их ферментативную активность. При вовлечении TFIIH в процесс NER гетеротример CAK высвобождается из комплекса и Core7 формирует более подвижную подковообразную структуру, в которой XPB и XPD расположены на концах «подковы» (рис. 1) [8, 95].

Присоединение Core7 к репаративному комплексу происходит за счет взаимодействия его субъединиц XPB и p62 с фактором XPC, связанным с поврежденным участком ДНК [96, 97]. Взаимодействие субъединицы XPB с С-концом XPC стимулирует ее АТР-азную активность и приводит к изменению конформации Core7 и его закреплению на ДНК-субстрате [98, 99]. В результате этой конформационной перестройки XPD получает возможность связаться с поврежденной цепью ДНК с 5'-стороны от повреждения.

XPD служит молекулярным сенсором, подтверждающим наличие в цепи ДНК объемного повреждения. За счет 5'-3'-геликазной активности, стимулируемой субъединицей p44, XPD перемещается в направлении повреждения ДНК, формируя при этом асимметричный «пузырь». В процессе работы XPD поврежденная цепь проходит через пору, сформированную доменами FeS, Arch и HD1, а каждое ее звено контактирует с «сенсорным карманом» на поверхности белка. При контакте с поврежденным звеном геликазная активность XPD подавляется, что приводит к иммобилизации этого белка на ДНК и маркировке повреждения для последующего его удаления белками инцизионного комплекса (рис. 1) [100, 101].

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРЫ ДНК НА РЕПАРАЦИЮ ОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ, РАСПОЛОЖЕННЫХ В СОСТАВЕ КЛАСТЕРОВ

Заметное продвижение в понимании закономерностей узнавания и удаления кластерных повреждений системой NER достигнуто благодаря исследованиям *in vitro* с использованием такого инструмента, как синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, содержащие повреждения в заданных позициях цепей ДНК [10, 11, 102]. На рис. 4 схематически представлены ДНК с кластерными повреждениями различной структуры, в состав которых входят природные и синтетические объемные повреждения, использованные в этих исследованиях.

Выявлена прямая корреляция между эффективностью репарации некоторых объемных повреждений, например, одиночно расположенных аддуктов аминифлуорена в ДНК с одинаковой последовательностью, системой NER и сродством фактора XPC к этим ДНК [88]. Однако повышенное сродство XPC–RAD23B к ДНК, содержащим объемные повреждения, не всегда ассоциировано с высокой эффективностью их эксцизии как в случае изолированных объемных повреждений, так и повреждений, находящихся в составе кластеров [10, 11, 63, 86, 103]. Например, аддукт производного бенз[а]пирена, R-цис-B[a]P-dG, удаляется белками NER в 5 раз более эффективно, чем изомер S-транс-B[a]P-dG, несмотря на то, что сродство XPC–RAD23B к соответствующим ДНК-дуплексам одинаково [103]. Показано также, что при минимальных различиях величин сродства XPC–RAD23B к ДНК с одиночными синтетическими аналогами повреждений nAnt (ненуклеотидная вставка с объемным антраценкарбамоильным заместителем) и Far-dC (цитозин с введенной по экзоциклическому азоту фтор-хлоразидопиридинильной группировкой) первое повреждение репарируется белками системы NER,

в то время как второе является нерепарируемым [104].

ДНК, содержащие кластерные повреждения, в состав которых входят объемные аддукты, характеризуются, как правило, повышенным сродством к ним фактора ХРС. Однако репарация таких повреждений системой NER во многих случаях частично или полностью подавлена [10, 11, 63]. Например, в работе [86] с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени (*real time monitoring surface plasmon resonance technique*) изучено взаимодействие ХРС–RAD23В с ДНК, содержащими одиночные и составляющие кластерные повреждения аддукты, образованные активными метаболитами фторированного производного ацетиламинофлуорена и С8 гуанина. Эти аддукты, образующие кластерное повреждение, были расположены в одной цепи ДНК и их разделяло два или менее нуклеотидных звеньев (*рис. 4А*). Показано, что фактор ХРС образовывал значительно более стабильные комплексы с ДНК, содержащими кластерные повреждения, по сравнению с ДНК, содержащими одиночные ацетиламинофлуореновые аддукты. При этом эксцизионная активность NER в отношении ДНК, несущих кластерные повреждения, была ниже, чем для ДНК с одиночными повреждениями (для некоторых ниже детектируемой). Предполагается, что подавление специфической эксцизии в данном случае вызвано нарушениями в сборке белковых комплексов, отвечающих за верификацию повреждения ДНК, происходящими при экстремально прочном связывании ХРС с поврежденным участком [86]. При значениях $K_D = 10^{-11}$ – 10^{-12} М фактор ХРС может конкурировать за связывание даже с «сенсором одноцепочечных ДНК» – белком RPA, который вместе с ХРА входит в состав прединцизионного и инцизионного комплексов NER [3, 105–107].

Препятствия для работы системы NER создают также расположенные в двух цепях ДНК синтетические аналоги повреждений, в которых объемные фрагменты соединены с остовом ДНК протяженными гибкими линкерами (*рис. 4Б*) [102]. Такие линкеры позволяют объемным ароматическим группировкам аддуктов контактировать с прилегающими к повреждению участками ДНК, что может индуцировать появление в структуре ДНК дополнительных участков дестабилизации, которые стимулируют связывание ХРС. Предполагается, что появление участка с ослабленными Уотсон–Криковскими взаимодействиями вблизи места введения повреждения в ДНК может как подавлять, так и повышать эффективность процесса NER, в зависимости от его расположения. Наличие такого участка дестабили-

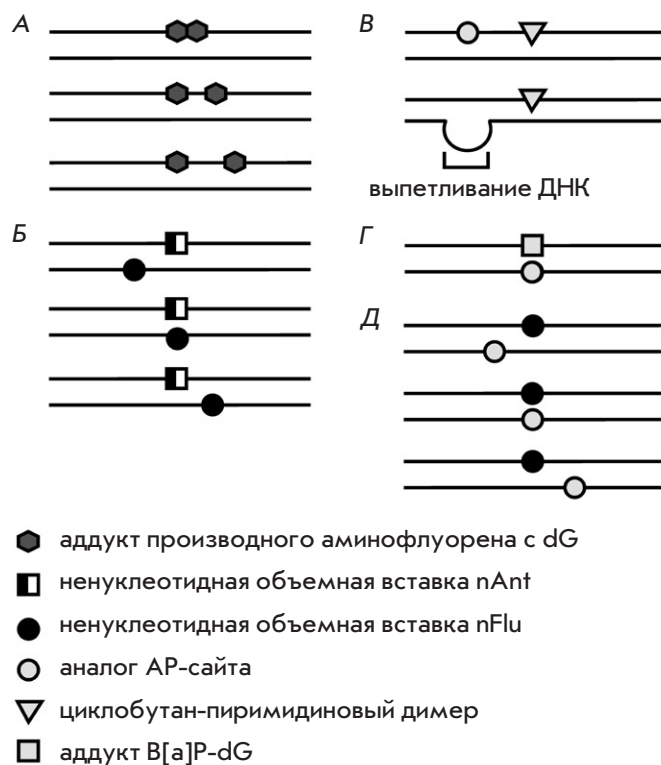


Рис. 4. Схематическое изображение модельных ДНК, содержащих кластерные повреждения. А – участки кольцевых плазмидных ДНК, содержащих моно- или диаддукты фторированного производного аминафлуорена, разделенные одним или двумя нуклеотидными звеньями. Б – ДНК, содержащие синтетические объемные повреждения в обеих цепях: ненуклеотидные вставки с объемным антраценилкарбамоильным (nAnt) или флуоресцеинкарбамоильным (nFlu) заместителем; длина модельного ДНК-дуплекса – 137 п.н., расстояние между повреждениями до 20 п.н. В – ДНК-дуплексы (~200 п.н.), содержащие CPD и аналог AP-сайта в одной цепи или CPD и выпетливание в комплементарной цепи. Г – ДНК-дуплекс длиной 135 п.н., содержащий аддукт бензо[а]пирендиоэпоксида с гуанином и аналог AP-сайта напротив него. Д – ДНК, содержащие объемное повреждение nFlu и аналог AP-сайта в противоположной цепи; длина модельного ДНК-дуплекса – 137 п.н., расстояние между повреждениями – до 6 п.н.

зации с 3'-стороны от повреждения может приводить к формированию комплекса ХРС с ДНК, непродуктивного для протекания следующих этапов NER: в этом случае встреча TFIIH с повреждением исключена [104, 108–110]. Участок дестабилизации ДНК, расположенный с 5'-стороны от повреждения, напротив, может стимулировать процесс NER. Например, показано, что введение аналога AP-сайта, сдвинутого относительно положения CPD

в направлении 5'-конца поврежденной цепи ДНК, стимулирует эксцизию CPD-содержащего фрагмента системой NER [111]. Наличие в структуре ДНК-дуплекса выпетливания с 5'-стороны от CPD также многократно повышает эффективность его эксцизии (модельные ДНК схематически изображены на *рис. 4В*). Наблюдаемые эффекты связаны также с особенностями механизма распознавания повреждения фактором TFIIH, а именно 5'-3'-направленностью его продвижения по ДНК от места первичного связывания и направления раскручивания цепей.

Особенный интерес представляет исследование механизма репарации кластерных повреждений, состоящих из объемных ДНК-аддуктов и окислительных повреждений азотистых оснований ДНК [10, 11]. Как упоминалось выше, дестабилизированный присутствием объемного повреждения участок ДНК более подвержен воздействию активных форм кислорода, что повышает вероятность образования кластерных повреждений. К кластерным повреждениям такого состава могут привлекаться белки систем эксцизионной репарации нуклеотидов и эксцизионной репарации оснований (BER).

Репарация кластерного повреждения, состоящего из объемного B[a]P-аддукта и аналога AP-сайта, расположенных в комплементарных цепях ДНК-дуплекса, проанализирована в исследовании (схема модельной ДНК приведена на *рис. 4Г*) [10]. Оценка эксцизионной активности системы NER по отношению к B[a]P-dG и способности AP-эндонуклеазы 1 к гидролизу AP-сайта показала, что процесс NER в таких кластерах подавлен, в то время как AP-сайты могут быть репарированы системой BER. Следовательно, система NER чувствительна к присутствию в непосредственной близости от B[a]P-dG окислительного повреждения типа AP-сайта [8, 10]. Дальнейшее детальное исследование взаимодействия этой модельной структуры с белками репарации показало, что присутствие XPC стимулирует эндонуклеазную и подавляет 3'-5'-эксзонуклеазную активность AP-эндонуклеазы 1, повышая тем самым эффективность процесса BER [63].

С применением ЯМР-спектроскопии, измерения термической стабильности ДНК-дуплексов и компьютерного моделирования [10] показано, что для ДНК, содержащей AP-сайт напротив аддукта B[a]P-dG, характерны сильные стэкинг-взаимодействия между ароматическими кольцами B[a]P и соседними азотистыми основаниями комплементарной цепи, что может мешать формированию комплекса XPC с ДНК. В этом случае затруднено выворачивание соседних нуклеотидных звеньев, а также инсерция β -спильки домена VHD3 и выталкивание

повреждения из спирали ДНК. При этом исследуемая кластерная ДНК характеризовалась повышенным сродством к ней фактора XPC [63].

Аддукт производного бенз[а]пирена также стал новился нерепарируемым системой NER при делеции комплементарного ему нуклеотидного звена dC. С применением ЯМР-спектроскопии и методов компьютерного моделирования [9, 112] показано, что в случае делеции звена dC происходило значительное усиление стэкинг-взаимодействий между ароматическим кольцом B[a]P и окружающими азотистыми основаниями, в результате чего продуктивный «открытый» комплекс фактора XPC с ДНК не образовывался [112].

В работе [11] изучено влияние аналога AP-сайта на удаление ненуклеотидной вставки с объемным флуоресцеинкарбамоильным заместителем (nFlu) системой NER при его расположении в различных положениях комплементарной цепи ДНК (*рис. 4Д*). Фактор XPC образовывал непродуктивные комплексы с ДНК, в которых объемное повреждение nFlu и аналог AP-сайта были разделены менее чем 6 п.н. Выявлена также обратная корреляция между относительной эффективностью эксцизии nFlu-содержащих фрагментов из этих модельных ДНК и сродством XPC к модельным ДНК. Расположение AP-сайта и nFlu в противоположных позициях ДНК-дуплекса, как и аналогичная локализация других повреждений (B[a]P-dG/AP-сайт, nAnt/nFlu), полностью подавляло эксцизию объемного повреждения белками NER (*рис. 4Б, Г*) [10, 102].

Характер изменений в структуре ДНК, с которыми связана подавленная эксцизия nFlu при наличии в комплементарной цепи аналога AP-сайта (*рис. 4Д*), был выявлен с применением метода молекулярной динамики. Согласно результатам моделирования молекулярно-динамических траекторий, в ДНК с nFlu и аналогом AP-сайта, находящимися друг напротив друга в комплементарных цепях, двойная спираль в месте повреждения находится в «сжатом» состоянии, прилегающие к повреждению основания основную часть времени находятся в эффективном стэкинг-взаимодействии между собой, а оба поврежденных звена вытолкнуты из цепей. При этом остаток флуоресцеина (Flu) располагается в малой бороздке с ориентацией в сторону 5'-конца поврежденной цепи, что может стерически препятствовать связыванию XPC с дестабилизированным участком ДНК, расположенным с 5'-стороны от повреждения. В этом случае более доступным является участок непродуктивного связывания XPC, расположенный с 3'-стороны от nFlu [11], что может приводить к образованию непродуктивного для NER комплекса XPC-ДНК. Небольшую часть времени Flu может

быть ориентирован в сторону 3'-конца поврежденной цепи, взаимодействуя при этом с аналогом AP-сайта, расположенным с противоположной стороны спирали ДНК.

Таким образом, при появлении в комплементарной цепи напротив объемного ДНК-аддукта дополнительного необъемного повреждения азотистого основания (например, AP-сайта) или делеции может возникнуть «эффект отсутствующего основания» [9–11, 112] – локальная стабилизация поврежденного участка, которая препятствует связыванию фактора ХРС, исключая тем самым возможность протекания последующих этапов NER.

Стадия верификации также может влиять на эффективность удаления повреждения системой NER. Как недавно показано, сродство XPD к модельным ДНК, содержащим одиночные объемные повреждения с близким сродством к ХРС ($K_D = 1.5-3$ нМ), зависит от структуры объемных повреждений и может существенно различаться, коррелируя при этом с эффективностью удаления повреждений *in vitro* [104, 113]. Количество работ, посвященных верификации повреждений ДНК, расположенных в составе кластеров, пока невелико. Так показано [106], что введение AP-сайта в ДНК-субстрат либо в сканируемую геликазой XPD цепь, либо в комплементарную («невидимую» для XPD) не оказывает заметного влияния на геликазную и АТР-азную активность рекомбинантного Core7. Таким образом, маловероятно, что в случае ДНК, содержащих кластерные повреждения такого состава, стадия верификации будет способствовать значительным различиям в эффективности процесса NER.

Следует отметить, что препятствиями для успешной репарации объемного аддукта, находящегося в составе кластерного повреждения, могут быть и стерические затруднения при эксцизии поврежденного фрагмента ДНК эндонуклеазами XPF и XPG, а также отсутствие неповрежденной ДНК-матрицы комплементарной цепи. Однако это тема недостаточно освещена и требует дальнейшего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате различий в химических свойствах азотистых оснований, нуклеотидной последовательности ДНК, а также типа и интенсивности воздействия генотоксических факторов повреждения распределяются по ДНК клетки неравномерно, концентрируясь в определенных участках генома. Кластерные повреждения часто оказываются трудно репарируемыми, что приводит к их накоплению в ДНК, особенно в случае сниженного репаративного статуса клетки. С другой стороны, затрудненная репарация индуцированных повреждений должна способствовать их цитотоксическому действию на раковые клетки. С использованием модельных ДНК показано, что в процессе общегеномной NER удаление объемного повреждения может быть подавлено на этапе его первичного узнавания из-за структурных особенностей участка ДНК, содержащего кластер. Для кластерных повреждений ДНК, образованных объемным аддуктом и расположенным напротив него AP-сайтом, показано, что AP-сайт процессируется ферментами системы BER достаточно эффективно, в то время как эксцизия объемного повреждения системой NER из таких структур затруднена. Предполагается, что поочередное удаление повреждений из кластеров может иметь адаптивное значение, поскольку позволяет избежать одновременной инициации процессов NER и BER. Понимание механизмов удаления кластерных повреждений ДНК, содержащих объемные аддукты, должно помочь созданию рациональных и эффективных подходов к сохранению индуцированных терапией повреждений ДНК раковых клеток, которые часто отличаются повышенной активностью систем репарации ДНК. ●

Работа поддержана РФФ (грант № 19-74-10056) и в рамках государственного задания ИХВФМ СО РАН № 121031300041-4 (глава «ВИДЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, УДАЛЯЕМЫХ СИСТЕМОЙ NER, И ПРИЧИНЫ ИХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foustieri M., Mullenders L.H.F. // Cell Res. 2008. V. 18. № 1. P. 73–84.
2. Vermeulen W., Foustieri M. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 8. P. 1–16.
3. Schärer O.D. // Cold Spring Harb. Perspectives Biol. 2013. V. 5. № 10. P. 1–19.
4. Petrusseva I.O., Evdokimov A.N., Lavrik O.I. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 20. P. 23–34.
5. Sage E., Harrison L. // Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 2011. V. 711. № 1–2. P. 123–133.
6. Eccles L.J., O'Neill P., Lomax M.E. // Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 2011. V. 711. № 1–2. P. 134–141.
7. Sage E., Shikazono N. // Free Radic. Biol. Med. 2017. V. 107. P. 125–135.
8. Mu H., Geacintov N.E., Broyde S., Yeo J.E., Schärer O.D. // DNA Repair (Amst.). 2018. V. 71. P. 33–42.
9. Hess M.T., Gunz D., Luneva N., Geacintov N.E., Naegeli H. // Mol. Cell. Biol. 1997. V. 17. № 12. P. 7069–7076.
10. Liu Z., Ding S., Kropachev K., Lei J., Amin S., Broyde S. // PLoS One. 2015. V. 10. № 9. e0137124.
11. Naumenko N., Petrusseva I., Lomzov A., Lavrik O. // DNA

- Repair (Amst.). 2021. V. 108. 103225.
12. Schärer O.D. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. V. 42. P. 2946–2974.
 13. Lloyd D.R., Hanawalt P.C. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 18. P. 5288–5294.
 14. Duan M., Ulibarri J., Liu K.J., Mao P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 23. P. 1–13.
 15. Rastogi R.P., Kumar A., Tyagi M.B., Sinha R.P. // *J. Nucl. Acids.* 2010. 592980.
 16. Brooks P.J., Wise D.S., Berry D.A., Kosmoski J.V., Smerdon M.J., Somers R.L., Mackie H., Spoonde A.Y., Ackerman E.J., Coleman K., et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 29. P. 22355–22362.
 17. Okahashi Y., Iwamoto T., Suzuki N., Shibutani S., Sugiura S., Itoh S., Nishiwaki T., Ueno S., Mori T. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 12. e133.
 18. Pratt M.M., John K., Maclean A.B., Afework S., Phillips D.H., Poirier M.C. // *Int. J. Environ. Res. Public Hlth.* 2011. V. 8. № 7. P. 2675–2691.
 19. Phillips D.H. // *Environ. Health Perspect.* 1996. V. 104. № 3. P. 453–458.
 20. Guo S., Leng J., Tan Y., Price N.E., Wang Y. // *Chem. Res. Toxicol.* 2019. V. 32. № 4. P. 708–717.
 21. Baker D.J., Wuenschell G., Xia L., Termini J., Bates S.E., Riggs A.D., O'Connor T.R. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 31. P. 22592–22604.
 22. Grollman A.P., Shibutani S., Moriya M., Miller F., Wu L., Moll U., Suzuki N., Fernandes A., Rosenquist T., Medverec Z., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 29. P. 12129–12134.
 23. Sidorenko V.S., Yeo J.E., Bonala R.R., Johnson F., Schärer O.D., Grollman A.P. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 6. P. 2494–2505.
 24. Geacintov N.E., Broyde S. // *Chem. Res. Toxicol.* 2017. V. 30. P. 1517–1548.
 25. Stornetta A., Zimmermann M., Cimino G.D., Henderson P.T., Sturla S.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 2017. V. 30. № 1. P. 388–409.
 26. Gong J., Vaidyanathan V.G., Yu X., Kensler T.W., Peterson L.A., Sturla S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 7. P. 2101–2111.
 27. Boamah E.K., Brekman A., Tomasz M., Myeku N., Figueiredo-Pereira M., Hunter S., Meyer J., Bhosle R.C., Bargonetti J. // *Chem. Res. Toxicol.* 2010. V. 23. № 7. P. 1151–1162.
 28. Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S., Lecture N., Gasser H., Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. // *Biochim. Biophys. Acta – Rev. Cancer.* 2014. V. 1845. № 1. P. 84–89.
 29. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., et al. // *Mutagenesis.* 2003. V. 18. № 1. P. 45–51.
 30. Buss P., Caviezel M., Lutz W.K. // *Carcinogenesis.* 1990. V. 11. № 12. P. 2133–2135.
 31. Phillips D.H., Farmer B.P., Beland F.A., Nath R.G., Poirier M.C., Reddy M.V., Turteltaub K.W. // *Env. Mol. Mutagen.* 2000. V. 35. № 3. P. 222–233.
 32. Singh R., Gaskell M., Le Pla R.C., Kaur B., Azim-Araghi A., Roach J., Koukouves G., Souliotis V.L., Kyrtopoulos S.A., Farmer P.B. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. V. 19. № 6. P. 868–878.
 33. Poirier M.C. // *Environ. Health Perspect.* 1997. V. 105. № 4. P. 907–912.
 34. Lippard S.J., Merkel C.M., Lippard S.J., Ushay H.M., Poirier M.C., Poirier M.C. // *Biochemistry.* 1983. V. 22. № 22. P. 5165–5168.
 35. Aloisi C.M.N., Nilforoushan A., Ziegler N., Sturla S.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2020. V. 142. № 15. P. 6962–6969.
 36. Yang Z., Faustino P.J., Andrews P.A., Monastra R., Rasmussen A.A., Ellison C.D., Cullen K.J. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2000. V. 46. № 4. P. 255–262.
 37. Otteneeder M., Lutz W.K. // *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1999. V. 424. № 1–2. P. 237–247.
 38. Farmer P.B., Brown K., Tompkins E., Emms V.L., Jones D.J.L., Singh R., Phillips D.H. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005. V. 207. № 2. P. 293–301.
 39. Farmer P.B., Singh R. // *Mutat. Res.* 2008. V. 659. № 1–2. P. 68–76.
 40. Brown K. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 817. P. 207–230.
 41. Tretyakova N., Goggin M., Sangaraju D., Janis G. // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. V. 25. № 10. P. 2007–2035.
 42. Collins A., Gedik C., Vaughan N., Wood S., White A., Dubois J., Rees J.F., Loft S., Møller P., Poulsen H., et al. // *Free Radic. Biol. Med.* 2003. V. 34. № 8. P. 1089–1099.
 43. Rogozin I.B., Pavlov Y.I. // *Mutat. Res. – Rev. Mutat. Res.* 2003. V. 544. № 1. P. 65–85.
 44. Sturla S.J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. V. 11. № 3. P. 293–299.
 45. Gillet L.C., Schärer O.D. // *Chem. Rev.* 2006. V. 106. № 2. P. 253–276.
 46. Hargis J., Schaefer H., Houk K., Wheeler S. // *J. Phys. Chem. A.* 2010. V. 8. № 24. P. 4017–4018.
 47. Eaton D.L., Gallagher E.P. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1994. V. 34. № 1. P. 135–172.
 48. Bedard L.L., Massey T.E. // *Cancer Lett.* 2006. V. 241. № 2. P. 174–183.
 49. Romano L., Vooradi V. // *Biochemistry.* 2010. V. 38. № 3. P. 319–335.
 50. Mu H., Kropachev K., Wang L., Zhang L., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Geacintov N.E., Broyde S. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 19. P. 9675–9690.
 51. Hemminki K., Thilly W.G. // *Mutat. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1988. V. 202. № 1. P. 133–138.
 52. Mohamad O., Sishc B.J., Saha J., Pompos A., Rahimi A., Story M.D., Davis A.J., Kim D.W.N. // *Cancers (Basel).* 2017. V. 9. № 6. P. 1–30.
 53. Regulus P., Duroux B., Bayle P.A., Favier A., Cadet J., Ravanat J.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 35. P. 14032–14037.
 54. Iida T. // *Neuro. Oncol.* 2001. V. 3. № 2. P. 73–81.
 55. Goodman M., Bostick R.M., Dash C., Terry P., Flanders W.D., Mandel J. // *Cancer Causes Control.* 2008. V. 19. № 10. P. 1051–1064.
 56. Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. // *Cell.* 2010. V. 140. № 6. P. 883–899.
 57. Ward J.F. // *Radiat. Res.* 1994. V. 138. № 1 (suppl). P. S85–S88.
 58. Goodhead D.T. // *Int. J. Radiat. Biol.* 1994. V. 65. № 1. P. 7–17.
 59. Watanabe R., Rahmanian S., Nikjoo H. // *Radiat. Res.* 2015. V. 183. № 5. P. 525–540.
 60. Sutherland B.M., Bennett P.V., Sidorkina O., Laval J. // *Mutagenesis.* 2000. V. 97. № 1. P. 247–261.
 61. Gulston M., de Lara C., Jenner T., Davis E., O'Neill P. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 4. P. 1602–1609.
 62. Gates K.S. // *Chem. Res. Toxicol.* 2009. V. 22. № 11. P. 1747–1760.
 63. Starostenko L.V., Maltseva E.A., Lebedeva N.A., Pestryakov P.E., Lavrik O.I., Rechkunova N.I. // *Biochem. (Moscow).* 2016. V. 81. № 3. P. 233–241.

64. Greenberg M.M. // *Acc. Chem. Res.* 2014. V. 47. № 2. P. 646–655.
65. Clauson C., Schärer O.D., Niedernhofer L. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 10. a012732.
66. Chen J., Stubbe J.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2005. V. 5. № 2. P. 102–112.
67. Nickoloff J.A., Sharma N., Taylor L. // *Genes.* 2020. V. 11. № 1. P. 99.
68. Smith B.L., Bauer G.B., Povirk L.F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 48. P. 30587–30594.
69. Takata H., Hanafusa T., Mori T., Shimura M., Iida Y., Ishikawa K., Yoshikawa K., Yoshikawa Y., Maeshima K. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. e75622.
70. Ljungman M., Hanawalt P.C. // *Mol. Carcinog.* 1992. V. 5. № 4. P. 264–269.
71. Falk M., Lukášová E., Kozubek S. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res.* 2008. V. 1783. № 12. P. 2398–2414.
72. Gunz D., Hess M.T., Naegeli H., For E., Probing A.T. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 41. P. 25089–25098.
73. Dong Y., Chen Y., Zhou L., Shao Y., Fu X., Zheng Y. // *Int. J. Radiat. Biol.* 2017. V. 93. № 11. P. 1274–1282.
74. Zheng Y., Sanche L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 15. 3749.
75. Cheung-Ong K., Giaever G., Nislow C. // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. № 5. P. 648–659.
76. Fu D., Calvo J.A., Samson L.D. // *Nat. Rev. Cancer.* 2012. V. 12. № 2. P. 104–120.
77. Min J., Pavletich N.P. // *Nature.* 2007. V. 449. P. 570–575.
78. Jain V., Hilton B., Lin B., Patnaik S., Liang F., Darian E., Zou Y., MacKerell A.D., Cho B.P. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 2. P. 869–880.
79. Cheon N.Y., Kim H.S., Yeo J.E., Schärer O.D., Lee J.Y. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 16. P. 8337–8347.
80. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva E.A., Pestryakov P.E., Petrusseva I.O., Sugawara K., Chen X., Min J.H., Lavrik O.I. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 15. P. 10936–10947.
81. Maillard O., Solyom S., Naegeli H. // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. № 4. e79.
82. Camenisch U., Träutlein D., Clement F.C., Fei J., Leitenstorfer A., Ferrando-May E., Naegeli H. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 16. P. 2387–2399.
83. Bunick C.G., Miller M.R., Fuller B.E., Fanning E., Chazin W.J. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. P. 14965–14979.
84. Paul D., Mu H., Zhao H., Ouerfelli O., Jeffrey P.D., Broyde S., Min J.H. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 12. P. 6015–6028.
85. Chen X., Velmurugu Y., Zheng G., Park B., Shim Y., Kim Y., Liu L., van Houten B., He C., Ansari A., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. 5849.
86. Hilton B., Gopal S., Xu L., Mazumder S., Musich P.R., Cho B.P., Zou Y.Z. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. P. 1–21.
87. Luijsterburg M.S., Bornstaedt G. Von, Gourdin A.M., Politi A.Z., Moné M.J., Warmerdam D.O., Goedhart J., Vermeulen W., Van Driel R., Höfer T. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 189. № 3. P. 445–463.
88. Yeo J.E., Khoo A., Fagbemi A.F., Schärer O.D. // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. V. 25. № 11. P. 2462–2468.
89. Buterin T., Meyer C., Giese B., Naegeli H. // *Chem. Biol.* 2005. V. 12. № 8. P. 913–922.
90. Nishi R., Sakai W., Tone D., Hanaoka F., Sugawara K. // *Mol. Cell Biol.* 2013. V. 41. № 14. P. 5664–5674.
91. Dantas T.J., Wang Y., Lalor P., Dockery P., Morrison C.G. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 193. № 2. P. 307–318.
92. Bergink S., Toussaint W., Luijsterburg M.S., Dinant C., Alekseev S., Hoeijmakers J.H.J., Dantuma N.P., Houtsmuller A.B., Vermeulen W. // *J. Cell Biol.* 2012. V. 196. № 6. P. 681–688.
93. Volker M., Moné M.J., Karmakar P., Van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H.J., van Driel R., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.F. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 1. P. 213–224.
94. Araújo S.J., Nigg E.A., Wood R.D. // *Mol. Cell Biol.* 2001. V. 21. № 7. P. 2281–2291.
95. Greber B.J., Hoang T., Nguyen D., Fang J., Afonine P.V., Paul D., Nogales E., Division I.B., National L.B., Biology C. // *Nature.* 2017. V. 549. № 7672. P. 414–417.
96. Yokoi M., Masutani C., Maekawa T., Sugawara K., Ohkuma Y., Hanaoka F. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 13. P. 9870–9875.
97. Greber B.J., Toso D.B., Fang J., Nogales E. // *Elife.* 2019. V. 8. e44771.
98. Houten B., van Kuper J., Kisker C. // *DNA Repair (Amst.).* 2016. V. 44. P. 136–142.
99. Oksenysh V., Coin F. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 1. P. 90–96.
100. Egly J.M., Coin F. // *DNA Repair (Amst.).* 2011. V. 10. № 7. P. 714–721.
101. Kuper J., Braun C., Elias A., Michels G., Sauer F., Schmitt D.R., Poterszman A., Egly J.M., Kisker C. // *PLoS Biol.* 2014. V. 12. № 9. e1001954.
102. Lukyanchikova N.V., Petrusseva I.O., Evdokimov A.N., Koroleva L.S., Lavrik O.I. // *Mol. Biol.* 2018. V. 52. № 2. P. 237–246.
103. Lee Y.C., Cai Y., Mu H., Broyde S., Amin S., Chen X., Min J.H., Geacintov N.E. // *DNA Repair (Amst.).* 2014. V. 19. P. 55–63.
104. Evdokimov A.N., Tsidulko A.Y., Popov A.V., Vorobiev Y.N., Lomzov A.A., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. // *DNA Repair (Amst.).* 2018. V. 61. P. 86–98.
105. Krasikova Y.S., Rechkunova N.I., Maltseva N.I., Petrusseva I.O., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 22. P. 8083–8094.
106. Li C.L., Golebiowski F.M., Onishi Y., Samara N.L., Sugawara K., Yang W. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 6. P. 1025–1034.
107. Martijn J.A., Hoeijmakers J.H.J., Vermeulen W. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 6. P. 885–886.
108. Sugawara K., Shimizu Y., Iwai S., Hanaoka F. // *DNA Repair (Amst.).* 2002. V. 1. № 1. P. 95–107.
109. Sugawara K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. // *Mol. Cell.* 2009. V. 36. № 4. P. 642–653.
110. Nemzow L., Lubin A., Zhang L., Gong F. // *DNA Repair (Amst.).* 2015. V. 36. P. 19–27.
111. Kusakabe M., Onishi Y., Tada H., Kurihara F., Kusao K., Furukawa M., Iwai S., Yokoi M., Sakai W., Sugawara K. // *Genes Environ.* 2019. V. 41. P. 1–6.
112. Reeves D.A., Mu H., Kropachev K., Cai Y., Ding S., Kolbanovskiy A., Kolbanovskiy M., Chen Y., Krzeminski J., Amin S., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 20. P. 8752–8764.
113. Petrusseva I., Naumenko N., Kuper J., Anarbaev R., Kappenberger J., Kisker C., Lavrik O. // *Front. Biosci.* 2021. V. 9. 617160.

УДК 579.26+574.3

О биоразнообразии микробиома воздуха

Н. Б. Наумова, М. Р. Кабилов*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090
Россия

*E-mail: kabilov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.12.2021

Принята к печати 27.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11671

РЕФЕРАТ В кратком обзоре рассмотрены свойства биоаэрозолей и некоторые последние результаты метагеномных исследований микробиома воздуха, проведенных с помощью методов высокопроизводительного секвенирования. Таксономический состав и структура микробиома биоаэрозолей могут демонстрировать суточную и сезонную динамику, зависимость от метеорологических явлений (пыльные бури, ливни, туманы и т.п.) и общего загрязнения. Как правило, в биоаэрозолях различных слоев тропосферы доминируют бактерии типа *Proteobacteria* и грибы типа *Ascomycota*. Микробиологический состав биоаэрозолей в нижних слоях тропосферы влияет на состав и разнообразие микробиома биоаэрозолей внутри помещений, информация об изменении которого актуальна в периоды обострения эпидемиологической обстановки. Небольшое число опубликованных работ о микробиоме биоаэрозолей воздушного пространства России ставит на повестку дня вопрос об интенсификации таких исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоаэрозоль, микробиом, тропосфера, воздушный перенос, биоразнообразие.

ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы повсеместно встречаются в окружающей среде и играют ключевую роль практически во всех экосистемах [1]. В связи с распространением многих патогенных микроорганизмов воздушно-капельным путем, в том числе и коронавируса SARS-CoV-2, вызвавшего текущую пандемию COVID-19, изучение, мониторинг и регулирование состава воздуха как снаружи, так и внутри помещений приобрели особую актуальность [2, 3]. К настоящему времени уже накоплено много информации о корреляции между загрязнением наружного воздуха и более тяжелым течением COVID-19: так, в Индии более низкий уровень смертности от заболевания наблюдали в городах с лучшим качеством воздуха [4]. Напомним, что термин «биоаэрозоль» охватывает широкий спектр органических частиц, содержащихся в атмосфере, источником которых являются разнообразные живые и мертвые организмы [5]. Как правило, наряду с частицами микробного, растительного или животного происхождения биоаэрозоли также содержат широкий спектр антигенных соединений, микробных токсинов и вирусов [6, 7]. Понимание процессов образования биоаэрозолей, закономерностей их распределения, распространения, перемещения, структуры и т.п., особенно в экстремальных условиях верхних слоев атмосферы, необходимо для широкого ряда фундаментальных и прикладных научных дисциплин [8], таких, как физика и химия,

метеорология, гидрология атмосферы; изучение содержания аллергенных частиц и микроорганизмов, патогенных для человека, сельскохозяйственных животных и растений; а также аэриобиология, биогеография и биоразнообразие, общая экология в целом. Основными направлениями изучения биоаэрозолей являются: а) оценка их источников и потоков; б) пространственное распределение и его изменение во времени; в) старение биологических частиц; г) метаболическая активность; д) урбанизация аллергий; е) транспорт патогенов и ж) влияние на климат [8].

Цель этого обзора – краткое описание микробиоты биоаэрозолей, с акцентом на составе и структуре микробиома. Воздух является исключительно динамичной и, как следствие этого, очень проблематичной средой для отбора и анализа образцов биоаэрозолей, установления источников аэрозолизации и путей переноса, поэтому методологические аспекты сбора образцов, вне всякого сомнения, имеют огромное значение для интерпретации и сравнения данных. Большое значение имеют и методы анализа микробиома. Тем не менее, так как эти два направления являются обширными, мы коснемся их в этом обзоре лишь кратко.

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА БИОАЭРОЗОЛЕЙ

Биоаэрозоль является важной частью атмосферного аэрозоля. Расчеты показывают, что среди представленных в воздухе частиц биоаэрозоль занимает по объему 10–28% [9], а по массе 16–80% [1].

Распространение микроорганизмов по воздуху происходит повсеместно, и у некоторых из них является важной частью жизненного цикла [10]. В образование биоаэрозолей вносят вклад различные природные источники (рис. 1) – почва, лес, пустыни, океаны и моря и т.д. [11], а также антропогенные (сельское хозяйство, пищевая промышленность, свалки и т.д.) [6, 11, 12].

После попадания в атмосферу, т.е. аэрозолизации, микроорганизмам в гораздо большей степени по сравнению с их индигенными местообитаниями – источниками аэрозоля – приходится испытывать стресс иссушения, УФ-облучения, низких температур и низкого содержания источников углерода и энергии, и многие могут не выдержать [13].

Размеры биоаэрозольных частиц варьируют от 3 нм [14] до 100 мкм в зависимости от источника происхождения: диаметр пыльцы 17–58 мкм, спор грибов 1–30 мкм, клеток бактерий обычно 0.25–8 мкм [15], а вирусов меньше 0.3 мкм. Причем совершенно не обязательно, что биологический материал представлен в виде отдельных частиц; большинство бактерий связано с частицами с диаметром более 2 мкм [16, 17], 2–3 мкм [18], 3–4 мкм [19, 20]. В некоторых случаях выявлено бимодальное распределение бактерий по размерам частиц биоаэрозоля с одним пиком 1–2 мкм и вторым в области 4–7 мкм [21]. Бактерии также могут встречаться в виде агломератов клеток или быть связаны с частицами растений, животных или почвы, а также с пылью

или спорами. Переносимые в атмосфере клетки бактерий и споры грибов могут достигать концентраций $\sim 10^3 \div 10^4$ и $\sim 10^5$ в 1 м^3 [17, 21] и встречаться на высоте вплоть до 40 км над уровнем моря, т.е. до стратосферы [22]. Концентрация бактериальных частиц, способных образовывать колонии на лабораторных питательных средах, в приземном слое тропосферы в городских условиях на юге Польши варьировала от 65 до 355 КОЕ/ м^3 [19] и в пределах 300–1350 КОЕ/ м^3 в городской и сельской местности в Таиланде [18]; при этом в последнем случае число КОЕ быстро падало с высотой – в 2 раза при переходе от 1–3 до 7 м над поверхностью суши. В приземных и более высоких слоях (несколько тысяч метров) тропосферы над югом Западной Сибири лабораторное культивирование выявило значительное преобладание спорообразующих бактерий Bacilli/Firmicutes [23, 24], в то время как над севером региона преобладали неспорообразующие бактерии [25].

Распределение биоаэрозолей в воздухе зависит от времени года [19, 26]. Так, в воздухе приморского района Китая концентрация клеток бактерий, определенная путем микроскопирования, зимой была выше, чем летом [21]. Нагрузка биоаэрозолей патогенной микробиотой может сильно меняться в зависимости от времени года: так в Южной Азии было выявлено существенное повышение содержания патогенов в постмуссонный период и зимние месяцы. Выявлено и значительное суточное варьирование состава биоаэрозолей [26].

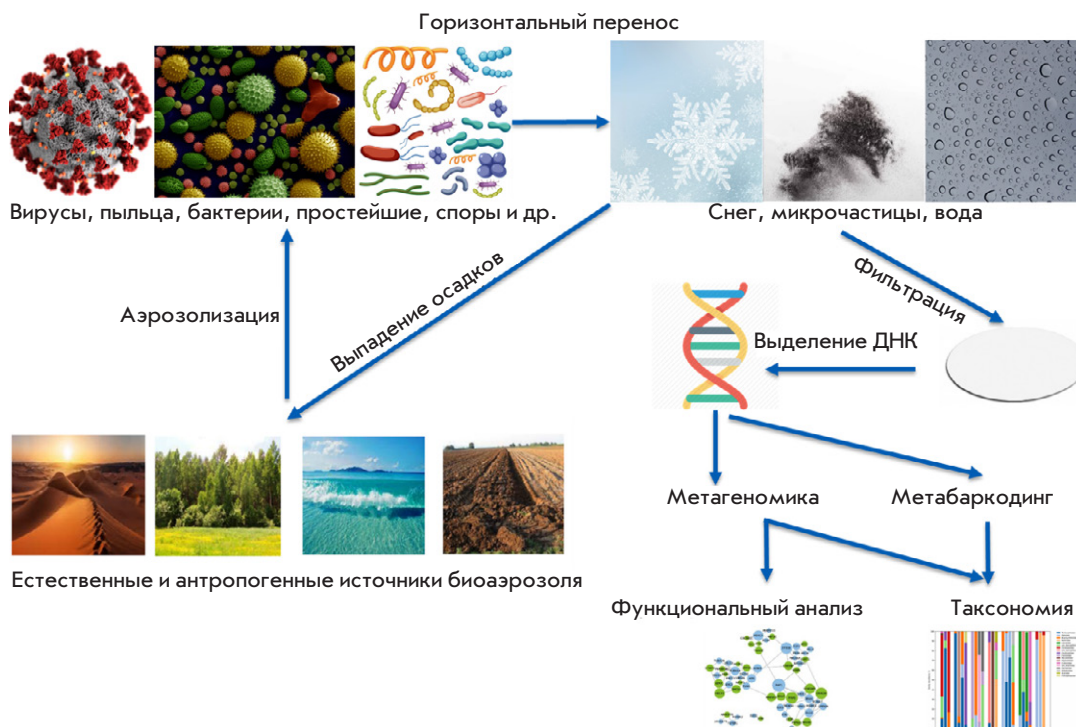


Рис. 1. Схематическое изображение образования, распространения и анализа биоаэрозолей

Статистически наиболее значимыми метеорологическими факторами, определяющими жизнеспособность переносимых воздухом бактерий, являются температура и ультрафиолетовое облучение [19, 21]. Биотическая нагрузка аэрозолей и их поведение в окружающей среде в значительной степени зависят от загрязнения воздуха (дымка, туман, пыль, разные макрочастицы), в том числе транспортом и сжиганием биомассы [26]. При этом доля жизнеспособных бактерий в общем пуле может варьировать в зависимости от степени загрязнения [15]. Состав биоаэрозолей может меняться в зависимости от специфических случайных метеорологических условий: пыльные бури, например, приводят к сильному увеличению концентрации микроорганизмов в биоаэрозоле [16], при этом разные компоненты биоаэрозолей по-разному изменяются в зависимости от метеоусловий.

Накопленная к настоящему моменту информация свидетельствует о важной роли биоаэрозолей [6, 11, 27, 28] в физических и химических процессах, протекающих в атмосфере [1, 29]. Показано, что биоаэрозоли могут присоединяться к окружающим частицам и таким образом оказывать влияние на атмосферные процессы, выступая ядрами конденсации в облаках и инициируя выпадение осадков [10, 30, 31]. Так, установлено, что в 33% случаев именно биологические частицы служили ядрами при образовании снега и облаков [32].

Наряду с воздействиями на погодные явления, биоаэрозоли влияют и на здоровье людей [33], так как в их состав могут входить патогенные/условно патогенные бактерии, грибы, вирусы, высокомолекулярные аллергены, бактериальные эндотоксины, микотоксины, пептидогликаны, бета-(1–3)-гликаны, пыльца и растительные волокна [6]. В первую очередь неблагоприятное воздействие биоаэрозоля на здоровье человека проявляется в респираторных симптомах. Например, показана высокая корреляция между повышением концентрации пыльцы на открытом воздухе весной и летом и обострением астмы у детей [34]. Установлена связь между содержанием грибных спор в воздухе и частотой обращения пациентов с астматическими симптомами [35]. Эндотоксин бактериальных биоаэрозолей признан важным этиологическим фактором профессиональных заболеваний легких, включая астму (неаллергическую) [6]. Изоляты *Escherichia coli*, которые обычно используют в качестве индикаторов качества воды, обнаружены также и в атмосферной пыли [36].

СБОР ОБРАЗЦОВ АЭРОЗОЛЯ

Сбор образцов аэрозоля основан на различных физических подходах отделения частиц от воздушного

потока [37]. Но общий смысл заключается в прокачивании насосом воздуха через фильтр или жидкую среду, улавливающую аэрозольные частицы [38]. Недавно стали появляться методы, позволяющие в процессе сбора образцов разделять частицы по размеру [39]. Это особенно актуально для аэровирусологии – в последнее десятилетие активно разрабатываются методы сбора образцов аэрозоля внутри помещений для мониторинга влияния дыхания людей. В целом инструментальные варианты сбора аэрозоля пока не стандартизированы и сильно варьируют, однако общий принцип их работы остается неизменным.

МЕТАГЕНОМНОЕ СЕКВЕНИРОВАНИЕ

В настоящий момент изучение таксономического разнообразия микробиоты биоаэрозоля основано на подходах, использующих высокопроизводительное секвенирование. Из всей совокупности уловленных фильтром или жидкой средой микроорганизмов извлекают тотальную ДНК, которую далее используют в метагеномном анализе. С развитием таких методов стала возможной идентификация некультивируемых микроорганизмов, составляющих основу воздушного биома [40]. Полученные к настоящему времени результаты метагеномных исследований показали, что доминантные виды идентифицированных таким образом микроорганизмов отличаются от доминантов, выявленных при стандартном культивировании [41], поскольку более 99% микроорганизмов, обнаруженных в воздухе, не растут в лабораторных условиях [26]. Появилось и стало широко использоваться понятие «микробиом», которое в одноименном журнале (*Microbiome*) определяют так: «Этот термин относится ко всему местообитанию, включая все микроорганизмы (бактерии, археи, низшие и высшие эукариоты, и вирусы), их геномы (т.е. гены) и условия окружающей среды» [42]. Однако опубликованные работы, в заголовках или ключевых словах которых есть слово «микробиом», не следуют этому определению, так как подавляющее большинство исследований сфокусированы только на одной группе (вирусы, бактерии, грибы или растения), в лучшем случае на комбинации двух. Не вдаваясь в причины такого положения дел, здесь мы просто ограничимся констатацией этого и подчеркнем, что далее под «микробиомом» мы будем иметь в виду – вслед за авторами цитируемых работ – бактериальную или грибную составляющие микробиома, либо их комбинацию.

Итак, можно найти огромное количество публикаций, связанных с изучением микробиомов всевозможных природных объектов, например, горячих источников, озер, морей, почвы, эндогенной микробиоты организмов и т.д. [43–46], однако метагеном-

ный анализ биоаэрозолей представлен катастрофически меньшим числом работ [47–52].

Условно метагеномное секвенирование можно разделить на два глобальных направления: полногеномное секвенирование (метагеномика) и таргетное (метабаркодинг). В первом случае идет прочтение всей ДНК, выделенной из образца, что позволяет, с одной стороны, говорить о таксономическом разнообразии, а с другой – предоставляет возможность анализа функциональных свойств. Однако стоимость метагеномного подхода заведомо выше [48, 53], чем метабаркодинга, который основан на анализе высококонсервативных маркерных генов, таких, как 16S (бактерии, археи), ITS (грибы, растения), *rbcL* (растения), 18S (различные эукариоты) и др. [54, 55]. При этом эффективность таксономической идентификации напрямую зависит от количества верифицированных последовательностей в используемых специализированных базах данных. Наиболее полными в настоящий момент являются базы прокариот (16S) и грибов (ITS).

Исключительно низкое содержание микроорганизмов в воздухе, наряду с сильным варьированием состава микробных ансамблей, является серьезной проблемой для анализа биоразнообразия, функционального спектра и метаболической активности микробиоты биоаэрозолей [56]. Подчеркнем, что исследования такого типа являются фундаментальной основой для выявления аспектов взаимодействия человека с природой, в частности, касающихся способов передачи заболеваний и потенциального воздействия на здоровье человека [57]. Тем не менее, опубликованы только единичные результаты метагеномного анализа биоаэрозолей в России [58].

Бактериобиом биоаэрозолей

В приповерхностных слоях атмосферы бактерии составляют существенную часть биоаэрозолей: так, в горах Колорадо (США) бактерии в среднем составляли 22% от аэрозольных частиц размером более 0.5 мкм [47].

Бактерии аэрозолей могут значительно влиять на химию атмосферы, оказывая воздействие на здоровье человека [15]. Так, высокий уровень загрязнения воздуха может очень сильно изменять структуру его бактериобиома [59]. В туманные дни в Пекине выявлено повышение содержания патогенных бактерий *Halomonas* и *Shewanella* [60], особенно осенью и ранней зимой.

Большое биоразнообразие бактериобиома биоаэрозолей установлено путем метагеномного секвенирования [61]. Например, в приземных слоях тропосферы в условиях города идентифицировали бактерии 38 таксономических типов [41]. В большин-

стве исследований установлено, что Proteobacteria, Firmicutes и Actinobacteria являются основными доминантами бактериобиома нижних [41, 62, 63] и более высоких слоев тропосферы [50, 64, 65], при этом в нижних слоях в городских условиях Firmicutes могут вносить заметный (20–30%) вклад, а такие типы, как Cyanobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Acidobacteria и Deinococcus-Thermus, выявляют как минорные (1–5% относительного содержания нуклеотидных последовательностей) доминанты. Однако другими исследованиями показано высокое содержание представителей Bacteroidetes в биоаэрозоле над Японией после пылевых бурь в Азии [17, 66], а также в воздухе над восточной Австралией [67]. Весьма специфичным был состав бактериобиома в высоких слоях тропосферы над полуостровом Ното в Японии, где (правда, методом флуоресцентной гибридизации *in situ*) показано, что 80% всех эубактерий на минеральных частицах аэрозоля были представлены *Bacillus subtilis*, относящейся к фирмикутам [68].

Различные метеорологические события оказывают значительное влияние на состав и структуру бактериобиома биоаэрозолей. Например, перенос воздушными потоками пылевых частиц, аэрозольных пыльных бурями, на дальние расстояния над морями и континентами является важным механизмом попадания в местные экосистемы различных микроорганизмов [69]. Так, бури в Сахаре приводят к попаданию пылевых частиц в атмосферу, затем вместе с движением воздушных масс эти частицы переносятся в Европу, приводя, в частности, к их накоплению в снеговом покрове Альп на высоте более 3000 м над уровнем моря [70]. Биоиндикаторами пылевых частиц из Алжира являлись представители *Gemmatimonadetes* и *Deinococcus-Thermus* [70], известные своей встречаемостью в сухих олиготрофных местообитаниях с относительно высоким уровнем солнечной радиации, что и позволяет им выживать в процессе такой транспортировки, сохраняя при этом метаболическую активность. Хотя и в очень низких количествах, но патогенные бактерии могут тоже переноситься с пылевыми частицами на очень большие расстояния [70]. При этом поверхность тела человека является более вероятным (по сравнению с другими биотопами) источником патогенных бактерий в воздухе [71]. Установлена четкая зависимость структуры и состава бактериобиома на высоте 10 м от поверхности суши (остров и полуостров в Восточной Азии) от пылевых бурь в Центральной Азии [69]. При этом пылевые частицы служат центрами нуклеации льда [72]. Выпадение осадков является не менее важным механизмом привноса

микроорганизмов из верхних в нижние слои тропосферы и на поверхность территорий [73]. Это исследование показало, что состав бактериобиома в осадках а) соответствовал источникам биоаэрозолей на пути переноса и б) имел выраженную сезонную динамику со снижением относительного обилия преобладающих Proteobacteria от лета к зиме.

Примечательно, что, в отличие от микобиома, состав которого внутри помещений определялся его составом снаружи и не зависел от активности людей внутри, биоразнообразие бактериобиома внутри помещений зависело как от бактериобиома снаружи [74], так и от активности людей внутри [41]. Однако загрязнение наружного воздуха может не влиять на биоразнообразие ансамблей бактерий и архей в биоаэрозоле внутри помещения, как показало исследование в Пекине [74]. Это свидетельствует о различных механизмах формирования и динамики разных составляющих микробиома, что следует иметь в виду при планировании соответствующих наблюдений.

Заметный вклад в суммарную нагрузку воздушных частиц могут вносить Cyanobacteria, вызывающие различные проблемы со здоровьем после вдыхания [75]. Недавно пикоцианобактерии были обнаружены в приповерхностных слоях атмосферы над землей или водоемами в Гренландии и Антарктике [76], где аэрозолизация почвы и воды является ведущим механизмом образования аэрозолей; их распространение ветром считается основным источником поступления Cyanobacteria в воздух.

Проведенный метаанализ результатов 42 исследований, в совокупности охватывающих более трех тысяч образцов биоаэрозоля, выявил повышенное разнообразие бактерий и относительное обилие патогенов в образцах, так или иначе ассоциированных с антропогенной активностью в местах сбора [71].

Микобиом биоаэрозолей

Микобиом аэрозолей сильно варьирует, но на уровне типа, как правило, основными компонентами микобиома как в приземных, так и в более высоких слоях тропосферы являются Basidiomycota и Ascomycota, меняющиеся местами в плане основного доминирования. Так, представители типа Ascomycota значительно (более двух третей) доминировали в приповерхностном слое воздуха в горах Колорадо на высоте более 3000 м над уровнем моря [77], а также и в приповерхностных воздушных слоях Кувейта на существенно более низкой высоте над уровнем моря [78]. Другие исследователи, однако, выявили доминирование типа Basidiomycota (до 60% и выше) [41, 63, 79], в то время как Ascomycota составляли око-

ло трети последовательностей грибов. Интересно, что присутствие устойчивых к атмосферным стрессам представителей Ascomycota (*Cladosporium* и *Alternaria*) увеличивалось с повышением высоты (500–800 м по сравнению с 5–10 м) над пустынями Гоби и Таклимакан [80], которые являются основными поставщиками пылевых частиц в атмосферу Азии. В приповерхностном воздухе над горой высотой 3043 м над уровнем моря в Австрии основными были представители классов Basidiomycota (Agaricomycetes), за которыми следовали представители таких классов аскомицетов, как Dothideomycetes, Saccharomycetes, Sordariomycetes, Leotiomycetes и Eurotiomycetes [64]. Аскомицеты – представители семейства Davidiellaceae – составляли 25% микобиома в направлении с северо-востока Китая в Японию [81]. Однако в одном из последних исследований биоразнообразия грибов в аэрозолях над Антарктикой представители этого семейства не были обнаружены среди доминантов микобиома [82]. Гриб *Alternaria*, относящийся к Pleosporaceae / Pleosporales / Dothideomycetes / Ascomycota, часто выявляют среди основных доминантов приземных слоев как в городских (Нандзин, Пекин, Сеул), так и в естественных (пустыня в Кувейте) условиях [41, 78, 83]. Хорошо известные как основные компоненты аэрозольной микобиоты культивируемые роды грибов *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* и др. [84] при метагеномном подходе могут составлять не более 12% от общего числа маркерных нуклеотидных последовательностей [41]. Однако следует иметь в виду, что относительное содержание *Alternaria* в воздухе может сильно варьировать (от 10 до 40%) в зависимости от года как над сельской, так и над городской местностью [85]. В этой же работе установлена зависимость состава микобиома приповерхностных аэрозолей от типа и состояния растительности (влажности листьев). Некоторые статьи описывают довольно неожиданный (в смысле – сильно отличающийся от данных других исследований) состав микобиома. Так, показано, что последовательности рода *Candida* (Saccharomycetales / Saccharomycetes / Ascomycota) составляли 54% микобиома нижнего слоя тропосферы [81]. Что касается приземного слоя, то в той же работе [81] установлено, что микобиом состоял исключительно из аспергилл (*Aspergillus* / Aspergillaceae / Eurotiales / Eurotiomycetes / Ascomycota). Очевидно, что состав биоаэрозолей внутри помещений существенно зависит от состава воздуха приземных слоев атмосферы снаружи и это особенно касается микобиома, состав которого, как показано в проведенном в Корее исследовании воздуха внутри помещений детских садов, определялся составом биоаэрозоля вне помещений и практически не зависел

от активности людей [41]. Разнообразие микобиома внутри помещений может зависеть от загрязнения воздуха снаружи, как показано при исследовании в Пекине [74]. Как и в случае бактериобиома, состав микобиома может меняться в зависимости от конкретных метеорологических событий: так, после дождя над засушливой территорией Средиземноморья существенно повышалось содержание грибов класса Agaricomycetes/ Basidiomycota [86], которые после дождей выпускают огромное количество спор в воздух.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, микробиом биоаэрозоля представляет собой в высшей степени динамичную систему. Изменение состава и структуры микробиома зависит от огромного числа разных факторов, многие из которых опосредуют, маскируют, влияют на действия друг друга, так или иначе мешая установить

четкие пространственно-временные закономерности. Перенос микроорганизмов на большие расстояния воздушными течениями в верхних слоях тропосферы в конечном итоге оказывает серьезное влияние на состав низких слоев, с которыми непосредственно контактирует человек. Это может иметь большое значение с точки зрения способов распространения некоторых заболеваний и потенциального воздействия на здоровье человека, особенно в условиях роста народонаселения планеты и загрязнения окружающей среды. Поэтому настоятельную необходимость укрепления позиций России в плане научного изучения и мониторинга воздушного пространства, в частности, микробиологической составляющей биоаэрозолей, нельзя переоценить. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-05-50032.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jaenicke R. // Science. 2005. V. 308. P. 73.
- Moelling K., Broecker F. // J. Environ. Public Health. 2020. Art. 1646943.
- Jia Y., Chen Y., Yan P., Huang Q. // Aerosol Air Qual. Res. 2021. V. 21. Art. 200497.
- Naqvi H.R., Datta M., Mutreja G., Siddiqui M.A., Naqvi D.F., Naqvi A.R. // Environ. Pollut. 2021. V. 268. Art. 115691.
- Després V.R., Huffman A.J., Burrows S.M., Hoose C., Safatov A.S., Buryak G., Fröhlich-Nowoisky J., Elbert W., Andreae M.O., Pöschl U., et al. // Tellus Ser. B Chem. Phys. Meteorol. 2012. V. 64. Art. 15598.
- Douwes J., Thorne P., Pearce N., Heederik D. // Ann. Occup. Hyg. 2003. V. 47. P. 187–200.
- Peccia J., Hernandez M. // Atmos. Environ. 2006. V. 40. P. 3941–3961.
- Šantl-Temkiv T., Sikoparija B., Maki T., Carotenuto F., Amato P., Yao M., Morris C.E., Schnell R., Jaenicke R., Pöhlker C., et al. // Aerosol Sci. Technol. 2020. V. 54. P. 520–546.
- Matthias-Maser S., Jaenicke R. // Atmos. Environ. 2000. V. 34. P. 3805–3811.
- Morris C.E., Sands D.C., Bardin M., Jaenicke R., Vogel B., Leyronas C., Ariya P.A., Psenner R. // Biogeosci. Discuss. 2008. V. 5. P. 191–212.
- Brodie E.L., DeSantis T.Z., Parker J.P.M., Zubietta I.X., Piceno Y.M., Andersen G.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. P. 299–304.
- Xie W., Li Y., Bai W., Hou J., Ma T., Zeng X., Zhang L., An T. // Front. Environ. Sci. Eng. 2021. V. 15. Art. 44.
- Puspitasari F., Maki T., Shi G., Chen B., Kobayashi F., Hasegawa H., Iwasaka Y. // Air Quality, Atmosphere & Health. 2015. V. 9. P. 631–644.
- Safatov A., Agafonov A., Arshinov M., Baklanov A., Belan B., Buryak G., Fofonov A., Generalov M., Kozlov A., Lapteva N., et al. // Atmospheric and Oceanic Optics. 2018. V. 31. P. 519–531.
- Gong J., Qi J., E B., Yin Y., Gao D. // Environ. Pollut. 2020. V. 257. P. 113485.
- Li M., Qi J., Zhang H., Huang S., Li L., Gao D. // Sci. Total Environ. 2011. V. 409. P. 3812–3819.
- Park J., Tomoaki I., Masao N., Yamaguchi N. // Sci. Repts. 2016. V. 6. Art. 35706.
- Janyasuthiwong S., Rungratanaubon T., Saiohai T. // Int. J. Sci. Innov. Technol. 2021. V. 4. P. 41–49.
- Bragoszewska E., Mainka A., Pastuszka J.S. // Atmosphere. 2017. V. 8. Art. 239.
- Shaffer B.T., Lighthart B. // Microb. Ecol. 1997. V. 34. P. 167–177.
- Dong L., Qi J., Shao C., Zhong X., Gao D., Wan Cao W., Gao J., Bai R., Long G., Chu G. // Sci. Total Environ. 2016. V. 541. P. 1011–1018.
- Fahlgren C., Bratbak G., Sandaa R.-A., Thyrrhaug R., Zweifel U.L. // Aerobiologia. 2011. V. 27. P. 107–120.
- Андреева И.С., Сафатов А.С., Пучкова Л.И., Емельянова Е.К., Буряк Г.А., Терновой В.А. // Оптика атмосферы и океана. 2021. Т. 34. № 6. С. 408–413.
- Safatov A.S., Andreeva I.S., Buryak G.A., Olkin S.E., Reznikova I.K., Belan B.D., Panchenko M.V., Simonenkov D.V. // Atmosphere. 2022. V. 13. P. 651.
- Андреева И.С., Сафатов А.С., Пучкова Л.И., Емельянова Е.К., Буряк Г.А., Олькин Е.С., Резникова И.К., Охлопкова О.В. // Вестник Нижегородского государственного университета. 2019. № 2. С. 3–11.
- Shammi M., Rahman M.M., Tareq S.M. // Front. Environ. Sci. 2021. V. 9. Art. 328.
- Georgakopoulos D.G., Després V., Fröhlich-Nowoisky J., Psenner R., Ariya P.A., Pósfai M., Ahern H.E., Moffett B.F., Hill T.C.J. // Biogeosciences. 2009. V. 6. P. 721–737.
- Peccia J., Milton D.K., Reponen T., Hill J. // Environ. Sci. Technol. 2008. V. 42. P. 4631–4637.
- Deguillaume L., Leriche M., Amato P., Ariya P. A., Delort A.-M., Pöschl U., Chaumerliac N., Bauer H., Flossmann A.I., Morris C.E. // Biogeosci. Discuss. 2008. V. 5. P. 841–870.
- Christner B.C., Morris C.E., Foreman C.M., Cai R., Sands D.C. // Science. 2008. V. 319. P. 1214.
- Amato P., Menager M., Sanseime M., Laj P., Mailhot G., Delort A.M. // Atmos. Environ. 2005. V. 39. P. 4143–4153.
- Pratt K.A., DeMott P., French J., Wang Z., Westphal D.L., Heymsfield A.J., Twohy C.H., Prenni A.J., Prather K.A. // Nat. Geosci. 2009. V. 2. P. 398–401.
- Yoo K., Lee T.K., Choi E.J., Yang J., Shukla S.K., Hwang S.I., Park J. // J. Environ. Sci. 2017. V. 51. P. 234–247.
- Lierl M.B., Hornung R.W. // Ann. Allergy Asthma

- Immunol. 2003. V. 90. P. 28–33.
35. Dales R.E., Cakmak S., Burnett R.T., Judek S., Coates F., Brook J.R. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000. V. 162. P. 2087–2090.
 36. Rosas I., Salinas E., Yela A., Calva E., Eslava C., Cravioto A. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. V. 63. P. 4093–4095.
 37. Henningson E.W., Ahlberg M.S. // *J. Aerosol Sci.* 1994. V. 25. P. 1459–1492.
 38. Su X., Sutarlie L., Loh X.J. // *Chem. Asian. J.* 2020. V. 15. P. 4241–4255.
 39. Lim J.H., Nam S.H., Kim J., Kim N.H., Park G.S., Maeng J.S., Yook S.J. // *J. Biomech. Eng.* 2022. V. 144. № 7. P. 071008. doi: 10.1115/1.4053504.
 40. Garrido-Cardenas J.A., Manzano-Agugliaro F. // *Curr. Genet.* 2017. V. 63. P. 819–829.
 41. Shin S.K., Kim J., Ha S.M., Oh H.S., Chun J., Sohn J., Yi H. // *PLoS One.* 2015. V. 10. Art. e0126960.
 42. Marchesi J.R., Ravel J. // *Microbiome.* 2015. V. 3. Art. 31.
 43. Hou J., Sievert S.M., Wang Y., Seewald J.S., Natarajan V.P., Wang F., Xiao X. // *Microbiome.* 2020. V. 8. Art. 102.
 44. Osborne P., Hall L.J., Kronfeld-Schor N., Thybert D., Haerty W. // *Environmental Microbiome.* 2020. V. 15. Art. 20.
 45. Bashir A.K., Wink L., Duller S., Schwendner P., Cockell C., Rettberg P., Mahnert A., Beblo-Vranesevic K., Bohmeier M., Rabbow E., et al. // *Microbiome.* 2021. V. 9. Art. 50.
 46. Zhou X., Leite M.F.A., Zhang Z., Tian L., Chang J., Ma L., Li X., van Veen J.A., Tian C., Kuramae E.E. // *Environmental Microbiome.* 2021. V. 16. Art. 4.
 47. Bowers R.M., McCubbin I.B., Hallar A.G., Fierer N. // *Atmos. Environ.* 2012. V. 50. P. 41–49.
 48. Bowers R.M., Clements N., Emerson J.B., Wiedinmayer C., Hannigan M.P., Fierer N. // *Environ. Sci. Technol.* 2013. V. 47. P. 12097–12106.
 49. Bertolini V., Gandolfi I., Ambrosini R., Bestetti G., Innocente E., Rampazzo G., Franzetti A. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. V. 97. P. 6561–6570.
 50. DeLeon-Rodriguez N., Latham T.L., Rodriguez-R L.M., Barazesh J.M., Anderson B.E., Beyersdorf A.J., Ziemba L.D., Bergin M., Nenes A., Konstantinidis K.T. // 2013. *PNAS.* V. 110. P. 2575–2580.
 51. Serrano-Silva N., Calderon-Ezquerro M.C. // *Environ. Pollut.* 2018. V. 235. P. 20–29.
 52. Mu F., Li Y., Lu R., Qi Y., Xie W., Bai W. // *Atmosph. Res.* 2020. V. 231. P. 104676.
 53. Cao C., Jiang W., Wang B., Fang J., Lang J., Tian G., Jiang J., Zhu T. // *Environ. Sci. Technol.* 2014. V. 48. P. 1499–1507.
 54. Xu J. // *Genome.* 2016. V. 59. P. 913–932.
 55. Deiner K., Bik H.M., Machler E., Seymour M., Lacoursiere-Roussel A., Altermatt F., Creer S., Bista I., Lodge D.M., de Vere N., et al. // *Mol. Ecol.* 2017. V. 26. P. 5872–5895.
 56. Luhung I., Uchida A., Lim S.B.Y., Gaultier N.E., Kee C., Lau K.J.X., Gusareva E.S., Heinle C.E., Wong A., Balakrishnan N.V., et al. *npj Biofilms Microbiomes.* 2021. V. 7. Art. 37.
 57. Wang Z., Li J., Qian L., Liu L., Qian J., Lu B., Guo Z. // *J. Vis. Exp.* 2019. V. 143. Art. e58795.
 58. Gusareva E.S., Gaultier N.P.E., Premkrishnan B.N.V., Kee C., Lim S.B.Y., Heinle C.E., Purbojati R.W., Nee A.P., Lohar S.R., Yanqing K., et al. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 21515.
 59. Fan X.-Y., Gao J.-F., Pan K.-L., Li D.-C., Dai H.-H., Li X. // *Environ. Pollut.* 2019. V. 251. P. 668–680.
 60. Li W., Yang J., Zhang D., Li B., Wang E., Yuan H. // *Front. Microbiol.* 2018. V. 9. Art. 1741.
 61. Ruiz-Gil T., Acuña J.J., Fujiyoshi S., Tanaka D., Noda J., Maruyama F., Jorquera M.A. // *Environ. Int.* 2020. V. 145. Art. 106156.
 62. Tang K., Huang Z., Huang J., Maki T., Zhang Sh., Ma X., Shi J., Jianrong B., Zhou T., Wang G., et al. // *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions.* 2017. P. 1–41.
 63. Pollegioni P., Mattioni C., Ristorini M., Occhiuto D., Canepari S., Korneykova M.V., Gavrichkova O. // *Atmosphere.* 2022. V. 13. Art. 224.
 64. Els N., Greilinger M., Reisecker M., Tignat-Perrier R., Baumann-Stanzer K., Kasper-Giebl A., Sattler B., Larose C. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 980.
 65. González-Martín C., Pérez-González C.J., González-Toril E., Expósito F.J., Aguilera Á., Díaz J.P. // *Front Microbiol.* 2021. V. 12. Art. 732961.
 66. Yamaguchi N., Park J., Kodama M., Ichijo T., Baba T., Nasu M. // *Microb. Environ.* 2014. V. 29. P. 82–88.
 67. De Deckker P., Munday C.I., Brocks J., O’Loingsigh T., Allison G.E., Hope J., Norman M., Stuu J., Tapper N., Kaars S.V.D. // *Aeolian Res.* 2014. V. 15. P. 133–149.
 68. Maki T., Kobayashi F., Yamada M., Hasegawa H., Iwasaka Y. // *Aerobiologia.* 2013. V. 29. P. 341–354.
 69. Maki T., Lee K.C., Kawai K., Onishi K., Hong C.S., Kurosaki Y., Shinoda M., Kai K., Iwasaka Y., Archer S.D.J., et al. // *J. Geophys. Res.: Atmospheres.* 2019. V. 124. P. 5579–5588.
 70. Meola M., Lazzaro A., Zeyer J. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 6. Art. 1454.
 71. Jiang X., Wang C., Guo J., Hou J., Guo X., Zhang H., Tan J., Li M., Li X., Zhu H. // *Environ. Men. Sci. Technol.* 2022. V. 56. P. 9891–9902.
 72. Maki T., Furumoto Sh., Asahi Yu., Lee K., Watanab K., Aoki K., Murakami M., Tajiri T., Hasegawa H., Mashio A., Iwasaka Y. // *Atmosph. Chem. Phys.* 2018. V. 18. P. 8155–8171.
 73. Hiraoka S., Miyahara M., Fujii K., Machiyama A., Iwasaki W. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. Art. 1506.
 74. Zhou F., Ni M., Zhen Y., Su Y., W. Y., Zhu T., Shen F. // *J. Aerosol. Sci.* 2021. V. 156. Art. 105798.
 75. Genitsaris S., Kormas K.A., Moustaka-Gouni M. // *Front Biosci.* 2011. V. 3. P. 772–787.
 76. Trout-Haney J.V., Heindel R.C., Virginia R. A. // *Environ. Microbiol. Rep.* 2020. V. 12. P. 296–305.
 77. Bowers R.M., Lauber C.L., Wiedinmyer C., Hamady M., Hallar A.G., Fall R., Knight R., Fierer N. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. V. 75. P. 5121–5130.
 78. Al Salameen F., Habibi N., Uddin S., Al Mataqi K., Kumar V., Al Doaj B., Al Amad S., Al Ali E., Shirshikhar F. // *PLoS One.* 2020. V. 15. Art. e0241283.
 79. Hanson B., Zhou Y., Bautista E.J., Urch B., Speck M., Silverman F., Muilenberg M., Phipatanakul W., Weinstock G., Sodergren E., Gold D.R., Sordillo J.E. // *Environ. Sci. Process Impacts.* 2016. V. 18. P. 713–724.
 80. Maki T., Chen B., Kai K., Kawai K., Fujita K., Ohara K., Kobayashi F., Davaanyam E., Noda J., Minamoto Y., Shi G., Hasegawa H., Iwasaka Y. // *Atmosph. Environ.* 2019a. V. 214. Art. 116848.
 81. Rodó X., Curcoll R., Robinson M., Ballester J., Burns J.C., Cayan D.R., Lipkin W.I., Williams B.L., Couto-Rodriguez M., Nakamura Y., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 7952–7957.
 82. Rosa L.H., Pinto O., Convey P., Carvalho-Silva M., Rosa C.A., Câmara P. // *Microb. Ecol.* 2021. V. 82. P. 165–172.
 83. Yang T., Han Y.P., Li L., Liu J.X. // *Huan Jing Ke Xue.* 2019. V. 40. P. 1680–1687. [Article in Chinese]
 84. Nageen Y., Asemoloye M.D., Pölme S., Wang X., Xu S., Ramteke P.W., Pecoraro L. // *BMC Microbiol.* 2021. V. 21. Art. 134.
 85. Hanson M., Petch G.M., Ottosen T.-B., Skjøth C.A. // *Sci. Total Environ.* 2022. V. 830. Art. 154491
 86. Tang K., Sánchez-Parra B., Yordanova P., Wehking J., Backes A.T., Pickersgill D.A., Maier S., Sciare J., Pöschl U., Weber B., Fröhlich-Nowoisky J. // *Biogeosciences.* 2022. V. 19. P. 71–91.

УДК 577.322.24

Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот

Д. Л. Атрошенко^{1,2}, Д. И. Головина¹, Е. П. Сергеев¹, М. Д. Шеломов¹, А. Г. Ельченинов²,
И. В. Кубланов^{1,2}, Т. А. Чубарь¹, А. А. Пометун^{1,2}, С. С. Савин¹, В. И. Тишков^{1,2*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 22.08.2022

Принята к печати 29.09.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11812

РЕФЕРАТ Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) играет важную роль в жизни и прокариот, и эукариот – как низших (дрожжи и грибы), так и высших (млекопитающие). В геномах архей гены DAAO пока не найдены. При этом даже внутри одной группы организмов (бактерии, дрожжи и грибы, млекопитающие) DAAO характеризуются очень низкой гомологией аминокислотных последовательностей. Особенно это выражено у бактериальных DAAO. Высокая вариабельность первичных структур DAAO сильно ограничивает поиск генов новых ферментов в известных геномах. В результате многие гены DAAO (если не большинство) остаются или неаннотированными, или неправильно аннотированными. Нами предложен подход, в котором биоинформатические методы в сочетании с анализом общей структуры и структуры активного центра используются для подтверждения того, что найденный ген кодирует именно оксидазу D-аминокислот и предсказания возможного типа ее субстратной специфичности. С помощью поиска по гомологии получают набор кандидатных последовательностей, проводят моделирование третичной структуры отобранных ферментов и сравнивают их с экспериментальными и модельными структурами известных DAAO. Показана эффективность предложенного подхода для дискриминации DAAO и глициноксидаз. С использованием этого подхода в шести штаммах экстремофильных бактерий найдены гены новых DAAO, и впервые в мире один ген идентифицирован в геноме галофильных архей. Предварительные эксперименты подтвердили предсказанную специфичность DAAO из *Natronosporangium hydrolyticum* АСРА39 в отношении D-Leu и D-Phe.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА оксидаза D-аминокислот, первичная структура, третичная структура, моделирование, AlphaFold 2, глициноксидаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DAAO – оксидаза D-аминокислот; GOX – глициноксидаза.

ВВЕДЕНИЕ

Любая клетка представляет собой сложнейшую мультиферментную систему открытого типа, причем в зависимости от сложности и специфики состояния функционирования организма один и тот же фермент может выполнять разную физиологическую роль. Ярким примером является оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3). В бактериях, дрожжах и микроскопических грибах основная роль этого фермента сводится к утилизации экзогенных D-аминокислот (в первую очередь D-Ala) [1, 2]. У высших эукариот – позвоночных и особенно у млекопитающих, основная роль DAAO

заключается в поддержании определенного уровня D-аминокислот, которые являются регуляторами важнейших процессов, в первую очередь нервной деятельности. Например, снижение уровня D-Ser в спинномозговой жидкости за счет повышенной активности DAAO ассоциировано с шизофренией [3, 4]. При болезнях Альцгеймера и Паркинсона в нервных тканях наблюдается повышение уровня D-Ala [4, 5]. Поэтому актуальным представляется поиск эффективных и специфичных ингибиторов DAAO человека. Оксидаза D-аминокислот также широко используется на практике [6–9]. Например, DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* используется

в двухферментном биокаталитическом процессе получения 7-аминоцефалоспороновой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина С [10, 11]. Это позволяет сократить расход органических растворителей в 400 раз по сравнению с ранее используемым чисто химическим процессом. Производство 7-АЦК, используемого в качестве исходного синтона для получения полусинтетических цефалоспоринов различных поколений, достигает нескольких тысяч тонн в год.

Практическое применение фермента требует использования биокатализатора с определенными свойствами. В природе не существует универсального фермента. Его активность и специфичность определяются той ролью, которую он выполняет в природе. В большинстве биотехнологических процессов субстраты и условия проведения реакции отличаются от природных. Поэтому при разработке нового процесса, метода анализа и в прочих случаях для каждого из них проводится доводка свойств биокатализатора к требованиям процесса. Это, как правило, выполняется с помощью методов белковой инженерии. Совершенно очевидно, что в качестве исходного объекта оптимальным представляется использование фермента, свойства которого наиболее близки к требуемым. С этой целью проводят поиск генов в секвенированных геномах, число которых постоянно возрастает. У оксидаз D-аминокислот из дрожжей и грибов клонированы гены и изучены свойства ферментов всего из 7 источников – *Fusarium solani* (FsoDAAO) [12], *Trigonopsis variabilis* (TvaDAAO) [13], *Rhodospiridium toruloides* (ранее *Rhodotorula gracilis*) (RtoDAAO) [14], *Pichia pastoris* (PpaDAAO) [15], *Candida boidinii* (CboDAAO) [16], *Rasamsonia emersonii* штамм YA (RemDAAO) [17] и *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 [18]. Причем в последнем случае идентифицировали, клонировали и экспрессировали в *E. coli* гены пяти разных DAAO (OpaDAAO1 – OpaDAAO5) и одной D-аспартатоксидазы (DASPO). В случае бактерий в настоящее время клонированы и описаны всего три фермента – из *Rubrobacter xylophilus* (RxyDAAO), *Streptomyces coelicolor* (ScoDAAO) и *Arthrobacter protophormiae* (AprDAAO) [9]. Ни одна из бактериальных DAAO на практике не применяется. В настоящее время данные о присутствии потенциальных генов *daao* в геноме архей в литературе и базах данных отсутствуют. Основной причиной такого состояния в исследовании и применении бактериальных DAAO являются трудности поиска генов фермента в геномах бактерий. Всего идентифицировано немногим более 10 генов DAAO и все они найдены в геномах бактерий, принадлежащих к *Acinetobacteria* [7, 9]. Сложность поиска связана с тем, что аминокислотные последовательности

DAAO очень переменчивы. Поэтому традиционный широко используемый поиск по гомологии представляет собой очень непростую задачу. Кроме того, существует близкородственный фермент – глициноксидаза (GOX), которая очень часто появляется при поиске DAAO по гомологии с известными ферментами данного типа.

Второй важный момент в поиске новых DAAO – отбор кандидатов со свойствами, наиболее близкими к требуемым. Обычные DAAO за исключением высокоспецифичной D-аспартатоксидазы проявляют широкую субстратную специфичность. В зависимости от источника спектр субстратной специфичности сильно варьируется и активность с разными D-аминокислотами может отличаться на порядок и более. Более того, в ряде случаев к субстратной специфичности DAAO могут предъявляться особые требования. Например, при разработке методов диагностики нейродегенеративных заболеваний требуются DAAO, активные с D-Ser, но не с D-Ala и наоборот [5]. Поэтому для выбора DAAO с желаемой субстратной специфичностью (если ее описание отсутствует) приходится проводить клонирование, экспрессию и очистку ферментов, изучать их каталитические свойства и отбирать лучший. Совершенно очевидно, что данная процедура трудоемка, продолжительна и затратна.

Нами предложен биоинформационно-структурный подход, который позволяет с высокой достоверностью показать принадлежность кандидатных ферментов именно к DAAO, дискриминировать их от глицинооксидаз, а также, используя корреляцию между субстратной специфичностью и экспериментальными и модельными структурами известных DAAO, высказать обоснованное предположение о спектре субстратной специфичности. Особый акцент сделан на использовании данных о ферментах из термотолерантных дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 (пять OpaDAAO и OpaDASPO), поскольку пять из шести ферментов демонстрируют необычные зависимости стабильности и активности от pH среды, а также имеют очень интересный и перспективный спектр субстратной специфичности. Этот подход успешно апробирован на ряде последовательностей из экстремофильных бактерий. Впервые в мире показано наличие гена *daao* в геноме галофильной археи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический поиск генов потенциальных DAAO

Поиск новых DAAO по гомологии проводили с помощью программы BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih>).

gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) против базы данных транслированных белковых последовательностей из геномов экстремофильных бактерий. В качестве основной базы использовали базу UniProt NCBI. Также проводили поиск в геномах бактерий и архей, последовательности которых были секвенированы в ходе выполнения работ в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 годы). Для дальнейшей работы отбирали последовательности, показавшие наиболее высокую гомологию.

Множественное выравнивание отобранных последовательностей и ряда известных последовательностей бактерий и дрожжей проводили с помощью программы Clustal X 1.83.

Построение и анализ модельных структур DAAO

Для построения модельных структур ферментов использовали открытый онлайн-сервер для AlphaFold2 [19, 20]. Для множественного выравнивания использовали MMseqs2, для каждой модели было выполнено по три цикла уточнения предсказания. Генерировали по пять моделей, лучшую выбирали по rLDDT [19]. Все полученные структуры имели rLDDT более 90. Молекулу FAD встраивали, проводя оптимизацию положения в глобуле и геометрии связей в программе Coot [21].

Докинг субстратов проводили при помощи программы AutoDock [22] с ускорением на GPU [23]. Для проведения докинга использовали следующие параметры: *ga_pop_size* = 150, *ga_num_evals* = 25000000, *ga_run* = 20, *ga_mutation_rate* 0.02÷0.08, Solis-Wets-метод. Результаты докинга отбирали, ориентируясь на положения карбоксильной группы, аминогруппы и C α -атома D-аминокислоты, подходящих для катализа реакции. Соответствующие положения выбирали на основании кристаллических структур RtoDAAO в комплексе с D-аланином/иминопиперватом (PDBID 1C0P) и rkDAAO (из почек свиньи) в комплексе с имиотриптофаном (PDBID 1DDO). Положение боковых радикалов D-аминокислот выбирали исходя из потенциально возможных взаимодействий субстрата с DAAO.

Расчет RMSD между структурами проводили по C α -атомам, используя команду “align” пакета программ PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC). Для расчета RMSD использовали пять циклов отклонений структурных выбросов (параметр “cycles”).

Визуализацию структур проводили также с помощью программы PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск новых DAAO из экстремофильных бактерий и архей по гомологии

Поиск новых потенциальных DAAO проводили по базе UniProt NCBI для геномов бактерий и совместной базе секвенированных геномов экстремофильных микроорганизмов МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В качестве референсных использовали аминокислотные последовательности ферментов из дрожжей *R. toruloides* (более известных как *R. gracilis*), *T. variabilis*, *C. boidinii*, *O. parapolyomorpha* DL-1 (пять DAAO и одна DASPO) и бактерий *A. protophormiae*, *R. xylanophilus* и *S. coelicolor*. Подробная информация об источниках последовательностей DAAO, рассмотренных в данной работе, представлена в табл. 1. В случае бактерий использовали последовательности только тех ферментов, для которых была точно показана оксидазная активность. В первую очередь новые ферменты сравнивали с наиболее хорошо изученными DAAO из *R. toruloides* и *T. variabilis*. Особое внимание было уделено пяти DAAO и одной DASPO из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1, поскольку это единственный на настоящий момент организм, у которого получено и изучено такое количество паралоогичных ферментов. Гены *daao* и *daspo* из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 клонировали и экспрессировали в клетках *E. coli* в активной форме. Четыре DAAO и DASPO получены в высокоочищенном виде, определены их каталитические параметры с D-аминокислотами и изучены зависимости активности и стабильности при различных значениях pH, а также изучена термостабильность при значениях pH, оптимальных для стабильности. Аминокислотные последовательности DAAO позвоночных не использовали, поскольку они изначально имели низкую гомологию с ферментами микроорганизмов [1, 2, 9].

В результате поиска гомологов DAAO в бактериальных геномах, депонированных в UniProt NCBI, найдено большое количество кандидатных последовательностей, но уровень гомологии не превышал 30%. Экспертная оценка результатов поиска показала, что абсолютное большинство последовательностей с уровнем гомологии менее 23% не могут быть отнесены к DAAO. Поэтому для дальнейшей работы были отобраны только последовательности из термофильных бактерий с гомологией 24–30%. Экспертная оценка этих белков по консервативным остаткам (см. следующий раздел) позволила сузить набор до последовательностей, характерных для DAAO и GOX. Аналогичный набор процедур использовали при поиске генов потенциальных DAAO

в геномах экстремофилов и архей в базе МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН.

Сравнение аминокислотных последовательностей новых DAAO с известными ферментами из бактерий, дрожжей и грибов

На *рис. 1* представлена часть результатов множественного выравнивания найденных последовательностей (названия новых ферментов выделены полужирным курсивом) и последовательностей референсных DAAO. Чтобы не загромождать и так большой рисунок, на нем не приведены все результаты поиска в базе UniProt NCBI. Мы оставили только найденные последовательности пяти DAAO из экстремофильных микроорганизмов и не привели данные для глицинооксидаз. Однако проведено также множественное выравнивание последовательностей глицинооксидаз и построены модельные структуры, по результатам анализа которых они и были отнесены к GOX. Из базы геномов МГУ и ФИЦ Биотехнологии РАН после экспертной оценки были отобраны четыре последовательности – по одной из бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* ACRA39 [24] и *Natroglycomyces albus* ACRA22 [25] (этот фермент в результате оказался глицинооксидазой), и две из архей *Natrarchaeobius halalkaliphilus* AArch4 [26]. Кроме того, в выравнивании представлены последовательности из двух патогенов – *Mycobacterium tuberculosis* (MycDAAO) и *Pseudomonas aeruginosa* (PaeGOX), также найденные нами в результате поиска по гомологии. Белок *P. aeruginosa* в базе NCBI аннотирован как DAAO.

Множественное выравнивание отобранных последовательностей проводили с помощью программы Clustal X 1.83 (*рис. 1*). Использование этой программы обусловлено тем, что она сама выстраивает иерархию в гомологии заданных последовательностей. Результаты такого выравнивания дали достаточно ожидаемые результаты. Как следует из *рис. 1*, в зависимости от источника ферменты четко разделены на две группы – сверху находятся бактериальные DAAO, за ними следуют ферменты дрожжей и грибов, сразу за ними – DAAO из архей, а затем глицинооксидазы. Вторым интересным моментом является то, что наиболее высокую гомологию с бактериальными DAAO имеет широко применяемая и хорошо изученная TvaDAAO, в то время как вторая, даже более полно изученная RtoDAAO, находится в самом конце списка перед археями.

Как уже отмечалось, при поиске генов целевых ферментов в новых источниках используют подход, основанный на гомологии белков, выполняющих одинаковую функцию (например, катализируют одну и ту же реакцию). В ряде случаев такие фермен-

ты обладают очень высокой гомологией в области субстратсвязывающих и каталитического доменов, и тогда решение такой задачи не представляет особого труда. В качестве примера можно привести NAD(P)⁺-зависимую формиатдегидрогеназу (ФДГ), состоящую из двух идентичных субъединиц и не содержащую в активном центре кофакторов. Степень гомологии между ФДГ даже из эволюционно удаленных источников (например, бактерии и высшие растения) составляет не менее 55%, а при множественном выравнивании наблюдается большое количество достаточно протяженных (до 10–15 аминокислотных остатков) консервативных последовательностей во всех участках активного центра [27–29]. В DAAO уровень гомологии не превышает 30%, что намного ниже. В этом случае информация о консервативных и каталитически важных аминокислотных остатках могла бы помочь аннотации гена. Однако в случае DAAO этот подход малоэффективен. Характерной особенностью механизма действия FAD-содержащих ферментов является перенос гидрид-иона с субстрата на изоаллоксазиновое кольцо кофактора без значимого участия аминокислотных остатков фермента, основная роль которых сводится к формированию необходимой для катализа конформации активного центра и участию ряда остатков в связывании FAD и D-аминокислот. В случае кофактора обязательно наличие на N-конце фермента характеристической (fingerprint) последовательности GxGxxG [30]. Для связывания карбоксильной группы аминокислоты считалось обязательным наличие в активном центре остатков аргинина и тирозина (R285 и Y223 в RtoDAAO и R302 и Y243 в TvaDAAO). Аналогичные остатки присутствуют и в ферментах млекопитающих [1, 2]. Однако расширение выборки сравниваемых последовательностей свидетельствует, что консервативными остаются только характеристическая последовательность в FAD-связывающем домене и остаток аргинина, участвующий в связывании субстрата за счет взаимодействия с карбоксильной группой. Отметим, что подвижность этого остатка Arg сильно ограничивает соседний консервативный остаток пролина (пара ArgPro, *рис. 1*, четвертый ряд выравнивания). Остаток тирозина (*рис. 1*, третий ряд выравнивания, середина) консервативным не является – в двух из шести оксидаз OraDAAO, а также в двух бактериальных ферментах – MycDAAO и GthDAAO, в этом положении находятся отличающиеся по своим свойствам остатки Met, Phe, Ala и Cys. Кроме того, указанная пара признаков не может использоваться для аннотации фермента в качестве DAAO, поскольку эта же пара (характеристическая последовательность и пара консервативных остатков ArgPro) присутствует во всех глицинок-

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

CIUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

NhyDAO -----MAEVDLVLCGCGCTTAVLAELG---RRVTVKATEPAR-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---TTGVRRTNGVVL
GchDAO -----MDVLVLCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
MycDAO -----MAGTQGVIVCGCGCTTAVLAELG---MVRVWAAALPQ-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---ATGVRMTPALSV
SavDAO -----MTRDGRGSEVIVCGCGCTTAVLAELG---RRVTVKATEPAR-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---RTGVRMVEG-VQ
ScoDAO -----METELDDERDGEVIVCGCGCTTAVLAELG---RRVTVKATEPAR-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---QTGVRMVEG-VL
CchDAO -----MTRSRALVLCGCGCTTAVLAELG---YVVTITRQPKPS-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---VGVVTFPTTFLP
RhoDAO -----MVLVLCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
RtaDAO -----MDLVLCGCGCTTAVLAELG---LEUVWAAEMPR-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
RxyDAO -----MTRDGRGSEVIVCGCGCTTAVLAELG---RRVTVKATEPAR-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---RTGVRMVEG-VQ
RzaDAO -----MRKEETASVRRASGSAFFDVAVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
AprDAO -----MFTAPLRTVLCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
TvaDAO -----MAKIVIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDAO2 -----MAKIVIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
NcrDAO -----MS-ITVVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
FsoDAO -----MSTIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
RemDAO -----MSTIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
CboDAO -----MGDTIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDAO4 -----MSDVIYVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDAO1 -----MFAIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
PpaDAO1 -----MDSYVIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
SpoDAO -----MTKENKPRIVIVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDAO3 -----MKRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDAO5 -----MKRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
OpaDSFO -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
RtoDAO -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
NhaDAO -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
NhaGOX -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
PaeGOX -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV
NalGOX -----MTRIVVCGCGCTTAVLAELG---HVLVRAEPPHA-----TTSVAGALMWPVLPVFD-VKTAWGAATLTELRLADLPD---DTGVHLASGKGV

Рис 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидов D-аминокислот из дрожжей, бактерий и архей (названия бактерий зеленого, синего и черного соответствия). Соответствие названий смотри в табл. 1. Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом. Зеленым фоном в выравнивании указаны остатки, которые ранее считались консервативными для связывания D-аминокислоты в активном центре DAAO. Зеленым фоном в выравнивании выделен остаток Tyr, который ранее считался консервативным для связывания D-аминокислоты в активном центре

NhyDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
GchDAO -----PFWERLLDFARCTADDLPA-----HLHGIRYTAFLVNMVHLAVLDRLRSAGGAVEI-----GAVTTLDAQAES-----API
MycDAO -----EAMNLRALGRLAARAEPCF-----GMLNARPLIDMFAHRLMREKRTAA-GTVEI-----RTVLDLAEAK-----API
SavDAO -----DGNAAARLPLGLRAASAGDLEP-----TGLNARPLIDMSTHLPWLRERLLA-GTVEI-----RAVTDLEAD-----APV
ScoDAO -----DGNAAARLPLGLRAASAGDLEP-----TGLNARPLIDMSTHLPWLRERLLA-GTVEI-----RAVTDLEAD-----APV
CchDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RhoDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RtaDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RxyDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RzaDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
AprDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
TvaDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDAO2 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
NcrDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
FsoDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RemDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
CboDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDAO4 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDAO1 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
PpaDAO1 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
SpoDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDAO3 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDAO5 -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
OpaDSFO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
RtoDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
NhaDAO -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
NhaGOX -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
PaeGOX -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL
NalGOX -----PFAWTEV-VAAPCPADLPHG-----YEVGWRFGSVLWEMPIYGLVADLRRAA-GRIEFP-----GLVTDLADALT-----APL

NhyDAO -----APVLAERVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
GchDAO -----AEIIGERVGRERPRPT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
MycDAO -----AAVETIIGRERPRPS-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
SavDAO -----ARVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
ScoDAO -----ARVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
CchDAO -----AQVLEVRVGRERPRPT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RhoDAO -----AVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RtaDAO -----AEVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RxyDAO -----APVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RzaDAO -----ARVLEHRVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
AprDAO -----LEVLEHRVGRERPRPT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
TvaDAO -----DGPLDIREVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDAO2 -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
NcrDAO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
FsoDAO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RemDAO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
CboDAO -----DPLDIREVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDAO4 -----DKPLDIREVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDAO1 -----NRP-EILRVAGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
PpaDAO1 -----RNLKIREAGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
SpoDAO -----GKPGGPAEIQRCVGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDAO3 -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDAO5 -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
OpaDSFO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
RtoDAO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
NhaDAO -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
NhaGOX -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
PaeGOX -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT
NalGOX -----GKIGELDLVIRHVGGRERPRPE-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT-----VRLAIVED-----RPAQ-R-IHNNCHGGCGVTLSWGCAREAAELASGT

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

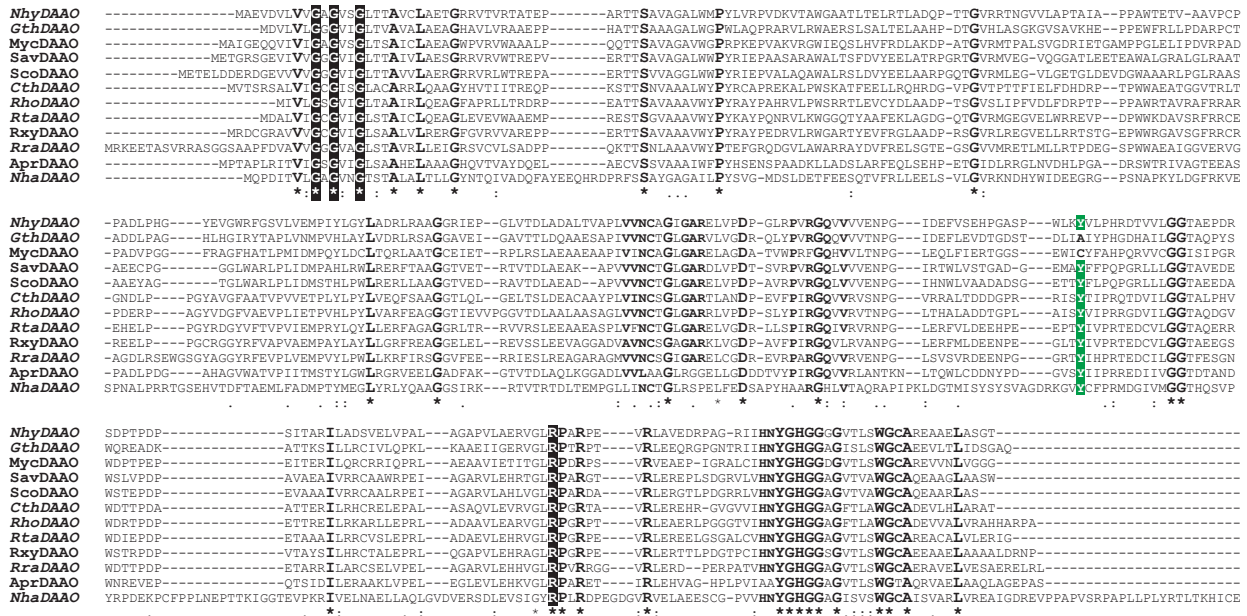


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз D-аминокислот из бактерий и архей после отсеивания последовательностей глициноксидаз. Соответствие названий смотри в табл. 1. Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом. Зеленым фоном в выравнивании выделен остаток Туг, который ранее считался консервативными для связывания D-аминокислоты в активном центре

сидазах. При выравнивании последовательностей только бактериальных DAAO (рис. 2) ситуация более оптимистична. Как следует из рис. 2, в присутствии консервативной для всех оксидаз пары ArgPro в бактериальных ферментах она расширяется до последовательности GxRPxR, а также появляется новая консервативная последовательность YGHGGxG. Однако некоторые глициноксидазы также имеют такие последовательности (на рис. 2 не показано).

Одна из найденных последовательностей принадлежит DAAO из археи *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO). Из рис. 2 хорошо видно, что аминокислотная последовательность этого фермента длиннее, чем у бактериальных DAAO. В выравнивании четко выделяются три большие вставки в районе FAD- и субстратсвязывающих доменов, а также на C-конце. Тем не менее, NhaDAAO содержит тот же набор консервативных остатков, что и в DAAO бактерий. Во втором проанализированном эталоне из *N. halalkaliphilus* AArch4 – глициноксидазы NhaGOX – положение вставок и делеций очень хорошо совпадает с их положением в GOX из *P. aeruginosa* (рис. 1) и других глициноксидазах (не показано).

По результатам сравнения аминокислотных последовательностей можно сделать некоторое предположение о типе субстратной специфичности. При сильном различии в размерах субстрата можно легко заметить разницу в длине участков, формирующие субстратсвязывающий домен, уже на стадии

выравнивания аминокислотных последовательностей. Например, TvaDAAO, RemDAAO и FsoDAAO имеют более длинные последовательности в районе остатков 100–108 (рис. 1, левая часть второго ряда выравнивания). Это обусловлено тем, что эти ферменты способны окислять объемный цефалоспориин C, в то время как остальные DAAO, имеющие в этой части выравнивания делеции, цефалоспориин C не окисляют. Например, SboDAAO специфична к небольшому аминокислотному, в первую очередь к D-Ala [17]. Однако следует отметить, что поиск по гомологии не позволяет отличить классическую DAAO с широким спектром субстратной специфичности от оксидазы D-аминокислот DASPO, специфичной только к D-Asp и D-Glu. Например, OraDAAO1 (табл. 1) в аннотации генома *O. parapolytormpha* DL-1 указана как D-аспартатоксидаза (DASPO), хотя наши экспериментальные данные свидетельствуют, что это абсолютно не так. Результаты наших исследований показали, что фермент имеет широкий спектр субстратной специфичности и по pH-профилям активности и стабильности он идентичен RtoDAAO и TvaDAAO. Аналогичная ситуация наблюдается и при аннотации генома *Pichia pastoris*. PpaDAAO1, аннотированная в геноме как оксидазы D-аминокислот, в действительности является DASPO, а PpaDAAO2, аннотированная как «гипотетический белок с низкой гомологией с оксидазой D-аминокислот» (hypothetical protein with low similarity to D-amino acid oxidase), это именно DAAO [14].

Таблица 1. Оксидазы D-аминокислот и глицинооксидазы и их источники*

№	Обозначение	Источник	Код белка в базах данных
NCBI (GeneBank, UniProt)			
Бактерии			
1	GthDAAO	<i>Gandjariella thermophila</i>	WP_137812914.1
2	CthDAAO	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i> B	WP_014099936.1
3	RtaDAAO	<i>Rubrobacter taiwanensis</i>	WP_132692836.1
4	RraDAAO	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> DSM 5868	WP_084263988.1
5	RbaDAAO	<i>Rhodothermaceae bacterium</i> RA	ARA94025.1
6	RxyDAAO	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	BAP18969.1
7	MycDAAO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_003899072
8	SavDAAO	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	BAC69383
9	ScoDAAO	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	CAB40690
10	AprDAAO	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	AY306197
11	PaeGOX	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AAP81270
Грибы и дрожжи			
12	TvaDAAO	<i>Trigonopsis variabilis</i>	AY514426
13	NcrDAAO	<i>Neurospora crassa</i>	EAA33029
14	FsoDAAO	<i>Fusarium solani</i>	BAA00692
15	RemDAAO	<i>Rasamsonia emersonii</i>	BBH51408
16	CboDAAO	<i>Candida boidinii</i>	BAB12222
17	PpaDAAO	<i>Pichia pastoris</i> CBS7435	SCV12162
18	SpoDAAO	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_001342883
19	RtoDAAO	<i>Rhodospiridium toruloides (Rhodotorula gracilis)</i>	U60066
20	OpaDAAO1	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013932717
21	OpaDAAO2	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937260
22	OpaDAAO3	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013934816
23	OpaDAAO4	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937224
24	OpaDAAO5	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937169
25	OpaDASPO	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013932178
База геномов МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН			
Бактерии			
26	NhyDAAO	<i>Natronosporangium hydrolyticum</i> АСРА39	lcl CP070499.1_prot_QSB16697.1_2115
27	NalGOX	<i>Natroglycomyces albus</i> АСРА22	lcl CP070496.1_prot_QSB06127.1_824
Археи			
28	NhaDAAO	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575300
29	NhaGOX	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575587

*Новые последовательности DAAO из экстремофильных микроорганизмов, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом.

Построение модельных 3D-структур и их сравнительный анализ с известными структурами

Как уже отмечалось во «Введении», целью поиска и клонирования новых генов является не просто получение рекомбинантного фермента, а создание биокатализатора с заданными свойствами с использованием в качестве исходного фермента, наиболее

близкого к целевому. В случае DAAO сделать вывод о свойствах (в первую очередь о субстратной специфичности и оптимальном pH-профиле активности) на основе выравнивания просто невозможно. В связи с этим требуется использование дополнительных методов. Для решения поставленной задачи нами предложен подход, основанный на построении модельных трехмерных структур. На первом этапе

модельные структуры новых ферментов сравнивают с экспериментальными и модельными структурами известных оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз.

Опубликовано много примеров, когда ферменты с низкой гомологией имеют очень близкую пространственную структуру. Наглядным примером является супервторичная структура, называемая укладкой по Россману (Rossmann fold), универсальной для связывания адениновой части различных кофакторов и коферментов – NAD(P)⁺, FAD, ATP, SAM и др. [31]. Использование такого подхода к DAAO до недавнего времени было невозможно в силу отсутствия репрезентативного набора структур. Экспериментальные структуры получены всего для четырех ферментов – RtoDAAO и RemDAAO дрожжей и ферментов из почки свиньи (pkDAAO) и человека (hDAAO). Построена модельная структура TvaDAAO [32]. Однако этот фермент как по первичной (рис. 1), так и по третичной (табл. 2) структуре очень близок к RemDAAO. Кроме того, использованные ранее методы моделирования давали неплохие результаты только при высокой гомологии последовательностей изучаемого фермента и фермента, структура которого используется в качестве основы (template) для построения модельной 3D-структуры. Высокая точность достигалась при гомологии не менее 50–60%, что не соблюдается в случае DAAO. Ситуация кардинально изменилась, когда в 2021 году предложили новый алгоритм построения модельных структур AlphaFold [33]. В 2022 году точность предсказания была существенно улучшена [19]. Использование AlphaFold2 позволяет получить достоверную информацию о структуре как новых ферментов, так и уже описанных DAAO. Такие модельные структуры и построены в нашей работе. Всего выполнено моделирование структур 18 белков (в том числе восьми новых). В табл. 2 представлены результаты попарного сравнения модельных и экспериментальных структур оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз. В данном случае набор анализируемых структур DAAO дополнен двумя экспериментальными структурами DAAO млекопитающих – из почки свиньи и человека, и структурами двух глицинооксидаз. Кроме того, для сравнения использовали и собственные предварительные данные рентгеноструктурного анализа TvaDAAO и OpaDAAO1. Такой расширенный набор позволяет более точно провести сравнение и повысить достоверность отнесения новых белков к DAAO или GOX. Для удобства восприятия результаты сравнения, приведенные в табл. 2, выделены цветом. Зеленым фоном показаны результаты сравнения структур с RMSD до 1 Å, светло-зеленым – с RMSD от 1 до 2 Å, светло-оранжевыми – с RMSD

от 2 до 6 Å и оранжевым – с RMSD выше 6 Å. Можно отметить несколько важных и интересных результатов анализа данных табл. 2.

1. Последняя модификация алгоритма AlphaFold в версии 2022 года [19] действительно позволяет получить модельные структуры с очень высокой точностью. Это хорошо видно при сравнении модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1. Среднеквадратичное отклонение между этими структурами составляет всего 0.38 Å. RMSD между модельной и экспериментальной структурами TvaDAAO немного больше – 0.56 Å (в табл. 2 не показано), но следует учитывать, что эти ферменты имеют разную олигомерную структуру (OpaDAAO1 – мономер, TvaDAAO – димер). Высокая точность предсказания структуры OpaDAAO1 приводит к тому, что попарное сравнение модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1 с модельными и экспериментальными структурами других ферментов дает практически одинаковые значения RMSD (табл. 2, строки 1 и 8).

2. Наблюдается четкая корреляция между функцией и общей структурой оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз. Величина отклонения RMSD между структурами DAAO не превышает 2 Å, в то время как при сравнении структур DAAO и GOX значение RMSD составляет 3 Å и более (до 15–18 Å). Из общей картины выпадают результаты с NhaDAAO из архей – отклонение модельной структуры от структур других DAAO составляет 2.0–3.5 Å (в случае OpaDAAO3 отклонение достигает даже 4.69 Å). В то же время разница в структуре NhaDAAO с глицинооксидазами намного больше – от 9 до 17 Å. Также отметим, что этот фермент имеет общую структуру, близкую к DAAO человека (RMSD всего 1.96 Å). Такие результаты показывают, что для корректного подтверждения, что данный фермент является DAAO, следует использовать как можно более широкую выборку структур известных оксидаз D-аминокислот. Тем не менее, несмотря на то что результаты общего сравнения структуры NhaDAAO со структурами других DAAO в целом немного выходят за пределы граничного значения 2 Å, анализ гомологии и сравнение общей структуры позволили отнести этот фермент к оксидазам D-аминокислот. Этот вывод полностью подтверждает результаты сравнения структуры активных центров.

Сравнительный анализ структур активных центров DAAO

На следующем этапе мы сравнили структуры активных центров новых DAAO с известными оксидазами D-аминокислот. Совпадение структуры нового фермента со структурой активного центра другой

Таблица 2. Среднеквадратичное отклонение между структурами оксидаз D-аминокислот и глициноксидаз*

Фермент	<i>OpaDAAO1</i>	0.00	0.79	0.43	1.19	1.24	1.37	0.89	0.38	0.93	1.00	1.40	1.33	6.22	7.72	3.50	0.98	2.79	3.13	1.05	4.61	1.23	0.80	0.92	1.52	<i>GthDAAO</i>
	<i>OpaDAAO2</i>	0.79	0.00	0.71	0.81	0.74	1.06	0.66	0.82	0.84	0.79	1.46	1.34	5.51	10.29	2.22	0.91	7.72	4.31	0.80	5.66	0.87	0.86	0.79	0.96	<i>RtaDAAO</i>
	<i>OpaDAAO3</i>	0.43	0.71	0.00	1.14	1.12	1.13	0.89	0.53	1.15	0.83	1.53	2.74	6.20	12.49	4.69	1.00	5.01	13.81	0.82	7.17	1.10	0.88	0.82	1.19	<i>CthDAAO</i>
	<i>OpaDAAO4</i>	1.19	0.81	1.14	0.00	0.96	1.30	1.01	1.21	1.17	1.08	2.00	2.33	3.10	21.04	2.21	1.10	3.94	2.79	0.99	3.07	1.31	1.36	1.27	1.15	<i>RbaDAAO</i>
	<i>OpaDAAO5</i>	1.24	0.74	1.12	0.96	0.00	1.45	0.97	1.16	1.20	1.07	2.99	2.96	3.31	19.18	3.90	1.14	3.72	11.66	1.04	5.26	1.53	1.12	1.16	1.70	<i>PaeGOX</i>
	<i>OpaDASPO</i>	1.37	1.06	1.13	1.30	1.45	0.00	1.19	1.36	1.01	1.15	1.58	2.30	2.85	6.44	3.24	0.95	6.71	3.98	1.00	3.76	1.14	1.18	1.04	1.03	<i>RraDAAO</i>
	<i>TvaDAAO_RSA</i>	0.89	0.66	0.89	1.01	0.97	1.19	0.00	0.78	0.88	0.73	1.98	1.94	4.33	6.27	3.54	0.95	7.32	4.60	0.84	11.75	0.98	1.21	0.96	1.05	<i>NhaGOX</i>
	<i>OpaDAAO1_RSA</i>	0.38	0.82	0.53	1.21	1.16	1.36	0.78	0.00	0.98	0.92	1.45	1.35	5.95	9.63	3.46	1.04	2.94	4.25	1.04	4.87	1.23	0.88	0.93	1.49	<i>NalGOX</i>
	<i>RtoDAAO_1C0P</i>	0.93	0.84	1.15	1.17	1.20	1.01	0.88	0.98	0.00	0.88	1.47	1.52	3.66	3.85	2.05	0.89	7.28	5.70	0.86	3.65	0.86	0.82	0.93	1.16	<i>NhyDAAO</i>
	<i>RemDAAO_7CT4</i>	1.00	0.79	0.83	1.08	1.07	1.15	0.73	0.92	0.88	0.00	1.56	1.94	4.81	15.72	3.09	0.91	11.83	2.71	0.78	3.79	0.99	1.01	0.96	1.15	<i>NhaDAAO</i>
	<i>hDAAO_2DU8</i>	1.40	1.46	1.53	2.00	2.99	1.58	1.98	1.45	1.47	1.56	0.00	0.41	4.50	4.52	1.96	1.09	8.68	9.48	1.16	8.13	1.10	1.38	1.12	1.12	<i>IDA_OX_6PXS</i>
	<i>pkDAAO_1KIF</i>	1.33	1.34	2.74	2.33	2.80	2.30	1.94	1.35	1.52	1.94	0.41	0.00	3.78	4.22	2.83	1.05	4.76	4.67	1.08	5.36	1.07	1.31	1.05	1.07	<i>GOX_1NG4</i>
	<i>GOX_1NG4</i>	6.12	5.51	6.20	3.10	3.31	2.85	4.33	6.11	3.66	4.81	4.50	3.78	0.00	1.33	17.38	2.31	1.24	1.01	2.15	1.21	3.29	3.56	5.44	2.78	<i>IDA_Ox_6PXS</i>
	<i>IDA_Ox_6PXS</i>	7.72	10.29	12.49	21.04	19.18	6.44	6.27	9.63	3.85	14.20	5.03	4.22	1.33	0.00	9.26	4.28	1.13	0.91	2.67	1.45	6.90	2.69	5.01	3.35	<i>NhaDAAO</i>
	<i>NhaDAAO</i>	3.50	2.25	4.69	2.21	3.90	3.24	3.54	3.46	2.05	3.09	1.96	2.83	17.38	9.26	0.00	1.19	9.48	5.26	0.88	10.28	2.59	1.67	2.01	3.00	<i>NhyDAAO</i>
	<i>NhyDAAO</i>	0.98	0.91	1.00	1.10	1.14	0.95	0.95	1.04	0.89	0.91	1.09	1.05	2.31	4.28	1.19	0.00	1.95	3.09	0.56	2.19	0.50	0.71	0.46	0.70	<i>NalGOX</i>
	<i>NalGOX</i>	2.79	7.72	5.01	3.94	3.72	6.25	7.32	2.94	7.28	12.83	8.68	4.76	1.24	1.13	16.19	1.95	0.00	1.21	3.99	1.54	1.51	2.43	3.79	5.80	<i>NhaGOX</i>
	<i>NhaGOX</i>	3.13	4.31	13.81	2.79	11.66	3.98	4.60	4.25	5.70	2.71	9.48	4.67	1.01	0.91	5.26	3.09	1.21	0.00	2.95	1.16	11.37	5.12	5.19	6.13	<i>RraDAAO</i>
	<i>RraDAAO</i>	1.05	0.80	0.82	0.99	1.04	1.00	0.84	1.04	0.86	0.78	1.16	1.08	2.15	2.67	0.88	0.56	3.99	2.95	0.00	2.33	0.52	0.59	0.41	0.61	<i>PaeGOX</i>
	<i>PaeGOX</i>	4.61	5.66	7.16	3.07	5.26	3.76	11.75	4.87	3.65	3.79	8.13	5.36	1.21	1.45	10.28	2.19	1.54	1.16	2.33	0.00	3.31	3.67	3.15	2.96	<i>RtaDAAO</i>
	<i>RtaDAAO</i>	1.23	0.87	1.10	1.31	1.53	1.14	0.98	1.23	0.86	0.99	1.10	1.07	3.29	6.90	2.59	0.50	1.51	11.37	0.52	3.31	0.00	0.56	0.45	0.78	<i>CthDAAO</i>
	<i>CthDAAO</i>	0.80	0.86	0.88	1.36	1.12	1.18	1.21	0.88	0.82	1.01	1.38	1.31	3.56	2.59	1.67	0.71	2.43	5.12	0.59	3.67	0.56	0.00	0.63	0.94	<i>RraDAAO</i>
	<i>RraDAAO</i>	0.92	0.79	0.82	1.27	1.16	1.04	0.96	0.93	0.93	0.96	1.12	1.05	5.44	5.01	2.01	0.46	3.79	5.19	0.41	3.15	0.45	0.63	0.00	0.64	<i>GthDAAO</i>
	<i>GthDAAO</i>	1.52	0.96	1.19	1.15	1.70	1.03	1.05	1.49	1.16	1.15	1.13	1.07	2.78	3.35	3.00	0.70	5.80	6.13	0.61	2.96	0.78	0.94	0.64	0.00	

*Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом.

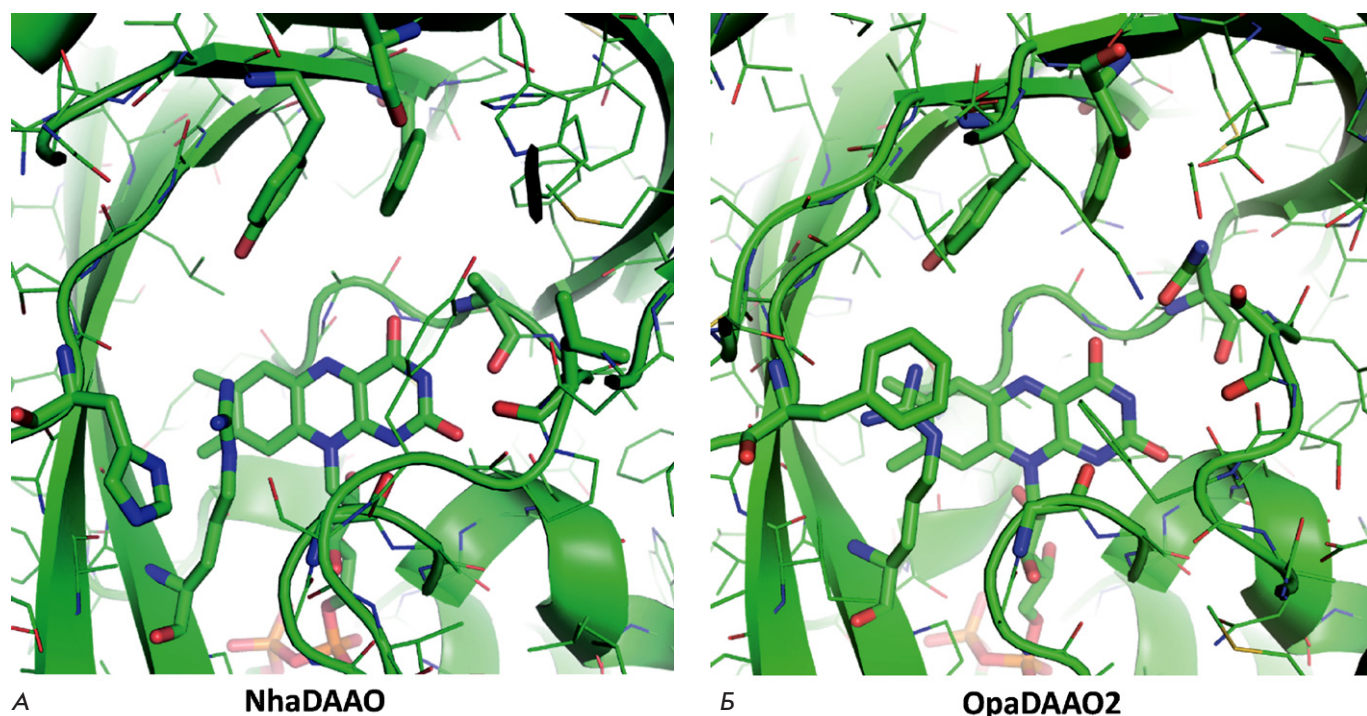


Рис. 3. Модельные структуры активных центров NhaDAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (А) и OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 (Б)

описанной ранее оксидазы D-аминокислот однозначно доказывает принадлежность новой DAAO к семейству оксидаз. Структура FAD-связывающего домена должна быть очень близкой во всех DAAO, однако из-за различной специфичности структура субстратсвязывающих доменов должна отличаться достаточно значительно как по объему, так и по типу остатков, участвующих в связывании конкретной D-аминокислоты. Поэтому совпадение структур субстратсвязывающих доменов активного центра позволяет однозначно доказать, что новый фермент относится к семейству DAAO и сделать достаточно достоверный вывод о возможном спектре субстратной специфичности. В этом случае особенно полезно сравнение со структурами активных центров DAAO из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1, поскольку эти ферменты сильно отличаются друг от друга как по профилю субстратной специфичности, так и по pH-зависимостям активности и стабильности. Наиболее наглядно эффективность такого сравнения видна на примере NhaDAAO из архей. Как отмечено выше, этот фермент имеет заметные отличия от других DAAO как по длине аминокислотной последовательности, так и по общей структуре. Однако результаты сравнения структуры именно активных центров свидетельствуют, что NhaDAAO и OpaDAAO2 имеют практически идентичные активные центры (рис. 3). При выравнивании общих структур по кофактору FAD видно,

что в субстратсвязывающем домене помимо консервативного остатка Arg (см. выше) имеются еще два участвующих в связывании субстрата остатка – Tyr и Phe, расположение которых в активных центрах NhaDAAO и OpaDAAO2 практически идентично. Кроме того, результаты моделирования структуры активного центра самой OpaDAAO2 полностью согласуются с экспериментальными данными, согласно которым наилучшими субстратами являются D-аминокислоты с гидрофобными боковыми группами – D-Phe (самая высокая активность), D-Tyr и D-Leu. Поэтому вполне логично предположить, что таким же спектром субстратной специфичности должна обладать и NhaDAAO. По результатам сравнения с активным центром OpaDAAO3 предсказана также высокая специфичность к D-Leu и D-Phe и фермента из *N. hydrolyticum* АСРА39 (NhyDAAO) (на рис. не показано). В настоящее время ген этого фермента клонирован в нашей лаборатории, проводятся работы по его экспрессии в клетках *E. coli*. Предварительные эксперименты подтвердили, что наилучшим субстратом NhyDAAO являются именно D-Leu и D-Phe (детальное описание получения и изучение свойств NhyDAAO будет представлено в отдельной публикации).

Сравнение структур DAAO показало, что активные центры ферментов из *G. thermophila* (GthDAAO) и из *R. radiotolerans* DSM 5868 (RraDAAO) достаточно уникальны. В GthDAAO в связывании боковых

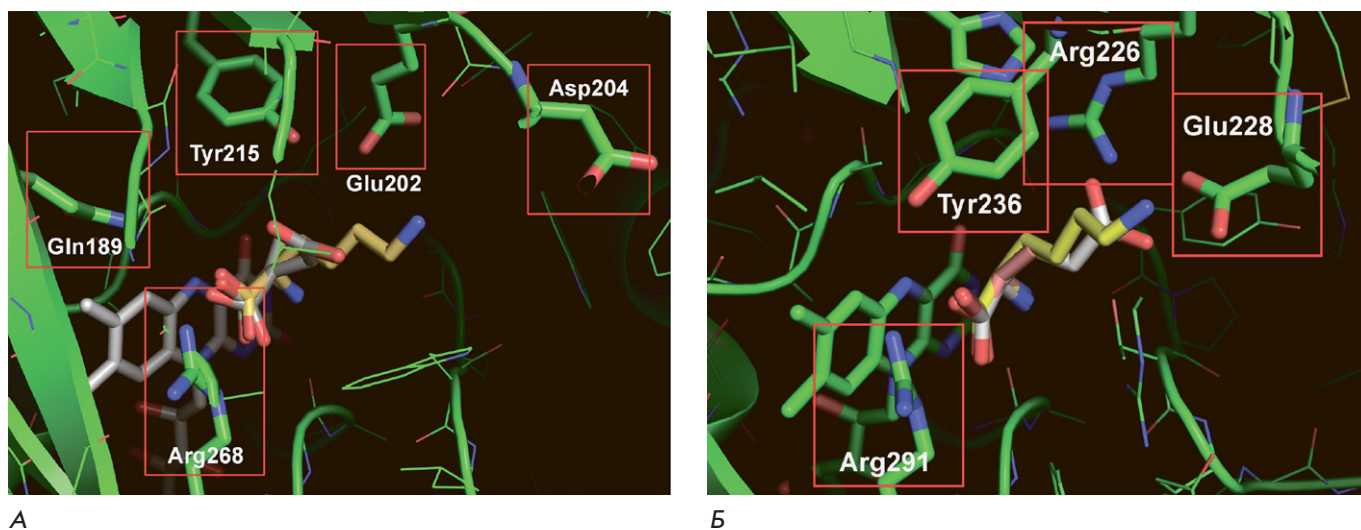


Рис. 4. Докинг D-Ala, D-Asp и D-Lys в активный центр DAAO из *G. thermophila* (А) и докинг D-Ala, D-Glu и D-Lys в активный центр DAAO из *R. radiotolerans* DSM 5868 (Б)

групп субстратов должны принимать участие карбоксильные группы боковых групп остатков Glu202 и Asp204 (рис. 4А). Это предполагает, что данный фермент может быть специфичен к D-Lys и D-Arg, однако докинг различных D-аминокислот свидетельствует, что обе карбоксильные группы остатков Glu202 и Asp204 расположены на довольно большом расстоянии (более 3 Å) от молекулы субстрата. Более интересная картина наблюдается в случае RraDAAO (рис. 4Б). В связывании боковых групп субстрата могут участвовать положительно заряженный остаток Arg226 и отрицательно заряженный остаток Glu228. Докинг в активный центр различных D-аминокислот позволяет предположить, что RraDAAO должна быть специфичной к положительно заряженному D-Lys и потенциально активной с D-Glu. Клонирование гена этого фермента представляет интерес, так как D-Lys является плохим субстратом для всех описанных DAAO.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать несколько выводов.

Введение второго этапа – структурного анализа – при идентификации генов новых оксидаз D-аминокислот, после проведения поиска в геномах по гомологии является высокоэффективной и необходимой процедурой. На этом этапе удается не только однозначно подтвердить принадлежность нового фермента к DAAO, но и предсказать возможный спектр его субстратной специфичности. Достоверность такого предсказания для новой DAAO из бактерий *R. radiotolerans* DSM 5868 высокой активности с D-Leu и D-Phe подтверждена экспериментально.

Аминокислотные последовательности оксидаз D-аминокислот из бактерий имеют низкую гомологию (не более 30%). В ходе анализа последовательностей бактериальных DAAO выявлены новые характерные консервативные участки, которые могут быть использованы для идентификации данных ферментов при их поиске в геномах. Присутствие новых консервативных участков показано и в последовательности DAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO).

Впервые ген оксидазы D-аминокислот найден в геноме архей. По сравнению с бактериальными DAAO фермент NhaDAAO из архей имеет более длинную аминокислотную последовательность и меньшее сходство общей трехмерной структуры, но результаты структурного анализа однозначно показали, что активный центр NhaDAAO практически идентичен активному центру OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1. Также в геноме *N. halalkaliphilus* AArch4 идентифицирована глициноксидаза, которая по своей гомологии наиболее близка к GOX из *P. aeruginosa*.

Оксидазы D-аминокислот играют важную роль в функционировании микроорганизмов и млекопитающих. Именно поэтому поиск ингибиторов hDAAO человека является одним из самых активных и актуальных направлений исследований этого фермента [34]. Достоверная идентификация в геноме возбудителя туберкулеза гена оксидазы D-аминокислот (MucDAAO) позволяет рассматривать этот фермент в качестве мишени для разработки нового типа лекарств против туберкулеза. В силу редкой встречаемости DAAO в бактериях и благодаря существенным отличиям этого фермента от других DAAO (в первую очередь от hDAAO) специфические инги-

биторы, связывающиеся именно с МусДААО, могут быть использованы в качестве противотуберкулезных средств. ●

*Авторы декларируют отсутствие
конфликта интересов.*

*Поиск генов новых оксидаз D-аминокислот
в геномах экстремофильных бактерий
и архей выполнен в рамках Соглашения
№ 075-15-2021-1396 от 26.10.2021
о предоставлении из федерального бюджета
грантов в форме субсидий на реализацию*

*отдельных мероприятий Федеральной научно-
технической программы развития генетических
технологий на 2019–2027 годы. Клонирование
генов, экспрессия, выделение, характеристика
и построение модельных структур
ферментов из дрожжей *O. parapolymorpha*
DL-1 выполнены в рамках гранта Российского
фонда фундаментальных исследований
(РФФИ № 21-34-70040 мол_а_мос.). Анализ
последовательностей ферментов из патогенных
микроорганизмов выполнен в рамках
государственного задания.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 1. P. 40–54. doi: 10.1007/s10541-005-0050-2
- Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M.S., Molla G. // *Cell Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. P. 1373–1394. doi: 10.1007/s00018-007-6558-4
- Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O., Cavarec L., Palicio M., Abderrahim H., Bougueleret L., Barry C., Tanaka H., La R.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 13675–13680. doi: 10.1073/pnas.182412499
- Cheng Y.J., Lin C.H., Lane H.Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(20). P. 10917. doi: 10.3390/ijms222010917
- Pernot P., Mothet J.P., Schuvailo O., Soldatkin A., Pollegioni L., Pilone M., Adeline M.T., Cespuoglio R., Marinesco S. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 1589–1597. doi: 10.1021/ac702230w
- Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. P. 1511–1518. doi: 10.1134/s0006297908130105
- Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. P. 1–16. doi: 10.1007/s00253-007-1282-4
- Pollegioni L., Molla G. // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 276–283. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.010
- Takahashi S., Abe K., Kera Y. // *Bioengineered*. 2015. V. 6. P. 237–241. doi: 10.1080/21655979.2015.1052917
- Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. P. 467–473. doi: 10.1021/bp034206q
- Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 4412. doi: 10.3390/ijms20184412
- Isogai T., Ono H., Ishitani Y., Kojo H., Ueda Y., Kohsaka M. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. P. 1063–1069. doi: 10.1093/oxford-journals.jbchem.a123306
- Gonzalez F.J., Montes J., Martin F., Lopez M.C., Ferminan E., Catalan J., Galan M.A., Dominguez A. // *Yeast*. 1997. V. 13. P. 1399–1408. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:15<1399
- Pollegioni L., Molla G., Campaner S., Martegani E., Pilone M.S. // *J. Biotechnol.* 1997. V. 58. P. 115–123. doi: 10.1016/s0168-1656(97)00142-9
- Klomp maker S.H., Kilic A., Baerends R.J., Veenhuis M., van der Klei I.J. // *FEMS Yeast Res.* 2010. V. 10. P. 708–716. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00647.x
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. V. 65. P. 627–633. doi: 10.1271/bbb.65.627
- Shimekake Y., Furuichi T., Abe K., Kera Y., Takahashi S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 11948. doi: 10.1038/s41598-019-48480-y
- Atroshenko D., Shelomov M., Zhgun A., Avdanina D., Eldarov M., Pometun A., Chubar T., Savin S., Tishkov V. // *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8(S1). P. 190. doi: 10.1002/2211-5463.12453
- Jumper J., Hassabis D. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 11–12. doi: 10.1038/s41592-021-01362-6
- Mirdita M., Schutze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 679–682. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501. doi: 10.1107/S0907444910007493
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. P. 2785–2791. doi: 10.1002/jcc.21256
- Santos-Martins D., Solis-Vasquez L., Tillack A.F. // *J. Chem. Theory. Comput.* 2021. V. 17. P. 1060–1073. doi: 10.1021/acs.jctc.0c01006
- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khijniak T.V., Zaharycheva A.P., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Sproer C., Evtushenko L.I., Kublanov I.V., Hahnke R.L. // *Appl. Microbiol.* 2022. V. 45. P. 126307. doi: 0.1128/AEM.02193-14
- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Zakharycheva A.P., Elcheninov A.G., Hahnke R.L., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Kublanov I.V., Evtushenko L.I. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. P. 04804. doi: 10.1099/ijsem.0.004804
- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S., Khijniak T.V., Kublanov I.V. // *Appl. Microbiol.* 2019. V. 42. P. 309–318. doi: 10.1016/j.jsy-apm.2019.01.001
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. P. 38–54. PMID: 22649703
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biochemistry (Moscow)*. 2004. V. 69. P. 1252–1267. doi: 10.1007/s10541-005-0071-x.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. P. 89–110. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003
- Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W., Rob A., Stillman T.J. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 228. P. 662–671. doi: 10.1016/0022-2836(92)90848-e
- Rao S.T. Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 76. P. 241–256. doi: 10.1016/0022-2836(73)90388-4
- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V., Cherskova, N.V., Savin S.S., Uporov I.V. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2010. V. 65. № 3. P. 121–126. doi: 10.3103/S0027131410030028
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Zidek A., Potapenko A., et al. // *Nature*. 2021. V. 596. P. 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Pollegioni L., Sacchi S., Murtas G. // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. P. 107. doi: 10.3389/fmolb.2018.00107

УДК 571.27

Липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует эффекты липотейхоевой кислоты – агониста Toll-подобного рецептора 2

С. В. Зубова^{1*}, Н. И. Косякова², С. В. Грачев^{1,3}, И. Р. Прохоренко¹¹Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, 142290 Россия²Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, 142290 Россия³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступила в редакцию 07.06.2022

Принята к печати 02.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11747

РЕФЕРАТ Липополисахариды (LPS) и липотейхоевые кислоты (LTA) являются главными индукторами воспалительных ответов клеток крови, вызываемых грамотрицательными и некоторыми грамположительными бактериями. CD14 – общий рецептор LPS и LTA, передает лиганды на TLR4 и TLR2 соответственно. Нами показано, что нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует синтез провоспалительных цитокинов при активации клеток крови LTA *Streptococcus pyogenes*, связываясь с рецептором CD14, что приводит к блокировке передачи сигнала к TLR2/TLR6. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG можно рассматривать как прототип для создания препаратов, защищающих клетки крови от действия LTA грамположительных бактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА липополисахариды, *Rhodobacter capsulatus*, липотейхоевые кислоты, TLR, CD14, цитокины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ LPS – липополисахарид; LTA – липотейхоевая кислота; CD – кластер дифференцировки; ERK – киназа, регулируемая внеклеточным сигналом; IL – интерлейкин; JNK – N-концевая киназа c-Jun; LBP – LPS-связывающий белок; MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; NF-κB – ядерный фактор транскрипции κB; PAMP – молекулярные структуры, связанные с патогеном; PI3K – фосфатидилинозит-3-киназа; PKC – протеинкиназа C; TLR – Толл-подобный рецептор; TNF-α – фактор некроза опухоли α.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение механизмов воспаления, вызванного лигандами различной природы, является одним из приоритетных направлений современной биомедицины. В нашей работе рассмотрена возможность использования липополисахарида (LPS) *Rhodobacter capsulatus* PG, нетоксичного антагониста эндотоксинов, для изучения механизмов функциональных ответов клеток врожденного иммунитета на PAMP различной природы. LPS и липотейхоевые кислоты (LTA) – главные элементы клеточной стенки грамотрицательных и грамположительных бактерий, обладают иммуностимулирующей активностью. LPS – это гликолипиды, состоящие из трех структурных доменов: липида А, олигосахарида кора и O-антигена, и локализованные во внешнем

лепестке внешней мембраны грамотрицательных бактерий, а LTA – это амфифильные ди- и триацилированные липопептиды, заякоренные на внешней стороне цитоплазматической мембраны грамположительных бактерий. В некоторых аспектах LTA рассматриваются как эквивалент LPS, ответственный за развитие септического шока, вызываемого грамположительными бактериями [1]. TLR4 и TLR2, экспрессированные на поверхности клеток крови, узнают эти биологически активные молекулы. TLR4 был идентифицирован как специфический рецептор к LPS, индуцирующий высвобождение провоспалительных цитокинов моноцитами и макрофагами, стимулированными эндотоксинами [2]. TLR2 узнает ди- или триацилированные LTA грамположительных бактерий, иницируя иммунные ответы [3, 4].

LTA *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumonia* связываются непосредственно с TLR2 [5–7]. В доставке LPS к рецептору участвует белок LBP крови, который связывается с LPS и передает его в форме мономера мембраносвязанному рецептору CD14, далее к MD-2 и TLR4 [8]. В доставке LTA к TLR2 также участвуют LBP и CD14 [4]. CD14 входит в мультилигандный рецепторный комплекс и опосредует разнообразные клеточные ответы, связанные с передачей сигналов от TLR2 и TLR4 [9]. CD14 усиливает активацию TLR2, облегчая связывание липопептидов и гетеродимеризацию TLR2 с TLR1 или TLR6. Активация комплекса TLR2/TLR6 диацелированными липопептидами, в частности LTA, происходит с участием рецептора CD36 [10]. Чтобы TLR4 функционировал как рецептор LPS, необходим фактор миелоидной дифференцировки MD-2 [11]. MD-2 физически ассоциирован с TLR2, но слабее, чем MD-2 с TLR4 [12]. Показано, что эта вспомогательная молекула усиливает опосредованные TLR2 ответы на LTA [13]. Передача сигналов от TLR2 и TLR4 запускается индуцированной лигандами димеризацией рецепторов. В отличие от TLR4, который в ответ на LPS передает сигналы в виде гомодимера (TLR4)₂, TLR2 при распознавании LTA формирует гетеродимер с TLR6 или TLR1 [14, 15]. Бактериальные компоненты LTA и LPS запускают внутриклеточный сигнальный каскад через TLR2 и TLR4 по сходному сигнальному пути, приводящему к активации транскрипционного фактора NF- κ B, PKC, PI3K, ERK, JNK и p38 MAPK и к синтезу провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 и хемокина IL-8 [16]. LPS целого ряда грамотрицательных бактерий, не относящихся к энтеробактериям, активируют клетки миелоидной линии через TLR2 [17, 18]. К особенностям липидов A этих LPS относятся наличие фосфорилированного диглюкозамина, длина углеводородных цепей остатков жирных кислот, отличная от длины цепей у энтеробактериальных LPS, или присутствие разветвленных ацильных цепей [19]. Нетоксичный LPS грамотрицательной фототрофной бактерии *Rhodobacter capsulatus* PG является антагонистом эндотоксинов [20, 21]. Этот LPS способен блокировать активацию клеток крови, которая приводит к высвобождению широкого спектра провоспалительных цитокинов, вызванному эндотоксинами [22]. Синтетический аналог липида A из *R. capsulatus*, E5531, подавляет работу TNF- α моноцитами крови человека, активированными LPS *Escherichia coli* 0111:B4 или LTA *Staphylococcus faecalis*, практически не проявляя собственной активности [23]. Структура нетоксичного липида A LPS *Rhodobacter capsulatus* вклю-

чает в дисахаридную основу дифосфорилэтиламин при C-1 и фосфорилэтиламин при C-4', а также ненасыщенную жирную кислоту (12:1) [24]. На основании этих структурных особенностей липида A мы предположили, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, подобно E5531, может конкурировать с LTA *Streptococcus pyogenes* за TLR2, блокируя активацию синтеза провоспалительных цитокинов клетками крови.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на цельной крови здоровых добровольцев обоего пола в возрасте от 25 до 30 лет. Все испытуемые дали письменное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования соответствует Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и одобрен Локальным этическим комитетом больницы Пущинского научного центра (№ 2 от 10.04.2014). Забор периферической крови осуществляли в клинических условиях с использованием вакутейнеров (Becton Dickinson and Company, Великобритания), обработанных гепарином натрия (17 ед./мл).

Активация клеток крови LPS и LTA

Для исследования влияния LPS и LTA на синтез цитокинов и хемокинов кровь разводили средой RPMI 1640 в соотношении 1:10 и инкубировали с LPS *E. coli* 055:B5 (100 нг/мл), LPS *Salmonella enterica* серотип Typhimurium (100 нг/мл), LTA *Streptococcus pyogenes* (1000 нг/мл) (Sigma-Aldrich, США) или LPS *Rhodobacter capsulatus* PG (1000 нг/мл) в различных сочетаниях в течение 6 и 24 ч при 37°C в 5% CO₂. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG был получен согласно методике, описанной ранее [25]. Для определения антагонистического действия LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в отношении LPS *E. coli*, *S. enterica* или LTA *S. pyogenes* в различных сочетаниях кровь в течение 30 мин предынкубировали с LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, после чего добавляли LPS или LTA. Для определения роли рецептора CD14 в активации клеток кровь предварительно инкубировали с антителами (AT) к CD14 (2 мкг/мл) (Purified Anti-human CD14 Clone M5E2, BioLegend, США) в течение 30 мин при 4°C, а затем добавляли LPS или LTA. Образцы инкубировали в течение 6 и 24 ч при 37°C в 5% CO₂. После инкубации клетки крови осаждали центрифугированием (300 g, 10 мин). Супернатанты отбирали и хранили при –20°C до определения содержания цитокинов и хемокинов.

Содержание цитокинов и хемокинов

Содержание цитокинов и хемокинов определяли с помощью наборов для ИФА TNF- α , IL-6, IL-1 β ,

IL-8 («Вектор-БЕСТ», Россия) согласно протоколу производителя. Оптическую плотность образцов определяли на ИФА-анализаторе STAT FAX 3200 (Awareness Technology Inc., США) при длине волны 450 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку и графическое представление результатов проводили методами непараметрической статистики в Origin Pro 7.5 и Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat). Результаты представлены в виде медианных значений с верхним и нижним квартилями (IQR). Статистическую значимость различий между медианными значениями определяли по критерию Манна–Уитни ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* стимулировали значительную, близкую по величине, наработку провоспалительных цитокинов TNF- α (рис. 1), IL-6 (рис. 2) и IL-1 β (рис. 3), а также хемокина воспаления IL-8 (рис. 4), продукция которых значимо превышала контрольные значения. В ответ на активацию LTA также нарабатывались высокие уровни исследуемых цитокинов и хемокинов. Уровень синтеза более позднего цитокина IL-1 β и хемокина IL-8 в ответ на LTA *S. pyogenes* превышал уровни при активации посредством LPS *E. coli* или LPS *S. enterica* (рис. 3, 4).

Нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в концентрации, в 10 раз превышающей концентрацию эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica*, и в равной концентрации с LTA *S. pyogenes* не стимулировал клетки к наработке TNF- α , IL-6 и IL-1 β (рис. 1–3). Количество хемокина IL-8 в крови в ответ на LPS *Rhodobacter capsulatus* PG незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, но было значительно ниже, чем при активации клеток крови эндотоксинами или LTA *S. pyogenes* (рис. 4). Исследование способности LPS *Rhodobacter capsulatus* PG защищать клетки крови от действия эндотоксинов *E. coli* и *S. enterica* показало, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG подавлял синтез цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β в крови, причем блокирование ответа на LPS *S. enterica* было сильнее, чем на LPS *E. coli* (рис. 1–3).

По синтезу хемокина IL-8 защитного эффекта LPS *Rhodobacter capsulatus* PG от действия эндотоксинов не наблюдалось (рис. 4). IL-8 является важным медиатором ответа хозяина на воспаление и инфекцию [26]. Предполагается, что ответ клеток на воздействие бактериальных агентов и синтез IL-8 индуцируются раньше, чем синтез IL-6 [27].

При активации клеток LTA *S. pyogenes* предварительная инкубация крови с LPS *Rhodobacter capsulatus* PG приводила к значительному снижению синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6 и IL-1 β и хемокина IL-8 (рис. 1–4). Из полученных данных следует, что LPS *Rhodobacter capsulatus* PG проявляет антагонистическую активность не только в отношении эндотоксинов, но и в отношении LTA *S. pyogenes*.

В контрольных образцах АТ к CD14 не влияли на активацию синтеза TNF- α в клетках крови (рис. 5). Предварительная инкубация крови с АТ к CD14 при последующей активации клеток LPS *E. coli*, LPS *S. enterica* или LTA *S. pyogenes* более заметно снижала синтез TNF- α , индуцированный LTA, чем эндотоксинами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Толл-подобные рецепторы (TLR) активируют клетки врожденной иммунной системы, распознавая различные микроорганизмы через ассоциированные с патогеном молекулярные паттерны (PAMP), в частности LPS грамотрицательных бактерий и LTA грамположительных бактерий. Рецепторы TLR4 узнают LPS – центральные индукторы воспалительных ответов, вызываемых грамотрицательными бактериями, а TLR2 узнают LTA – индукторы воспалительных ответов, вызываемых грамположительными бактериями [3]. Оба рецептора способны к передаче сигналов, формируя гомодимер (TLR4)₂ или гетеродимер TLR2/TLR6 соответственно. Вариации в количестве ацильных цепей в липиде А эндотоксина могут ослабить сигнализацию через TLR4 и изменить иммунный ответ хозяина на патоген [28]. TLR4/MD-2 распознает гексаацилированный липид А *E. coli* как агонист. Структурные изменения в липиде А других грамотрицательных бактерий снижают их активность в рецепторном комплексе по сравнению с гексаацилированным липидом А. Исследуя способность E5531 – пентаацилированного синтетического аналога липида А *Rhodobacter capsulatus*, ингибировать связывание LPS *E. coli* с моноцитами человека, рассчитали аффинность E5531 к клеткам, которая оказалась в 24 раза ниже, чем у LPS *E. coli* [23]. Для блокирования эффектов LPS *E. coli* или *S. enterica* мы использовали LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в концентрациях, в 10 раз превышающих концентрации эндотоксинов. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG сильнее блокировал синтез провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-6, IL-1 β в клетках, активированных LPS *S. enterica*, чем LPS *E. coli*. Значительно более выраженной была антагонистическая активность LPS *Rhodobacter capsulatus* PG в отношении LTA

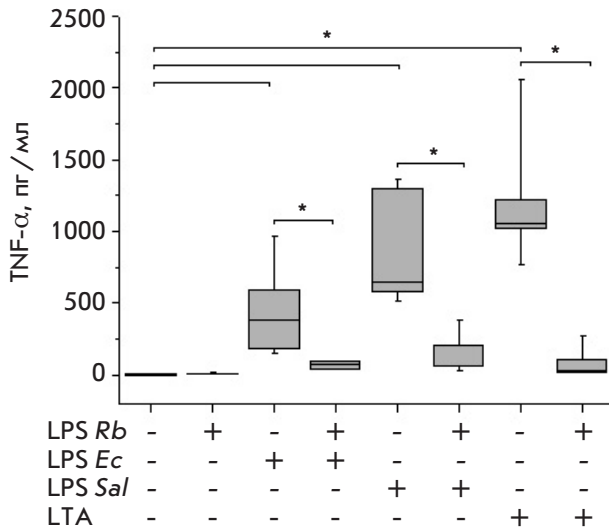


Рис. 1. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию TNF- α при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

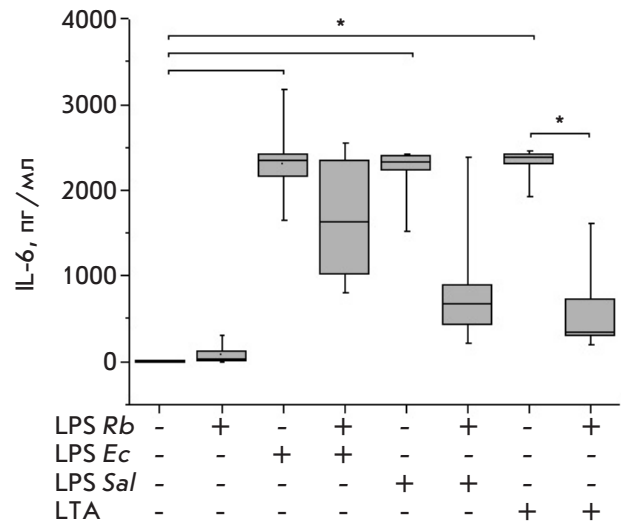


Рис. 2. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-6 при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

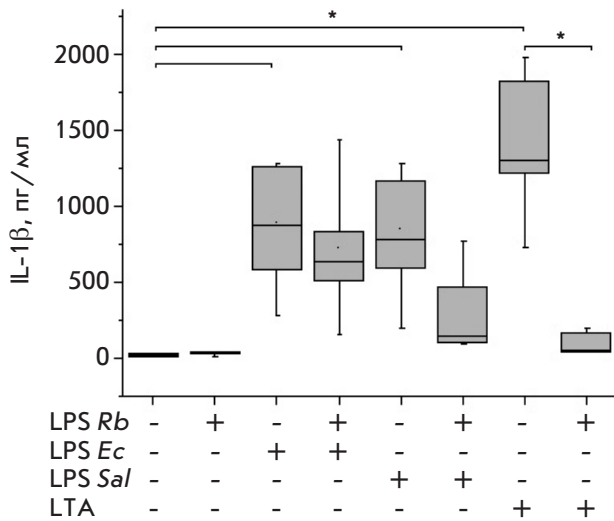


Рис. 3. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-1 β при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

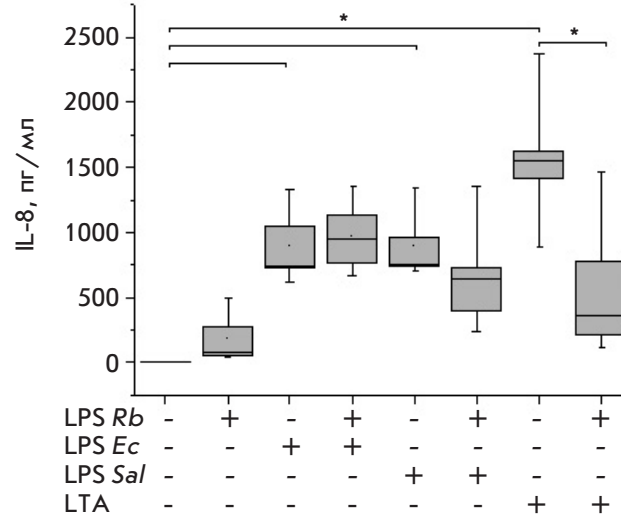


Рис. 4. Влияние LPS *Rhodobacter capsulatus* PG на секрецию IL-8 при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, $n = 7$. * $p < 0.05$

S. pyogenes при использовании равных весовых концентраций LPS *Rhodobacter capsulatus* PG и LTA *S. pyogenes*. Способность LPS *Rhodobacter capsulatus* PG защищать клетки от активации агонистами синтеза цитокинов снижалась в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli* (рис. 1–3). В передаче сигнала как от LPS, так и от LTA критическую роль играет рецептор CD14, который участвует не только в узнавании лигандов рецепторами

TLR4 и TLR2, но и в активации синтеза цитокинов клетками [6, 29]. Экспрессируемые на поверхности клетки рецепторы CD14 с высокой аффинностью связываются с молекулярными лигандами, ассоциированными с различными патогенами. Далее CD14 передает LPS сигнальному комплексу TLR4/MD-2 [30], а LTA – комплексу TLR2/TLR6 [4]. CD14 и CD36 действуют как корецепторы TLR2 в ответе моноцитов на LTA. Блокирование этих рецеп-

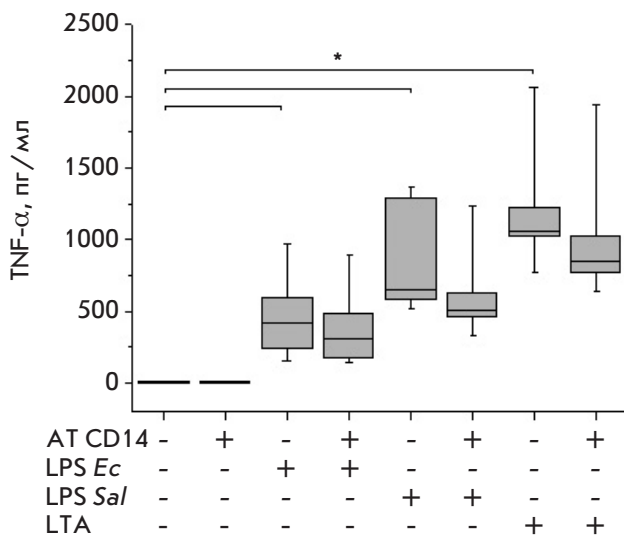


Рис. 5. Влияние AT CD14 на секрецию TNF-α при активации клеток крови LPS *E. coli*, LPS *Salmonella enterica* или LTA *Streptococcus pyogenes*, n = 7. *p < 0.05

торов антителами ингибирует индуцированное LTA высвобождение моноцитами TNF-α, что указывает на участие этих рецепторов в связывании LTA с плазматической мембраной и активации NF-κB [31]. На моноцитах человека показано, что LTA *Streptococcus sanguis* конкурирует с LPS *Salmonella abortusequi* за связывание с CD14, а связывание LPS с CD14 полностью ингибируется, если концентрация LTA в 100 раз превышает концентрацию LPS [32].

Для проверки этого предположения и понимания механизма подавления активации клеток посредством LPS *Rhodobacter capsulatus* PG мы блокировали рецепторы CD14 клеток крови с помощью mAT до активации агонистами LPS или LTA. Наблюдаемый нами невысокий (по сравнению с данными [23]) процент снижения активации при блокировании рецепторов CD14 связан, очевидно, со специфичностью используемых нами антител (Clone M5E2). Предварительная инкубация крови с AT CD14 перед активацией клеток LPS *E. coli*, LPS

S. enterica или LTA *S. pyogenes* более выражено снижала синтез TNF-α, индуцированный LTA, чем эндотоксинами. Полученные нами результаты показали, что CD14 участвует в активации и передаче сигнала к синтезу цитокинов от LPS и LTA, причем это участие снижается в ряду LTA *S. pyogenes* > LPS *S. enterica* > LPS *E. coli* (рис. 5), аналогично снижению эффективности защиты LPS *Rhodobacter capsulatus* PG от активации клеток используемыми агонистами (рис. 1–3).

Можно предположить два возможных механизма блокирования активации клеток посредством LPS *Rhodobacter capsulatus* PG, связанных с различной аффинностью исследованных лигандов к рецепторам CD14: блокирование на уровне взаимодействия с рецептором CD14 или на уровне активации рецепторного комплекса TLR4/MD-2 или TLR2/TLR6.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают, что нетоксичный LPS *Rhodobacter capsulatus* PG блокирует синтез провоспалительных цитокинов при активации клеток крови LTA *S. pyogenes*, путем его связывания с рецептором CD14, что приводит к подавлению передачи сигнала к TLR2/TLR6. LPS *Rhodobacter capsulatus* PG можно рассматривать прототипом для создания препаратов, защищающих клетки крови от действия LTA грамположительных бактерий. ●

Авторы выражают благодарность
Больнице Пуцинского научного центра РАН
за сотрудничество.

Работа выполнена в рамках Госзадания
122041200039-0, созданного Министерством
образования и науки Российской Федерации
на базе Института фундаментальных проблем
биологии РАН ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Авторы заявляют об отсутствии
конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ginsburg L. // Lancet. Infect. Dis. 2002. V. 2. № 3. P. 171–179.
- Zhang G., Meredith T.C., Kahne D. // Curr. Opin. Microbiol. 2013. V. 16. № 6. P. 779–785.
- Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C.J. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 25. P. 17406–17409.
- Schroder N.W.J., Morath S., Alexander C., Hamann L., Hartung T., Zahringer U., Gobel U.B., Weber J.R., Schumann R.R. // Biol. Chem. 2003. V. 278. № 18. P. 15587–15594.
- Im J., Choi H.S., Kim S.K., Woo S.S., Ryu Y.H., Kang S.S., Yun C.H., Han S.H. // Cancer Lett. 2009. V. 274. № 1. P. 109–117.
- Kang J.Y., Nan X., Jin M.S., Youn S.J., Ryu Y.H., Mah S., Han S.H., Lee H., Paik S.G., Lee J.O. // Immunity. 2009. V. 31. № 6. P. 873–884.
- Fieber C., Janos M., Koestler T., Gratz N., Li X.-D., Castiglia V., Aberle M., Sauert M., Wegner M., Alexopoulou L., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0119727.
- Ryu J.-K., Kim S.J., Rah S.-H., Kang J.I., Jung H.E., Lee D., Lee H.K., Lee J.-O., Park B.S., Yoon T.-Y., Kim H.M. // Im-

- munity. 2017. V. 46. V. 1. P. 1–13.
9. Schmitz G., Orso E. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2002. V. 13. № 5. P. 513–521.
10. Triantafilou M., Gamper F.G., Haston R.M., Mouratis M.A., Morath S., Hartung T., Triantafilou K. // *Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 41. P. 31002–31011.
11. Shimazu R., Akashi S., Ogata H., Nagai Y., Fukudome K., Miyake K., Kimoto M. // *J. Exp. Med.* 1999. V. 189. № 11. P. 1777–1782.
12. Dziarski R., Wang Q., Miyake K., Kirsching C.J., Gupta D.J. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 3. P. 1938–1944.
13. Dziarski R., Gupta D.J. // *Endotox. Res.* 2000. V. 6. № 5. P. 401–405.
14. Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Schroeder L., Aderem A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. № 25. P. 13766–13771.
15. Henneke P., Morath S., Uematsu S., Weichert S., Pfitzenmaier M., Takeuchi O., Müller A., Poyart C., Akira S., Berner R., et al. // *Immunol.* 2005. V. 174. № 10. P. 6449–6455.
16. Su S.-H., Hua K.-F., Lee H., Chao L.K., Tan S.-K., Lee H., Yang S.-F., Hsu H.-Y. // *Clin. Chim. Acta.* 2006. V. 374. № 1–2. P. 106–115.
17. Yokota S., Ohnishi T., Muroi M., Tanamoto K., Fujii N., Amano K. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2007. V. 51. № 1. P. 140–148.
18. Girard R., Pedron T., Uematsu S., Balloy V., Chignard M., Akira S., Chaby R. // *J. Cell Sci.* 2002. V. 116. Pt 2. P. 293–302.
19. Erridge C., Pridmore A., Eley A., Stewart J., Poxton I.R. // *J. Med. Microbiol.* 2004. V. 53. Pt 8. P. 735–740.
20. Katzke N., Bergmann R., Jaeger K.-E., Drepper T. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 824. P. 251–269.
21. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010.
22. Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 3. С. 275–283.
23. Kawata T., Bristol J.R., Rossignol D.P., Rose J.R., Kobayashi S., Yokohama H., Ishibashi A., Christ W.J., Katayama K., Yamatsu I., Kishi Y. // *Br. J. Pharmacology.* 1999. V. 127. № 4. P. 853–862.
24. Krauss J.H., Seydel U., Weckesser J., Mayer H. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 180. № 3. P. 519–526.
25. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.Р. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
26. Baggiolini M., Walz A., Kunkel S.L. // *J. Clin. Invest.* 1989. V. 84. № 4. P. 1045–1049.
27. Hirao Y., Kanda T., Aso Y., Mitsuhashi M., Kobayashi I. // *Lab. Med.* 2000. V. 31. № 1. P. 39–44.
28. Kawai T., Akira S. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 5. P. 373–384.
29. Zanoni I., Ostuni R., Marek L.R., Baressi S., Barbalat R., Barton G.M., Granucci F., Kagan J.C. // *Cell.* 2011. V. 147. № 4. P. 868–880.
30. Wright S.D., Ramos R.A., Tobias P.S., Ulevitch R.J., Mathison J.C. // *Science.* 1990. V. 249. № 4975. P. 1431–1433.
31. Nilsen N.J., Deininge S., Nonstad U., Skjeldal F., Husebye H., Rodionov D., von Aulock S., Hartung T., Lien E., Bakke O., Espevik T.J. // *Leukoc. Biol.* 2008. V. 84. № 1. P. 280–291.
32. Sugawara S., Arakaki R., Rikiishi H., Takada H. // *Infect. Immunol.* 1999. V. 67. № 4. P. 1623–1632.

УДК 575.113.5:575.117.2

Комплексный анализ стромальных и сывороточных маркеров при раке желудка

О. В. Ковалева^{1*}, П. А. Подлесная¹, В. Л. Чанг², Н. А. Огнерубов², А. Н. Грачев¹,
Н. А. Козлов¹, И. С. Стилиди¹, Н. Е. Кушлинский¹

¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина
Минздрава России, 115552, Москва, Россия

²Тамбовский государственный университет им. Г.Р. Державина Министерства образования
и науки, 392000, Тамбов, Россия

*E-mail: ovkovaleva@gmail.com

Поступила в редакцию 14.06.2022

Принята к печати 20.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11753

РЕФЕРАТ Комплексный анализ фенотипа клеток воспалительного инфильтрата опухолевой стромы является перспективным направлением молекулярной онкологии. Также крайне актуальным представляется изучение не только мембраносвязанных форм различных молекул, связанных с иммунной регуляцией, но и их растворимых форм. Проведен комплексный анализ тканевых и циркулирующих форм белков PD-1 и PD-L1, а также макрофагов и В-клеток стромы злокачественных опухолей желудка для оценки их клинической и прогностической значимости. Проведен иммуноферментный и иммуногистохимический анализ 63 образцов опухолей и плазмы крови от больных раком желудка. Показано, что злокачественные опухоли желудка сильно инфильтрированы В-клетками, количество которых сравнимо с содержанием макрофагов. Обнаружена ассоциация экспрессии PU.1 с размером опухоли, а именно, опухоли большего размера содержат меньше PU.1+ инфильтрирующих клеток ($p = 0.005$). Не выявлено клинической значимости CD20+ и CD163+ клеток, однако их количество в строме было больше на более ранних стадиях заболевания и при отсутствии метастазов. Показано также, что содержание PD-L1 в опухолевых клетках не ассоциировано с клиническими и морфологическими характеристиками рака желудка, в то время как экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухоли ассоциирована с наличием отдаленных метастазов. Анализ прогностической значимости исследованных маркеров показал, что CD163 статистически значимо ассоциирован с неблагоприятным прогнозом данного заболевания ($p = 0.019$). Отмечена также тенденция к благоприятному прогнозу в случае экспрессии PD-L1 в опухолевых клетках ($p = 0.122$). Полученные нами результаты свидетельствуют о перспективности изучения растворимых и тканевых маркеров опухолевой стромы для прогнозирования течения рака желудка. Актуальным представляется поиск комбинаций маркеров, комплексный анализ которых поможет персонализировать современную противоопухолевую терапию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рак желудка, PD-1, PD-L1, строма, прогноз.

ВВЕДЕНИЕ

Рак желудка (РЖ) – одно из наиболее распространенных видов онкологических заболеваний во всем мире и одна из основных причин смертности от онкологических заболеваний. Заболеваемость РЖ у мужчин выше, чем у женщин [1]. К возникновению РЖ приводит большое количество различных факторов, включая инфекцию *Helicobacter pylori* [2], курение [3], особенности питания [2], генетические нарушения [4] и другие факторы.

Несмотря на известность большинства этиологических факторов возникновения РЖ, раннюю диагностику этого заболевания затрудняет его бессимптомное развитие, что часто приводит к выявлению данной патологии уже на поздних стадиях. При распространенном РЖ применяют стандартные комбинированные схемы терапии, включающие фторпиримидин и препараты платины (а также трастузумаб в случае HER2-положительных опухолей), в качестве препаратов первой линии и паклитаксел

с рамудирумабом или без него в качестве второй линии. Однако медиана выживаемости при распространенном РЖ все еще составляет примерно 12–15 месяцев, поэтому, безусловно, требуется внедрение новых методов лечения [5–7]. В последнее время новым стандартным методом лечения нескольких злокачественных опухолей, включая распространенный РЖ, стали ингибиторы иммунных контрольных точек (ИКИ). Однако успехи иммунотерапии РЖ не очень велики. Проводится большое количество клинических исследований, в которых для достижения максимального эффекта используют различные комбинации иммуно- и химиотерапевтических препаратов. Спорным остается вопрос, влияет ли количество PD-L1+ опухолевых клеток на эффективность терапии и нужно ли учитывать их количество при назначении соответствующего лечения. Кроме того, на успех терапии может повлиять качественный и количественный состав микроокружения опухоли. Например, повышенное количество Th1-клеток способствует воспалению и развитию РЖ [8], а содержание В-клеток, экспрессирующих IL-10, влияет на продукцию цитокинов CD4+ и CD8+ Т-клетками [9].

К основным типам клеток иммунного инфильтрата опухоли относятся макрофаги и Т-клетки, а также В-клетки. Известно, что количество и состав клеток опухолевого микроокружения могут быть как прогностическим фактором течения заболевания, так и маркером ответа на проводимую терапию. Транскрипционный фактор PU.1, играющий важную роль в гемопоэзе, экспрессируется на высоком уровне в макрофагах. Ранее мы показали, что PU.1 можно использовать в качестве маркера макрофагов в строме различных типов солидных опухолей [10]. CD3 является поверхностным маркером зрелых Т-клеток и используется для оценки их содержания в различных типах тканей. Трансмембранный белок CD20 экспрессируется на поверхности В-клеток-предшественников и зрелых В-клеток, что позволяет использовать его в различных клинических исследованиях в качестве общего В-клеточного маркера.

В нашей работе проведен комплексный анализ экспрессии PD-L1 в опухолевых и стромальных клетках РЖ, а также определено содержание растворимой формы PD-L1 в плазме крови пациентов. Проанализировано также содержание макрофагов и ассоциированных с опухолью В-клеток в строме опухолей РЖ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включены 63 первичных больных РЖ с различными стадиями опухолевого

процесса, прошедших обследование и лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина, а также 60 здоровых доноров. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием больных и здоровых доноров, соответствуют стандартам этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам. От каждого из включенных в исследование участника получено информированное добровольное согласие. Клинический диагноз «рак желудка» у всех пациентов подтвержден данными морфологического исследования опухоли согласно Международной гистологической классификации опухолей пищеварительной системы (ВОЗ, 2019). Описание выборки представлено в *табл. 1*.

Концентрацию белков sPD-L1 и sPD-1 определяли в плазме крови, полученной по стандартной методике до начала специфического лечения, с помощью наборов реактивов для иммунофер-

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики больных раком желудка

Характеристика	Число случаев, %
Возраст	
≤61	32 (51)
>61	31 (49)
Пол	
Мужской	35 (56)
Женский	28 (44)
Гистология	
Аденокарцинома	52 (82.5)
Перстневидноклеточный рак	10 (16)
Недифференцированный рак	1 (1.5)
Стадия	
I–II	25 (40)
III–IV	38 (60)
Локализация	
Дистальный отдел	14 (22)
КЭР (кардиоэзофагеальный рак)	3 (5)
Проксимальный отдел	16 (25)
Тело желудка	26 (42)
Тотальное поражение	4 (6)
Размер опухоли (T)	
T1–T2	13 (21)
T3–T4	50 (79)
Наличие регионарных метастазов (N)	
N0	24 (38)
N+	39 (62)
Наличие отдаленных метастазов (M)	
M0	54 (86)
M+	9 (14)
Степень дифференцировки (G)	
G1–G2	19 (30)
G3	44 (70)

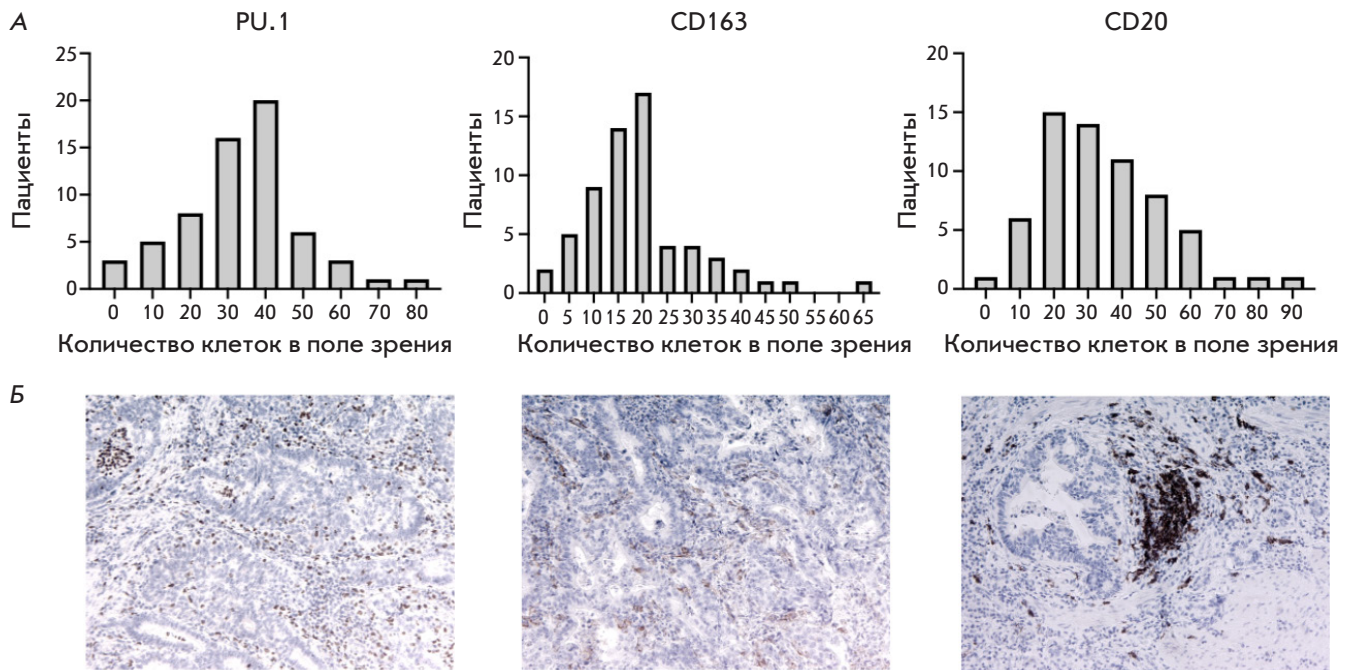


Рис. 1. Распределение PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток в строме опухолей больных РЖ (А) и пример иммуногистохимического окрашивания опухолей желудка с использованием антител к PU.1, CD163 и CD20 ($\times 100$) (Б)

ментного анализа: Human PD-L1 Platinum ELISA, Human PD-1 ELISA kit (Affimetrix, eBioscience, США) в соответствии с инструкциями производителя. Измерения проводили на автоматическом иммуноферментном анализаторе ВЕР 2000 Advance (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия). Содержание маркеров выражали в пикограммах (пг) на 1 мл плазмы крови.

Имуногистохимическое (ИГХ) исследование CD163, PU.1 и CD20 выполнено по стандартной методике на срезах опухолевой ткани. Для демаскировки антигена использовали Трис-EDTA-буфер pH 9.0 («ПраймБиоМед», Россия). Первичные антитела к PU.1 (4G6; «ПраймБиоМед», разведение 1 : 200), CD163 (10D6; BIOCARE, США, разведение 1 : 100) и CD20 (клон PBM-12F1; «ПраймБиоМед», разведение 1 : 100) инкубировали в течение 30 мин. Использовали систему детекции PrimeVision Ms/Rb HRP/DAВ (78-310004, «ПраймБиоМед») согласно инструкциям производителя.

Полученные препараты анализировали с помощью микроскопа OLYMPUS BX53, камеры Lumenera INFINITY2-2C и программного обеспечения Infinity analyze. Оценивали экспрессию CD163, PU.1 и CD20 в строме опухоли. В каждом случае количество CD163, PU.1 и CD20 положительных клеток подсчитывали при увеличении $\times 200$ в пяти независимых полях зрения. Образец считали положительным при наличии хотя бы одной специфически

окрашенной клетки. Содержание CD163, PU.1 и CD20 в строме опухоли выражали как среднее значение количества клеток в поле зрения.

Полученные данные обрабатывали с помощью программы GraphPad Prizm 9.0. Для сравнения показателей и анализа их взаимосвязей использовали непараметрический критерий Манна–Уитни и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Для анализа общей выживаемости больных разделили на две группы сравнения в зависимости от медианы содержания исследуемых белков. Общую выживаемость анализировали путем построения кривых дожития по методу Каплана–Майера. Статистическую значимость различий оценивали с использованием логарифмического рангового критерия. Потенциальное влияние различных факторов риска на выживаемость оценивали с помощью многофакторного анализа с использованием непараметрической модели пропорциональных рисков Кокса. Различия и корреляции считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессию PU.1, CD163 и CD20 выявили в 100% исследованных образцов РЖ. Распределение клеток, содержащих PU.1, CD163 и CD20, в образцах РЖ представлено на рис. 1.

Анализ результатов исследования показал, что медиана содержания PU.1+ клеток в образ-

Таблица 2. Ассоциация PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Характеристика	PU.1 (число клеток)		CD163 (число клеток)		CD20 (число клеток)	
	Медиана (25–75%)	<i>p</i>	Медиана (25–75%)	<i>p</i>	Медиана (25–75%)	<i>p</i>
Возраст						
≤61	35.8 (23.4–42.7)	0.488	17.2 (9.05–22.3)	0.297	28.2 (19.4–45.4)	0.418
>61	34.2 (20.2–42.0)		18.2 (13.2–25.2)		34.4 (20.8–45.2)	
Пол						
Мужской	33.6 (20.2–37.6)	0.150	16.2 (10.4–24.4)	0.713	29.4 (18.8–45.2)	0.403
Женский	37.3 (26.9–44.2)		18.0 (12.9–21.1)		33.9 (22.9–44.9)	
Гистология						
Аденокарцинома	35.0 (20.8–41.9)	0.216	17.6 (11.8–24.1)	0.459	33.3 (19.9–44.8)	0.574
Перстневидноклеточный рак	29.7 (23.3–37.7)		17.5 (10.8–19.7)		30.5 (22.1–47.8)	
Недифференцированный рак	63.4 (63.4–63.4)		28.2 (28.2–28.2)		19.6 (19.6–19.6)	
Стадия						
I–II	35.8 (27.5–44.8)	0.249	17.8 (13.7–20.7)	0.623	34.4 (21.6–46.3)	0.424
III–IV	33.8 (18.0–39.5)		16.7 (10.1–24.6)		29.4 (19.5–43.9)	
Локализация						
Дистальный отдел КЭР	34.8 (28.9–44.1)	0.226	17.5 (12.4–23.4)	0.824	33.8 (24.7–43.1)	0.316
Проксимальный отдел	35.8 (0.4–41.8)		19.4 (14.8–25.2)		23.4 (6.0–24.6)	
Тело желудка	33.6 (12.5–41.2)		17.3 (11.8–24.1)		28.8 (13.3–52.4)	
Тотальное поражение	33.4 (24.4–39.8)		18.1 (11.6–23.6)		37.7 (22.3–47.3)	
Размер опухоли (T)						
T1–T2	41.8 (35.5–54.4)	0.005*	17.8 (14.5–23.0)	0.504	36.0 (26.1–48.1)	0.277
T3–T4	32.9 (19.1–38.7)		17.6 (10.1–23.4)		29.4 (19.5–43.9)	
Наличие регионарных метастазов (N)						
N0	35.5 (25.3–42.8)	0.733	17.3 (12.9–20.0)	0.437	33.3 (19.9–44.4)	0.947
N+	34.8 (20.2–41.4)		17.8 (11.4–28.2)		29.4 (20.6–45.2)	
Наличие отдаленных метастазов (M)						
M0	34.8 (25.6–41.9)	0.889	17.6 (11.2–23.4)	0.598	33.3 (21.1–45.3)	0.214
M+	35.4 (13.6–48.6)		18.4 (12.8–25.4)		29.4 (10.6–40.2)	
Степень дифференцировки (G)						
G1–G2	37.6 (25.0–49.8)	0.131	19.0 (13.2–25.8)	0.448	33.2 (22.0–43.6)	0.796
G3–G4	34.2 (18.7–38.9)		16.2 (10.9–21.5)		33.4 (18.6–45.4)	

*Статистически значимо.

це составила 34.8 (0.4–77.8) клеток в поле зрения, CD163+ клеток – 17.6 (0.8–66.4), CD20+ клеток – 32.2 (3.2–91.2). Следует отметить, что в опухолях желудка В-клетки представлены в таком же количестве, как и PU.1+ макрофаги.

Связь количества PU.1+, CD163+ и CD20+ клеток с клинико-морфологическими характеристиками РЖ

На следующем этапе работы сопоставили содержание PU.1+, CD20+ и CD163+ клеток в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания (табл. 2).

Проведенный анализ показал, что содержание PU.1 значительно ассоциировано с размером опухоли, и именно опухоли большего размера содержат меньше PU.1+ инфильтрирующих клеток. Также следует отметить различия в содержании PU.1+ и CD163+ клеток в зависимости от локализации опухоли. Так, наибольшее количество PU.1+ клеток

и наименьшее количество CD163+ клеток выявлено при тотальном поражении желудка, однако эти наблюдения не достигали статистической значимости.

Содержание PD-1 и PD-L1 в образцах опухоли больных РЖ

Помимо анализа экспрессии стромальных маркеров, оценили тканевое содержание PD-L1 в образцах РЖ. Примеры иммуногистохимического окрашивания на PD-L1 представлены на рис. 2.

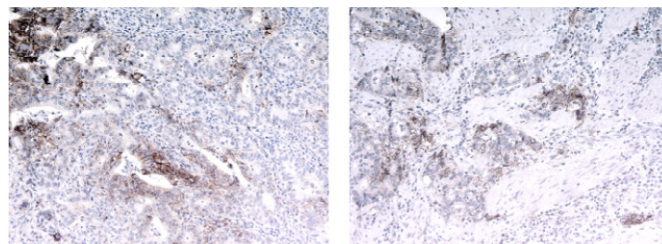


Рис. 2. Экспрессия PD-L1 в образцах РЖ (×100)

Таблица 3. Ассоциация содержания PD-L1 в опухолевых клетках и в строме опухоли с клинико-морфологическими характеристиками заболевания

Характеристика	PD-L1, опухоль (n)			PD-L1, строма (n)		
	+	-	p	+	-	p
Возраст						
≤61	8	24	0.117	18	14	0.609
>61	14	17		20	11	
Пол						
Мужской	12	23	>0.999	18	17	0.127
Женский	10	18		20	8	
Гистология						
Аденокарцинома	19	33	0.704	32	20	0.567
Перстневидноклеточный рак	3	7		5	5	
Недифференцированный рак	0	1		1	0	
Стадия						
I-II	8	17	0.790	16	9	0.793
III-IV	14	24		22	15	
Локализация						
Дистальный отдел	3	11	0.396	8	6	0.987
КЭР	0	3		2	1	
Проксимальный отдел	7	9		10	6	
Тело желудка	11	15		16	10	
Тотальное поражение	1	3		2	2	
Размер опухоли (T)						
T1-T2	3	10	0.515	11	2	0.058
T3-T4	19	31		27	23	
Наличие регионарных метастазов (N)						
N0	7	17	0.588	13	11	0.597
N+	15	24		25	14	
Наличие отдаленных метастазов (M)						
M0	21	33	0.144	36	18	0.023*
M+	1	8		2	7	
Дифференцировка (G)						
G1-G2	7	12	>0.999	14	5	0.239
G3	12	21		18	15	

*Статистически значимо.

Экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках отмечена в 35% (22 из 63) образцов. Экспрессию PD-L1 в стромальных клетках выявили в 60% (38 из 63) образцов. Далее проанализировали ассоциацию между содержанием PD-L1 и клинико-морфологическими характеристиками заболевания (табл. 3).

Проведенное исследование показало, что содержание PD-L1 в опухолевых клетках не ассоциировано с клиническими и морфологическими характеристиками РЖ. Экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухоли ассоциирована с отдаленными метастазами, именно при их наличии реже наблюдали экспрессию PD-L1 в строме первичной опухоли.

Растворимые формы PD-1 и PD-L1

Дополнительно проведен анализ содержания растворимых форм (sPD-1, sPD-L1) контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1 в плазме крови больных РЖ для выявления корреляций между их содержа-

нием в плазме крови, тканевой экспрессией и прогностической значимостью.

На первом этапе работы мы оценили диагностический потенциал исследованных белков. Медиана содержания sPD-1 и sPD-L1 в плазме крови здоровых доноров составила 29.25 (14.9–45.5) и 36.23 (9.83–73.1) пг/мл соответственно, в группе больных РЖ – 12.57 (7.7–19.7) и 21.83 (10.1–74.3) пг/мл. Проведение статистического анализа показало, что содержание растворимой формы рецептора sPD-1 у больных РЖ значимо ниже, чем у здоровых доноров. Уровни sPD-L1 в группах здоровых доноров и больных РЖ не различались.

Корреляционный анализ растворимых и тканевых форм исследованных белков

Корреляцию уровней исследуемых белков анализировали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Результаты представлены на рис. 3.

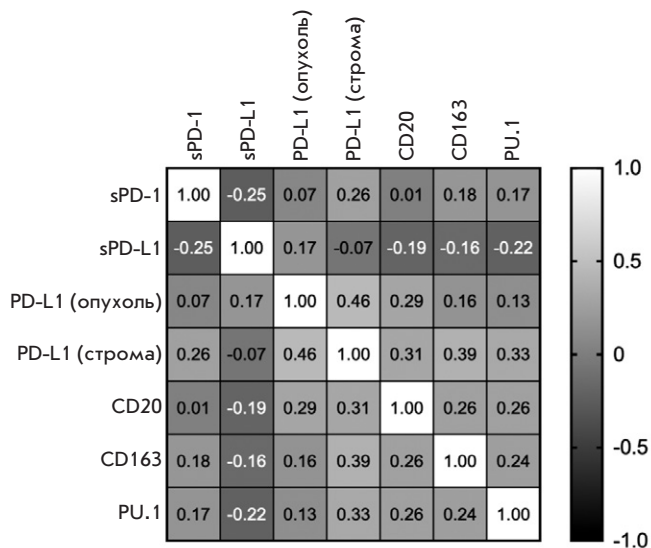


Рис. 3. Корреляционный анализ тканевых и сывороточных уровней PD-1, PD-L1, PU.1, CD163 и CD20 у больных раком желудка

Показано, что содержание в плазме крови растворимой формы рецептора sPD-1 обратно коррелирует с содержанием в плазме крови sPD-L1 и прямо коррелирует с тканевой экспрессией PD-L1 в стромальных клетках ($r = -0.251$; $p = 0.047$ и $r = 0.255$; $p = 0.044$ соответственно). Также экспрессия PD-L1 в стромальных клетках опухолей желудка прямо коррелировала с экспрессией PD-L1 в опухолевых клетках и содержанием всех исследованных стромальных маркеров. Аналогичную картину наблюдали и для В-клеток. А именно, содержание CD20+ В-клеток в строме опухолей положительно статистически значимо коррелирует как с содержанием макрофагов, так и с экспрессией PD-L1 и в строме, и в опухолевых клетках.

Прогностическая значимость PD-L1/PD-1 у больных РЖ

Нами проведен анализ прогностической значимости исследованных маркеров и их комбинаций у больных РЖ. Для анализа показателей выживаемости пациентов распределили на две группы: с высоким и низким содержанием растворимых форм-маркеров относительно медианы. В случае тканевой экспрессии PD-L1 пациентов распределяли на две группы по наличию/отсутствию этого белка отдельно в опухолевых и стромальных клетках. Дополнительно проанализировали выживаемость в зависимости от комплексного содержания как растворимой sPD-L1, так и тканевой формы PD-L1. Графики выживаемости больных представлены на рис. 4.

В данном исследовании не была установлена связь между уровнем sPD-1 и sPD-L1 при РЖ и прогнозом выживаемости. Аналогичную картину наблюдали в случае тканевой формы PD-L1, однако следует отметить тенденцию к прогностической значимости PD-L1, а именно, высокий уровень этого белка в опухолевых клетках РЖ является более благоприятным прогностическим фактором, в отличие от низкой экспрессии маркера ($p = 0.122$). Проведение комплексного анализа показало, что высокое содержание одновременно тканевой и растворимой форм PD-L1 также не является прогностическим маркером выживаемости при РЖ.

Далее проанализировали прогностическую значимость PU.1, CD20 и CD163 при РЖ. Результаты представлены на рис. 5.

Как следует из представленных на рис. 5 данных, стромальные маркеры (PU.1, CD163, CD20) не имеют прогностической значимости при РЖ.

Результаты многофакторного статистического анализа прогностической значимости всех исследованных маркеров представлены в табл. 4.

С использованием регрессионного анализа Кокса показано, что высокое содержание CD163 при РЖ можно рассматривать как независимый прогностический фактор, ассоциированный со снижением показателей общей выживаемости.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клиническая и прогностическая значимость микроокружения опухолей желудка активно изучается в настоящее время. Нами проведен анализ содержания PU.1+, CD163+ и CD20+ в строме опухолей желудка и оценена их клиническая и прогностическая значимость. В контексте солидных опухолей изучена клиническая значимость экспрессии PU.1 у больных раком молочной железы и глиомами [11, 12], причем показана ассоциация его экспрессии с прогрессией и неблагоприятным прогнозом при обеих нозологиях. Экспрессия PU.1 изучена также при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) [13], раке толстой кишки [14] и пищевода [10]. Изучению экспрессии PU.1 при РЖ посвящено одно исследование, в котором показано, что экспрессия PU.1 значительно повышена в опухолевой ткани желудка по сравнению с относительной нормой и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом и прогрессированием заболевания. Более того, высокая экспрессия PU.1 положительно коррелирует с количеством активированных CD4 Т-клеток памяти, покоящихся НК-клеток, макрофагов M2, покоящихся дендритных клеток и нейтрофилов в строме опухоли [15]. Проведенное нами исследование не выявило прогностической значимости этого белка, однако мы на-

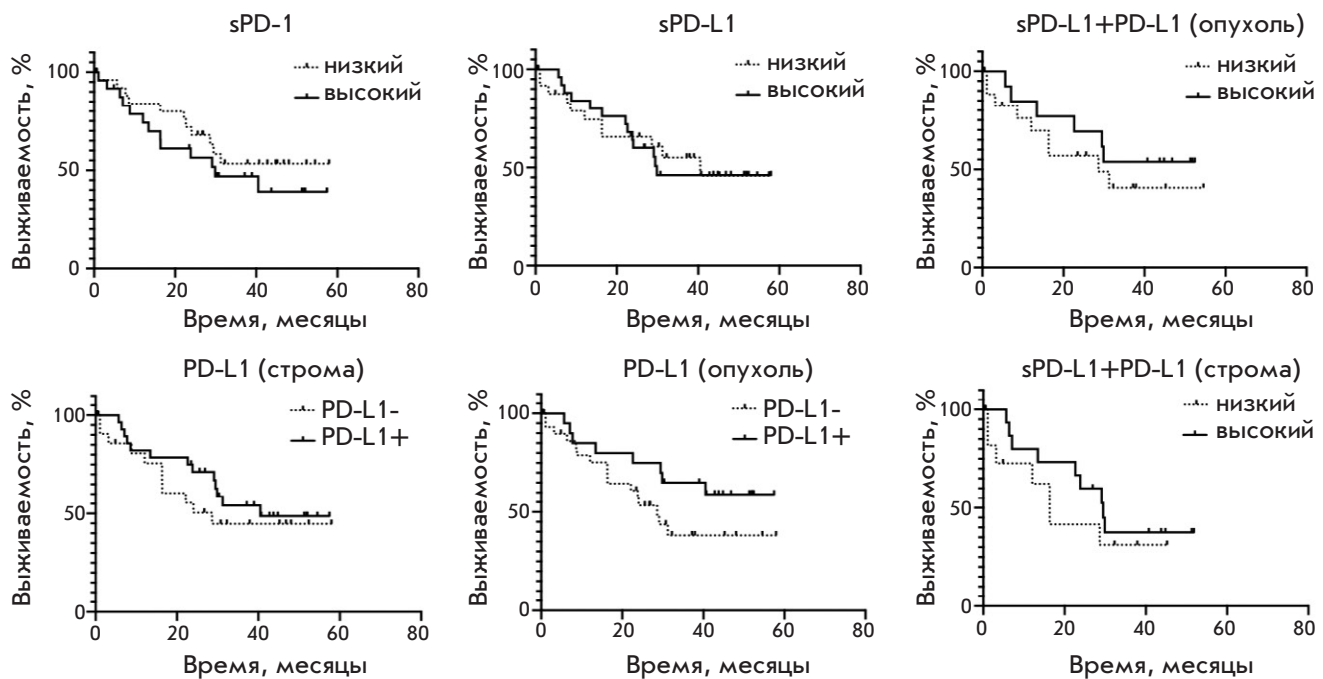


Рис. 4. Анализ общей выживаемости больных РЖ в зависимости от содержания растворимых (sPD-L1, sPD-1) и тканевых (PD-L1, PD-1) форм основных компонентов контрольной точки иммунитета PD-1/PD-L1

Таблица 4. Статистический анализ прогностической значимости sPD-1, sPD-L1, PD-L1, CD20, CD163 и PU.1 при раке желудка

Показатель	Однофакторный анализ			Многофакторный анализ		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
sPD-1 (высокий/низкий)	1.443	(0.646–3.226)	0.366	0.971	(0.915–1.013)	0.234
sPD-L1 (высокий/низкий)	1.038	(0.466–2.315)	0.927	0.999	(0.988–1.008)	0.780
PD-L1 (опухоль) (высокий/низкий)	0.524	(0.235–1.167)	0.122	0.480	(0.150–1.406)	0.193
PD-L1 (строма) (высокий/низкий)	0.721	(0.316–1.644)	0.419	0.954	(0.332–2.564)	0.927
CD20 (высокий/низкий)	0.876	(0.393–1.953)	0.745	0.992	(0.965–1.016)	0.526
CD163 (высокий/низкий)	1.509	(0.677–3.361)	0.316	1.053	(1.007–1.098)	0.019*
PU.1 (высокий/низкий)	0.654	(0.292–1.466)	0.319	0.991	(0.963–1.018)	0.497

* Статистически значимо.

блюдали положительную корреляцию между содержанием PU.1+ клеток, макрофагов и В-клеток, а также PD-L1+ клеток в опухолевой строме, что согласуется с опубликованными данными.

Оценке содержания CD163+ макрофагов в опухолях желудка посвящено большое количество исследований, однако их результаты достаточно противоречивы. Экспрессия CD163 часто ассоциируется с неблагоприятным прогнозом при различных солидных опухолях [16]. Однако CD163 может быть маркером хорошего прогноза при опухолях желудочно-кишечного тракта, в частности при раке пищевода [17] и раке толстой кишки [18]. Согласно данным однофакторного анализа, повышенная

плотность CD163+ макрофагов в строме опухоли при РЖ ассоциирована с активацией иммунного ответа и улучшением выживаемости пациентов [19]. Опубликованы и противоположные результаты. По данным исследования 148 образцов опухолевой ткани высокая инфильтрация CD68+/CD163+ может быть маркером неблагоприятного прогноза [20]. Показано также, что повышенное содержание CD163+ клеток ассоциировано с большим размером и низкой дифференцировкой опухоли, метастазами в регионарных лимфоузлах. Более того, плотность CD163 повышалась с увеличением глубины инвазии, стадии заболевания и повышением экспрессии маркеров опухолевых стволовых клеток. Установлено

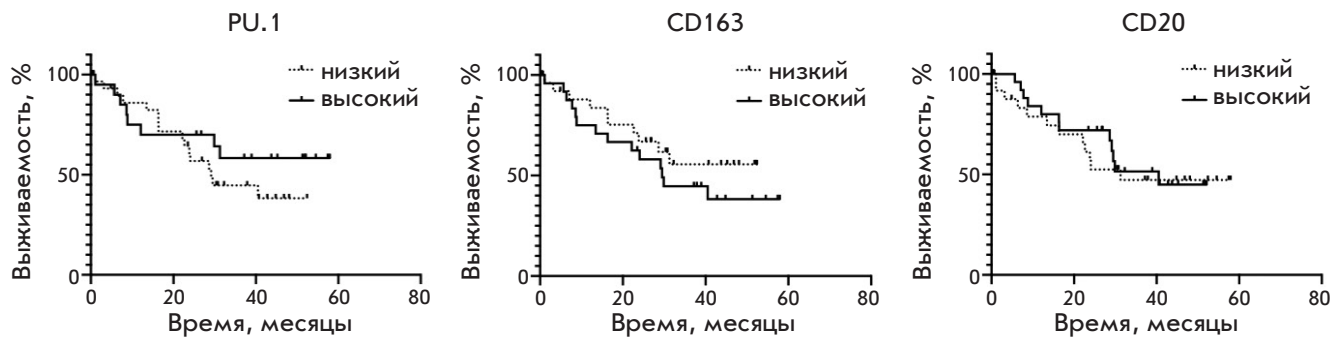


Рис. 5. Анализ общей выживаемости больных РЖ в зависимости от содержания PU.1, CD163 и CD20 в строме опухолей

также, что повышенная экспрессия CD163 ассоциирована с рецидивированием заболевания [21, 22]. Полученные нами данные согласуются с результатами, согласно которым именно высокое содержание CD163+ клеток в опухолях является независимым маркером неблагоприятного прогноза при РЖ. Опубликованы также данные, согласно которым повышенная экспрессия CD163 характерна для PD-L1-положительного РЖ в сравнении с PD-L1-отрицательным [23]. Нами показано, что содержание CD163+ клеток в опухолевой строме положительно коррелирует с экспрессией PD-L1 в стромальных, но не в опухолевых клетках при РЖ.

На следующем этапе мы проанализировали содержание CD20+ клеток в строме опухолей больных РЖ. На неоднозначность влияния CD20+ В-лимфоцитов, присутствующих в опухолях разного типа, на прогноз выживаемости и стадию опухоли указывают результаты разных исследований [24]. Так, например, общее число CD20+ В-лимфоцитов ассоциировано с прогрессией рака молочной железы [25], при этом обратная корреляция показана при раке яичников, печени и толстой кишки [26–28]. Показано, что повышенное содержание CD20+ В-лимфоцитов в строме РЖ ассоциировано с лучшим прогнозом, однако не выявлено ассоциации между количеством В-лимфоцитов и клинкоморфологическими характеристиками опухоли [29]. Схожие результаты продемонстрировали и другие исследователи, показавшие, что более высокая плотность CD20+ В-клеток в строме ассоциирована с лучшим прогнозом. По результатам данного исследования показано также, что экспрессия CD20 ассоциирована с CD68 в опухолевой строме. Интересно, что некоторые иммунные клетки стромы экспрессировали Ki-67, причем в основном это были CD20+ клетки. Более того, использование комбинации Ki-67+ и CD20+ показало лучший прогностический потенциал для РЖ [30]. Установленное нами отсутствие прогностической значимости CD20 при РЖ

свидетельствует о необходимости использования комбинаций маркеров для повышения эффективности прогнозирования клинического течения заболевания.

Прогностической значимости тканевой экспрессии PD-L1 в настоящее время посвящено около двух десятков исследований. Большинство работ свидетельствует о неблагоприятной прогностической значимости экспрессии данного белка в опухолевых клетках РЖ [31]. Однако некоторые результаты указывают на высокую экспрессию PD-L1 в опухолевых клетках как на маркер хорошего прогноза [32, 33]. Проведенное нами исследование продемонстрировало, что экспрессия PD-L1 в опухолевых клетках ассоциирована с более высокой общей выживаемостью пациентов, в то время как анализ экспрессии PD-L1 в стромальных клетках или его растворимой формы такой закономерности не выявил.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что маркеры стромальных клеток при злокачественных опухолях желудка потенциально могут использоваться для определения стратегии лечения и прогноза заболевания. Однако существующие методы, а именно одноцветная иммуногистохимия, не позволяют получить достаточно информативный ответ. Для того, чтобы эффективно использовать стромальные маркеры в случае РЖ, необходимо проведение комплексного анализа, включающего определение нескольких сывороточных маркеров и мультиплексный анализ нескольких маркеров опухолевой стромы. ●

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 20-015-00479).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R.L., Torre L.A., Jemal A. // *CA Cancer J. Clin.* 2018. V. 68. № 6. P. 394–424.
2. Gonzalez C.A., Sala N., Rokkas T. // *Helicobacter.* 2013. V. 18 Suppl 1. P. 34–38.
3. Nomura A., Grove J.S., Stemmermann G.N., Severson R.K. // *Cancer Res.* 1990. V. 50. № 21. P. 7084.
4. Brooks-Wilson A.R., Kaurah P., Suriano G., Leach S., Senz J., Grehan N., Butterfield Y.S., Jeyes J., Schinas J., Bacani J., et al. // *J. Med. Genet.* 2004. V. 41. № 7. P. 508–517.
5. Cunningham D., Starling N., Rao S., Iveson T., Nicolson M., Coxon F., Middleton G., Daniel F., Oates J., Norman A.R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 1. P. 36–46.
6. Bang Y.J., van Cutsem E., Feyereislova A., Chung H.C., Shen L., Sawaki A., Lordick F., Ohtsu A., Omuro Y., Satoh T., et al. // *Lancet.* 2010. V. 376. № 9742. P. 687–697.
7. Wilke H., Muro K., van Cutsem E., Oh S.C., Bodoky G., Shimada Y., Hironaka S., Sugimoto N., Lipatov O., Kim T.Y., et al. // *Lancet Oncol.* 2014. V. 15. № 11. P. 1224–1235.
8. Zhang H., Yue R., Zhao P., Yu X., Li J., Ma G., Tang J., Zhang L., Feng L., Sun L., et al. // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. № 6. P. 1010428317705747. doi: 10.1177/1010428317705747
9. Hu H.T., Ai X., Lu M., Song Z., Li H. // *Exp. Cell. Res.* 2019. V. 384. № 2. P. 111652.
10. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V., Podlesnaya P.A., Mochalnikova V.V., Gratchev A. // *Anal. Cell. Pathol. (Amst.)*. 2020. V. 2020. P. 5424780.
11. Xu Y., Gu S., Bi Y., Qi X., Yan Y., Lou M. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 15. № 3. P. 3753–3759.
12. Lin J., Liu W., Luan T., Yuan L., Jiang W., Cai H., Yuan W., Wang Y., Zhang Q., Wang L. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 14. № 6. P. 8220–8226.
13. Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V., Podlesnaya P.A., Mochalnikova V.V., Gratchev A.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021. V. 170. № 4. P. 489–492.
14. Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А., Рашидова М.А., Самойлова Д.В., Соколов Н.Ю., Мамедли З.З., Кудлай Д.А., Кушлинский Н.Е. // *Клин. эксп. морфол.* 2021. Т. 10. № 2. С. 32–39.
15. Huang J., Chen W., Jie Z., Jiang M. // *Front. Oncol.* 2022. V. 12. P. 820568.
16. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. // *Trends Immunol.* 2002. V. 23. № 11. P. 549–555.
17. Kovaleva O., Podlesnaya P., Rashidova M., Samoiloa D., Petrenko A., Mochalnikova V., Kataev V., Khlopko Y., Plotnikov A., Gratchev A. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 7. P. 743.
18. Koelzer V.H., Canonica K., Dawson H., Sokol L., Karamitopoulou-Diamantis E., Lugli A., Zlobec I. // *Oncoimmunology.* 2016. V. 5. № 4. P. e1106677.
19. Huang Y.K., Wang M., Sun Y., Di Costanzo N., Mitchell C., Achuthan A., Hamilton J.A., Busuttill R.A., Boussioutas A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3928.
20. Svensson M.C., Svensson M., Nodin B., Borg D., Hedner C., Hjalmarsson C., Leandersson K., Jirstrom K. // *J. Innate Immun.* 2022. № 3. P. 1–14.
21. Zhu Q., Wu X., Tang M., Wu L. // *Medicine (Baltimore).* 2020. V. 99. № 17. P. e19839.
22. Zhang W.J., Zhou Z.H., Guo M., Yang L.Q., Xu Y.Y., Pang T.H., Gao S.T., Xu X.Y., Sun Q., Feng M., et al. // *J. Cancer.* 2017. V. 8. № 3. P. 363–370.
23. Harada K., Dong X., Estrella J.S., Correa A.M., Xu Y., Hofstetter W.L., Sudo K., Onodera H., Suzuki K., Suzuki A., et al. // *Gastric Cancer.* 2018. V. 21. № 1. P. 31–40.
24. Sjoberg E., Frodin M., Lovrot J., Mezheyeuski A., Johansson M., Harmenberg U., Egevad L., Sandstrom P., Ostman A. // *Br. J. Cancer.* 2018. V. 119. № 7. P. 840–846.
25. Mahmoud S.M., Lee A.H., Paish E.C., Macmillan R.D., Ellis I.O., Green A.R. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. V. 132. № 2. P. 545–553.
26. Shi J.Y., Gao Q., Wang Z.C., Zhou J., Wang X.Y., Min Z.H., Shi Y.H., Shi G.M., Ding Z.B., Ke A.W., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2013. V. 19. № 21. P. 5994–6005.
27. Lundgren S., Berntsson J., Nodin B., Micke P., Jirstrom K. // *J. Ovarian Res.* 2016. V. 9. P. 21.
28. Berntsson J., Nodin B., Eberhard J., Micke P., Jirstrom K. // *Int. J. Cancer.* 2016. V. 139. № 5. P. 1129–1139.
29. Dong J., Li J., Liu S.M., Feng X.Y., Chen S., Chen Y.B., Zhang X.S. // *Med. Oncol.* 2013. V. 30. № 1. P. 442.
30. Meier A., Nekolla K., Hewitt L.C., Earle S., Yoshikawa T., Oshima T., Miyagi Y., Huss R., Schmidt G., Grabsch H.I. // *J. Pathol. Clin. Res.* 2020. V. 6. № 4. P. 273–282.
31. Gu L., Chen M., Guo D., Zhu H., Zhang W., Pan J., Zhong X., Li X., Qian H., Wang X. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 8. P. e0182692.
32. Kim J.W., Nam K.H., Ahn S.H., Park D.J., Kim H.H., Kim S.H., Chang H., Lee J.O., Kim Y.J., Lee H.S., et al. // *Gastric Cancer.* 2016. V. 19. № 1. P. 42–52.
33. Boger C., Behrens H.M., Mathiak M., Kruger S., Kalthoff H., Rocken C. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 17. P. 24269–24283.

УДК 571.27

Смещение репертуара генов зародышевой линии В-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе

Я. А. Ломакин¹, Л. А. Овчинникова¹, М. Н. Захарова², М. В. Иванова², Т. О. Симанив², М. Р. Кабилов³, Н. А. Быкова⁴, В. С. Мухина^{4,5}, А. Н. Каминская¹, А. Е. Тупикин³, М. Ю. Захарова¹, А. В. Фаворов⁴, С. Н. Иллариошкин², А. А. Белогуров^{1,6}, А. Г. Габибов^{1,7}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Научный центр неврологии, 6 неврологическое отделение, Москва, 125367 Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 119991 Россия

⁵Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, Москва, 127051 Россия

⁶Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва, 127473 Россия

⁷Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

E-mail: lomakin@ibch.ru

Поступила в редакцию 02.09.2022

Принята к печати 20.10.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11794

РЕФЕРАТ Регуляторные функции В-лимфоцитов играют важную роль в развитии и подавлении иммунного ответа. Нарушение противовоспалительной функции В-клеток (Breg) может привести к развитию иммунопатологических процессов, в частности, аутоиммунных заболеваний. К сожалению, точный механизм функционирования и развития регуляторных В-клеток пока не известен, почти ничего не известно об их специфичности и структуре В-клеточного рецептора. С использованием широко-масштабного секвенирования мы проанализировали репертуар В-клеточных рецепторов субпопуляции транзиторных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с рассеянным склерозом (РС). Впервые показано, что частота встречаемости ряда генов зародышевой линии транзиторных Breg при развитии РС отличается от распределения генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Зарегистрированный сдвиг более выражен у пациентов с высокоактивным РС, чем у пациентов с доброкачественным течением РС. Полученные нами данные позволяют предположить, что изменение репертуара Breg при развитии РС происходит уже на раннем этапе созревания В-клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА рассеянный склероз, нейродегенерация, иммуноглобулины, транзиторные В-клетки, широкомасштабное секвенирование, регуляторные В-клетки, VCR-Seq, зародышевая линия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; ВАРС – высокоактивный рассеянный склероз; ДРС – доброкачественный рассеянный склероз; Breg – регуляторная В-клетка.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) является наиболее распространенным хроническим аутоиммунным заболеванием центральной нервной системы (ЦНС), диагностированным более чем у 2.3 миллиона человек по всему миру [1]. Механизм запуска этой тяжелой патологии, в частности механизм иммуноопосредованной нейродегенерации, до сих пор не установлен, что существенно затрудняет поиск

стратегии лечения РС [2–4]. Ранее мы показали, что в репертуар антител больных РС входят антигена, кросс-реактивные к белкам вируса Эпштейна–Барр, и определили их структурно-функциональные особенности [5, 6]. С момента открытия РС основная роль в патогенезе этого заболевания отводилась исключительно Т-клеточному звену иммунитета. Однако за последнее десятилетие накоплено множество доказательств, подтверждающих непосред-

ственное участие В-клеток в развитии аутоиммунных процессов, в том числе и при РС [7]. Несмотря на длительность изучения РС, его точная этиология все еще неизвестна. В основе механизмов вирусной индукции заболевания могут лежать молекулярная мимикрия и перекрестная реактивность с последующим увеличением числа узнаваемых эпитопов (epitope spreading) между Т- и В-клетками [5, 8–13]. У пациентов с РС повышен титр аутореактивных антител, специфически связывающих компоненты миелиновой оболочки, у них обнаружены также каталитические иммуноглобулины, гидролизующие основной белок миелина – один из характерных аутоантигенов при РС [14–16].

В последние годы регуляторные В-клетки (Breg) привлекают все большее внимание исследователей [17, 18]. Фундаментальный интерес к этому компоненту гуморального иммунитета обусловлен стремлением понять, как именно В-клетки участвуют в подавлении воспалительного ответа, на какой стадии созревания В-клетка приобретает регуляторные функции и как на это влияет специфичность В-клеточного рецептора. С практической точки зрения Breg привлекают внимание как клетки, непосредственно участвующие в развитии аутоиммунных и лимфопролиферативных патологий. Однако на сегодняшний день невозможно прийти к однозначному выводу, какие процессы происходят при возникновении аутоиммунного воспаления: изменение количества В-регуляторных клеток, нарушение их функций или сочетание двух этих явлений. Также имеется ограниченная информация о специфичности Breg, хотя и показано, что для их правильного функционирования необходим В-клеточный рецептор [19]. Неясно, сопутствуют ли развитию аутоиммунного ответа нарушения в созревании генов иммуноглобулинов Breg, являются ли эти клетки аутореактивными? Неизвестно, на какой стадии развития происходят наиболее значимые изменения в пуле Breg: у наивных, транзиторных или зрелых В-клеток. Ранее мы обнаружили повышенное содержание транзиторных Breg в периферической крови пациентов с РС [20]. При этом тяжелая цепь иммуноглобулинов транзиторных Breg при развитии РС содержит меньшее количество гипермутаций, чем у здоровых доноров.

В представленной работе мы решили прояснить, отличаются ли структуры В-клеточных рецепторов в одной из наиболее полно описанных субпопуляций транзиторных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Анализ широкомасштабного секвенирования иммуноглобулиновых последовательностей отобранных В-клеток (BCR-Seq) показал, что распределение целого ряда

генов зародышевой линии у больных РС отличается от распределения у здорового человека. Причем анализ общего пула В-клеток периферической крови и субпопуляции регуляторных транзиторных В-клеток у обследованных нами пациентов выявляет как превышение, так и уменьшение встречаемости различных генов зародышевой линии по сравнению со здоровыми донорами. Важно отметить, что это различие более выражено у пациентов со злокачественным типом течения РС – высокоактивным РС (ВАРС) [21] в сравнении с пациентами с доброкачественным течением РС (ДРС) [22].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты с РС и здоровые доноры

Произведен забор периферической крови у девяти пациентов 6 неврологического отделения Научного центра неврологии (Москва, Россия) с РС в возрасте 23–61 года (40.0 ± 9.1) и шести здоровых доноров (табл. 1). Тяжесть заболевания, оцененная по шкале EDSS, варьировала от 1.5 до 8.5 балла. Значения EDSS от 0 до 10 вычисляли по шкале Куртцке EDSS (англ. Expanded Disability Status Scale – расширенная шкала оценки степени инвалидизации) [23]. В исследование вошли пять пациентов с высокоактивным РС (ВАРС) [21] и четыре пациента с доброкачественным течением РС (ДРС) [22]. Были собраны данные о течении болезни, продолжительности и истории лечения (табл. 1). Исследование одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии и проводилось в полном соответствии с Декларацией WMA Хельсинки, ICH GCP и местным законодательством. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие после обсуждения протокола исследования.

Выделение В-клеток из периферической крови

Мононуклеарные клетки периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров получены путем седиментационного обогащения в градиенте фикола. Остаточную эритроцитарную фракцию удаляли с помощью лизирующего буфера АСК. Полученные мононуклеарные клетки фильтровали через 40-мм нейлоновый фильтр и окрашивали флуоресцентными антителами: α -CD19-PE-Cy7, α -CD24-PE, α -CD38-APC, α -CD45-APC-Cy7 (Bio-legend, США), и красителем мертвых клеток sytox green dead cell stain (ThermoFisher Scientific, США) в течение 60 мин при +4°C в темноте. Популяции регуляторных транзиторных В-клеток (CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}) и общего пула В-клеток (CD19⁺) отбирали непосредственно в микроцентрифужные пробирки с лизиру-

Таблица 1. Пациенты с РС и здоровые доноры, участвующие в исследовании

	Форма РС ¹	Возраст, лет	Пол	EDSS ²	Терапия ³	Длительность заболевания, лет
PC1	ДРС	56	Жен.	2.5	Без лечения	11
PC2	ДРС	61	Жен.	3	Без лечения	26
PC3	ДРС	43	Жен.	1.5	Без лечения	12
PC4	ДРС	36	Муж.	2.5	Без лечения	14
PC5	ВАРС	33	Муж.	6	IFNβ1b (2006–2011; 2014–2017).	12
PC6	ВАРС	23	Муж.	5	Без лечения	3
PC7	ВАРС	37	Жен.	5	IFNβ1b (2014–2016). ГА (2016–2017).	5
PC8	ВАРС	29	Жен.	8	ГА (2012–2014). IVIG (2014). IFNβ1b (2015–2016).	12
PC9	ВАРС	39	Жен.	8.5	Без лечения	8
K1	Здоровый	24	Жен.	-	-	-
K2	Здоровый	40	Жен.	-	-	-
K3	Здоровый	36	Муж.	-	-	-
K4	Здоровый	27	Жен.	-	-	-
K5	Здоровый	42	Жен.	-	-	-
K6	Здоровый	25	Жен.	-	-	-

¹ РС – пациент с доброкачественным РС; ВАРС – пациент с высокоактивным РС.

² EDSS – расширенная шкала оценки степени инвалидизации (expanded disability status scale).

³ IFNβ1b – интерферон-β-1b; ГА – глатирамера ацетат; IVIG – внутривенный иммуноглобулин.

ющим буфером Qiazol (Qiagen, Германия). Сортинг клеток проводили с помощью проточного флуориметра BD FACSAria III.

Подготовка библиотек для секвенирования переменных фрагментов генов иммуноглобулинов (RT-PCR)

РНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Обратную транскрипцию (RT) проводили с набором MMLV RT с oligo(dT) и случайными праймерами в соответствии с инструкциями производителя («Евроген», Россия). Для амплификации переменных фрагментов генов иммуноглобулинов человека VH и VL использовали 15 прямых праймеров для VH и четыре обратных праймера для J-фрагмента генов тяжелой цепи человека, 13 прямых праймеров Vκ, два обратных праймера Jκ для легкой капша-цепи, 16 прямых праймеров Vλ и три обратных праймера Jλ для легкой лямбда-цепи [24]. 15 прямых праймеров VH использовали по отдельности в каждом образце в 50 мкл реакционной смеси с эквимольной смесью четырех обратных праймеров JH. 13 праймеров Vκ и 16 праймеров Vλ использовали по отдельности для амплификации генов VL с соответствующей смесью двух обратных праймеров Vκ или трех обратных праймеров Vλ в 50 мкл реакционной смеси для каждого образца. В качестве матрицы в каждой

реакции ПЦР использовали 0.02 мкг кДНК и набор Hot Start Taq Master Mix («Евроген»). Условия ПЦР были следующими: 1 шаг (94°C – 3 мин); 1 цикл (94°C – 25 с, 62°C – 25 с, 72°C – 25 с); 2 цикла (94°C – 25 с, 60°C – 25 с, 72°C – 25 с); 2 цикла (94°C – 25 с, 58°C – 25 с, 72°C – 25 с); 3 цикла (94°C – 25 с, 56°C – 25 с, 72°C – 25 с); 3 цикла (94°C – 25 с, 54°C – 25 с, 72°C – 25 с); 30 циклов (94°C – 25 с, 52°C – 25 с, 72°C – 25 с); и финальная элонгация (72°C – 4 мин). Смеси ПЦР 15 образцов для генов VH, 13 образцов для генов Vκ и 16 образцов для генов Vλ были объединены по отдельности для генов VH, Vκ и Vλ и сконцентрированы до 50–80 мкл с использованием Amicon 30 кДа (Merck, Millipore). Продукты ПЦР (около 400 п.н.) VH, Vκ и Vλ наносили на 1.5% агарозные гели и очищали с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля (Monarch, NEB).

Глубокое секвенирование переменных фрагментов генов VH, Vκ и Vλ иммуноглобулинов

Очищенный ПЦР-продукт (1 мкг) VH, Vκ и Vλ лигировали с адаптерами NEBNext Multiplex Oligos с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК NEBNext Ultra для Illumina (NEB). Библиотеки секвенировали на Miseq с использованием набора для секвенирования 2×300 п.н. (Illumina) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБиФМ СО РАН, Новосибирск, Россия).

Анализ данных высокопроизводительного секвенирования

Данные высокопроизводительного секвенирования анализировали с использованием программы MiXCR [25] в два этапа. Сначала исходные данные обрабатывали с помощью алгоритма MiXCR по умолчанию (выравнивание, сборка, экспорт) с использованием библиотеки IMG-T в качестве референса на гены зародышевых линий. Полученные прочтения, успешно выровненные с генами зародышевой линии и содержащие полную целевую последовательность гена иммуноглобулина (CDR1 + FR2 + CDR2 + FR3 + CDR3), подвергали повторной выборке для нормирования различных количеств прочтений. При анализе частоты встречаемости генов зародышевой линии не учитывали мутации в переменных фрагментах VH, V κ и VL.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы Prism 6 с использованием теста Манна-Уитни и парного *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы появляется все больше свидетельств, доказывающих значимость В-клеток в регуляции аутоиммунных заболеваний, включая РС [26, 27]. Тем не менее, субпопуляции Breg у пациентов с РС все еще недостаточно охарактеризованы. На текущий момент опубликовано чрезвычайно мало данных о специфичности и последовательности их В-клеточных рецепторов. Чтобы глубже понять природу развития и охарактеризовать процесс созревания Breg, мы проанализировали субпопуляцию CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} – один из наиболее подтвержденных фенотипических портретов транзиторных Breg, находящихся на промежуточной стадии между незрелыми клетками костного мозга и полностью зрелыми наивными В-клетками периферической крови и вторичных лимфоидных тканей [28, 29]. Образцы периферической крови получены от 9 больных с РС и шести условно здоровых доноров (табл. 1). Мононуклеарные клетки окрашивали антителами к поверхностным маркерам CD19, CD24 и CD38. Общий пул CD19⁺ В-клеток и субпопуляцию транзиторных Breg CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} сортировали по отдельности для последующего выделения РНК и анализа последовательностей В-клеточных рецепторов. Для этого последовательности генов переменных фрагментов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей иммуноглобулинов каждого пациента были амплифицированы с кДНК, синтезированной на основе выделенной РНК, после чего проводили широкомасштабное секвенирование генов

вариабельных фрагментов VH, V κ и VL. Целевое секвенирование репертуара иммуноглобулинов общего пула В-клеток и субпопуляции транзиторных Breg было выполнено с покрытием не менее пяти функциональных прочтений на отобранную клетку. После всех этапов биоинформатической фильтрации было получено в среднем по 83100 функциональных последовательностей тяжелой цепи, 37591 – каппа-цепи и 34565 последовательностей лямбда-цепи общего пула CD19⁺ клеток и субпопуляции CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} транзиторных Breg каждого индивида. Последовательности доступны на репозитории ArrayExpress (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-10859>).

Частоту встречаемости генов зародышевой линии VH, V κ , VL мы анализировали с использованием праймеров, способных амплифицировать практически все возможные варианты функциональных фрагментов V_HDJ_H, V _{κ} J _{κ} и V_LJ_L. При сравнении распределения генов IgVH у пациентов с РС и условно здоровых доноров амплифицировались все семь функциональных семейств VH. Гены зародышевой линииIGHV3 наиболее часто встречались у пациентов с РС и здоровых доноров как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Breg. Последовательности иммуноглобулинов, относящихся к генам зародышевой линии IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV2-70, представленные в небольшом количестве практически у каждого здорового индивида, исчезают при развитии РС (рис. 1). Необходимо отметить, что при более тяжелой форме заболевания (ВАРС) смещение репертуара генов иммуноглобулинов по сравнению с условно здоровыми донорами более значительно, чем в случае сравнения ДРС и условно здоровых доноров. Гермлайн IGHV3-66 встречается у здоровых доноров и ДРС на сопоставимом уровне, но практически полностью исчезает у пациентов с ВАРС. Один из наиболее распространенных гермлайнов IGHV5-51 выявлен у всех анализируемых доноров, но в случае развития РС частота встречаемости этого гена зародышевой линии также значимо снижается. При этом единственный ген IGHV4-31, наоборот, при РС чаще встречается как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Breg. Это коррелирует с ранее опубликованными данными о повышенном содержании семейства IGHV4 в репертуаре В-клеток из периферической крови и цереброспинальной жидкости пациентов с РС [30, 31].

Репертуар генов, кодирующих легкие цепи иммуноглобулинов Breg, различается также у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Гермлайн IGKV1-12, встречающийся в норме примерно в 2% иммуноглобулиновых последовательностей, падает ниже

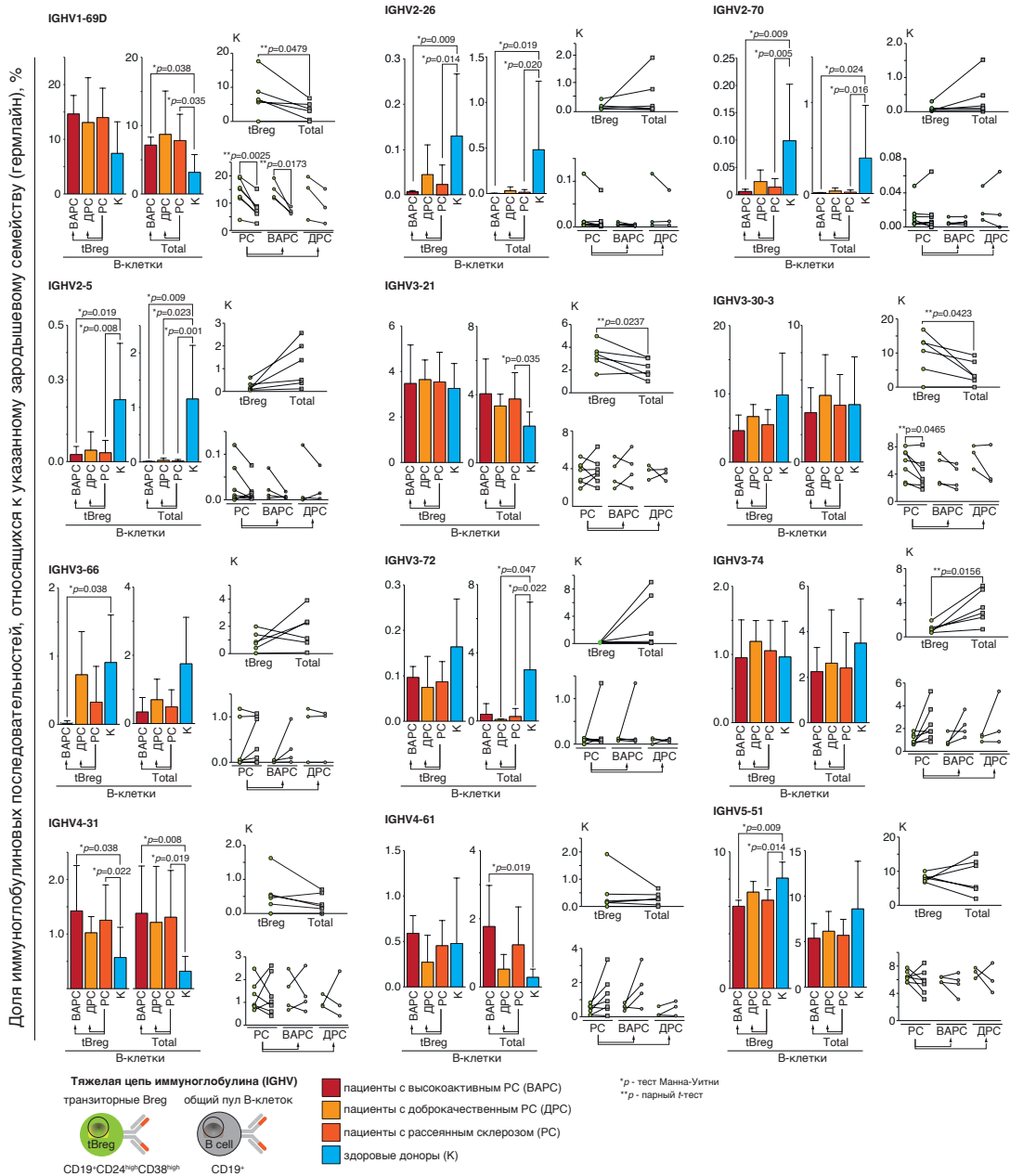


Рис. 1. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих вариабельные фрагменты тяжелой цепи (VH) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализировано 49 функциональных генов VH в группах пациентов с РС, с доброкачественным течением РС (ДРС) и с высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови (CD19⁺) и транзиторными Vreg (tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение (mean ± SD) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзиторных регуляторных В-клеток (tBreg – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзиторных Vreg (tBreg) – парный *t*-тест; изображены только статистически значимые значения *p*-value)

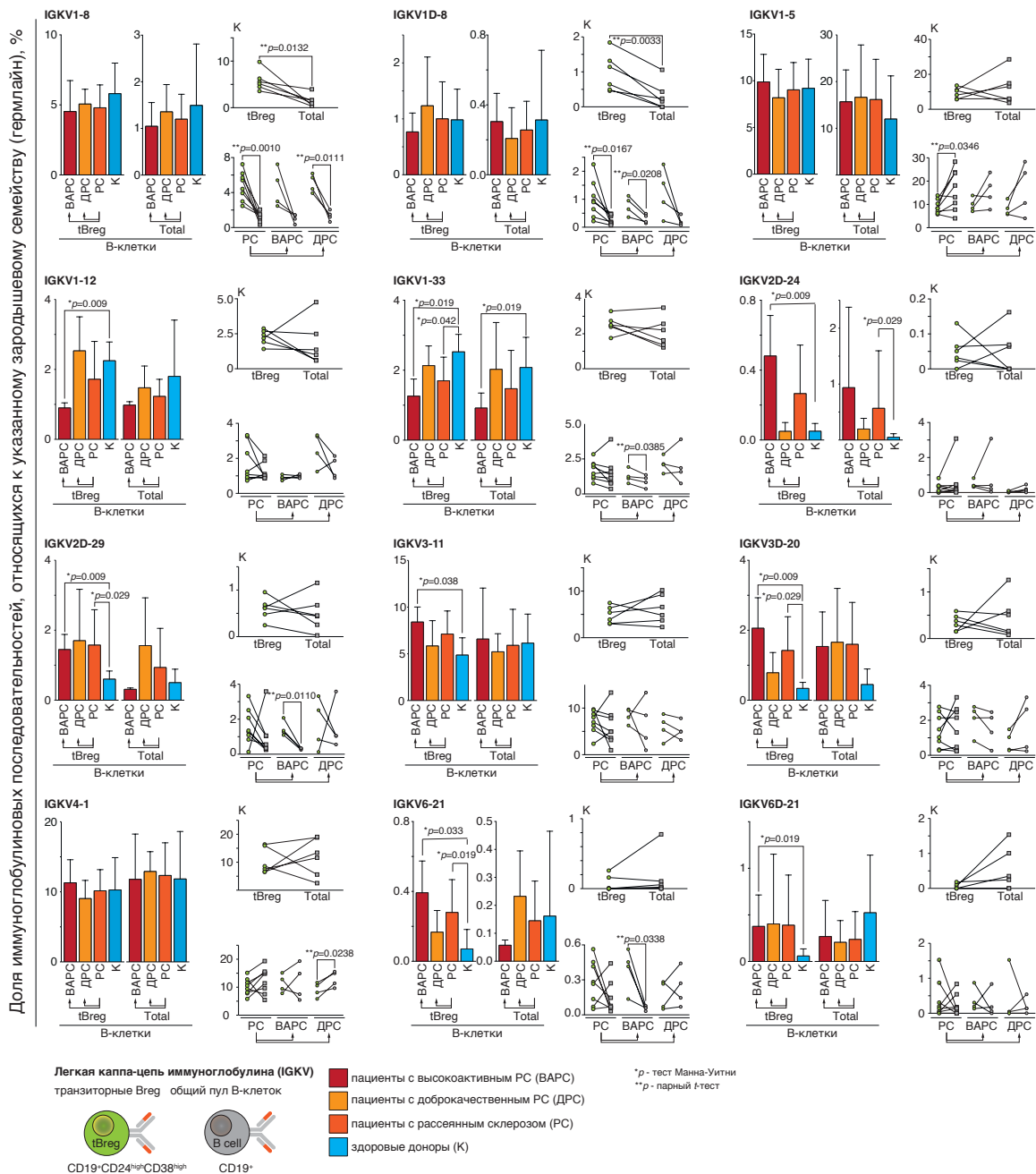


Рис. 2. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих переменные фрагменты легкой каппа-цепи (V_κ) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализирован 41 функциональный ген V_κ у пациентов с РС, пациентов с доброкачественным течением РС (ДРС) и высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови (CD19⁺) и транзиторными Vreg (tBreg) с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение (mean ± SD) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзиторных регуляторных В-клеток (tBreg – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзиторных Vreg (tBreg) – парный *t*-тест; изображены только статистически значимые значения *p*-value)

1% при ВАРС (рис. 2). При более легком течении заболевания (ДРС) частота этого гена не отличается от частоты у условно здоровых доноров. Ген зародышевой линии IGKV1-33 встречается реже уже не только у пациентов с ВАРС, но и в объединенной группе больных РС, включающей оба течения заболевания. Гены IGKV2D-24, IGKV3-11 и IGKV6D-21, наоборот, значительно чаще встречаются у пациентов с ВАРС, чем у условно здоровых доноров. Гены IGKV2D-29, IGKV3D-20 и IGKV6-21 встречаются чаще как у пациентов с ВАРС, так и в группе РС в целом. Следует заметить, что распределение генов зародышевой линии, кодирующих легкую каппа-цепь, в популяции транзиторных Breg не отличается статистически значимо у пациентов с ДРС и условно здоровых доноров.

При анализе изотипа лямбда легкой цепи аналогично наблюдаются различия в распределении генов зародышевой линии (рис. 3). Гермлайн IGLV1-36 практически не встречается у здоровых доноров и ДРС, но его частота резко возрастает до 0.5% у пациентов с ВАРС. Частота встречаемости генов зародышевой линии IGLV1-44 и IGLV3-21 повышена при любом типе течения РС, однако статистически значимые различия наблюдаются только между пациентами с ВАРС и условно здоровыми донорами. Распределение гермлайнов IGLV2-8, IGLV2-14 и IGLV2-23 не различается между пациентами с ДРС и условно здоровыми донорами, но их частота резко падает при развитии ВАРС. Интересно, что представленность гена зародышевой линии IGLV7-43, наоборот, находится примерно на одинаковом уровне у пациентов с ВАРС и условно здоровых доноров, но резко уменьшается у пациентов с ДРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Иммунологические исследования XXI века подтвердили ключевую роль В-регуляторного звена в поддержании иммунотолерантности, контроле и подавлении воспалительного ответа. На сегодняшний день все еще остается множество открытых вопросов о точном механизме регуляции, но очевидно, что нарушения в количестве Breg и их функционировании приводят к возникновению целого ряда иммунологических патологий, среди которых особенно выделяется РС. Детальное прояснение механизмов регуляции воспалительного ответа Breg позволит не только определить этиологию аутоиммунных патологий, но и может способствовать созданию терапии на основе Breg в ближайшем будущем. Иммуноглобулины, экспонированные как антиген-специфичные рецепторы на поверхности В-клеток, а также в виде секретлируемых

антител играют важную роль в иммунном ответе. Прогресс последних лет в области широкомасштабного секвенирования позволяет исследовать репертуары иммуноглобулинов с беспрецедентно высоким уровнем детализации [32]. Таким образом, изучение структуры и функций иммуноглобулинов, их специфичности и эпигенетического статуса представляется чрезвычайно важным для понимания фундаментальных основ возникновения и прогрессии РС. В последние годы обнаруживается все больше закономерностей и стереотипных ответов антител, когда у разных индивидов вырабатываются иммуноглобулины, распознающие определенные антигенные эпитопы с использованием одних и тех же генов IgV [32–34]. Другими словами, определенные зародышевые линии иммуноглобулинов проявляют тропность к определенным антигенам. Соответственно, вариации использования некоторых генов зародышевой линии могут быть связаны с различной способностью организма генерировать эффективный иммунный ответ, что может проявляться в виде предрасположенности к различным заболеваниям, в том числе и аутоиммунной природы. Вполне вероятно, что различия в частоте встречаемости генов зародышевой линии у каждого конкретного индивида могут быть результатом противовирусного или аутоиммунного ответа организма. До начала антигензависимой дифференцировки В-клеток, обусловленной соматической гипермутацией генов иммуноглобулинов, разнообразие незрелых В-клеток, к которым относятся и транзиторные Breg, практически полностью обусловлено конфигурацией генов зародышевой линии организма (V(D)J-рекомбинация). Поэтому детальное изучение репертуара иммуноглобулинов незрелых В-клеток у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями, в том числе РС, поможет обнаружить, какие именно перестройки в генах зародышевой линии способны приводить к функциональным нарушениям иммунной системы.

В настоящей работе показано, что распределение генов зародышевой линии иммуноглобулинов в популяции транзиторных Breg у больных РС отличается от распределения у условно здорового человека. Особенно значимые отличия наблюдаются для гермлайнов IGLV1-44 и IGHV2-5. Ген лямбда-цепи IGLV1-44 практически не представлен в субпопуляции транзиторных Breg условно здорового человека, но достоверно проявляется у пациентов с РС. При РС гермлайн IGHV4-31 встречается чаще как в общем пуле В-клеток, так и в субпопуляции транзиторных Breg. С зародышевыми линиями IGHV2-26, IGHV2-5, IGHV2-70 тяжелой цепи наблюдается обратная картина – эти гермлайны,

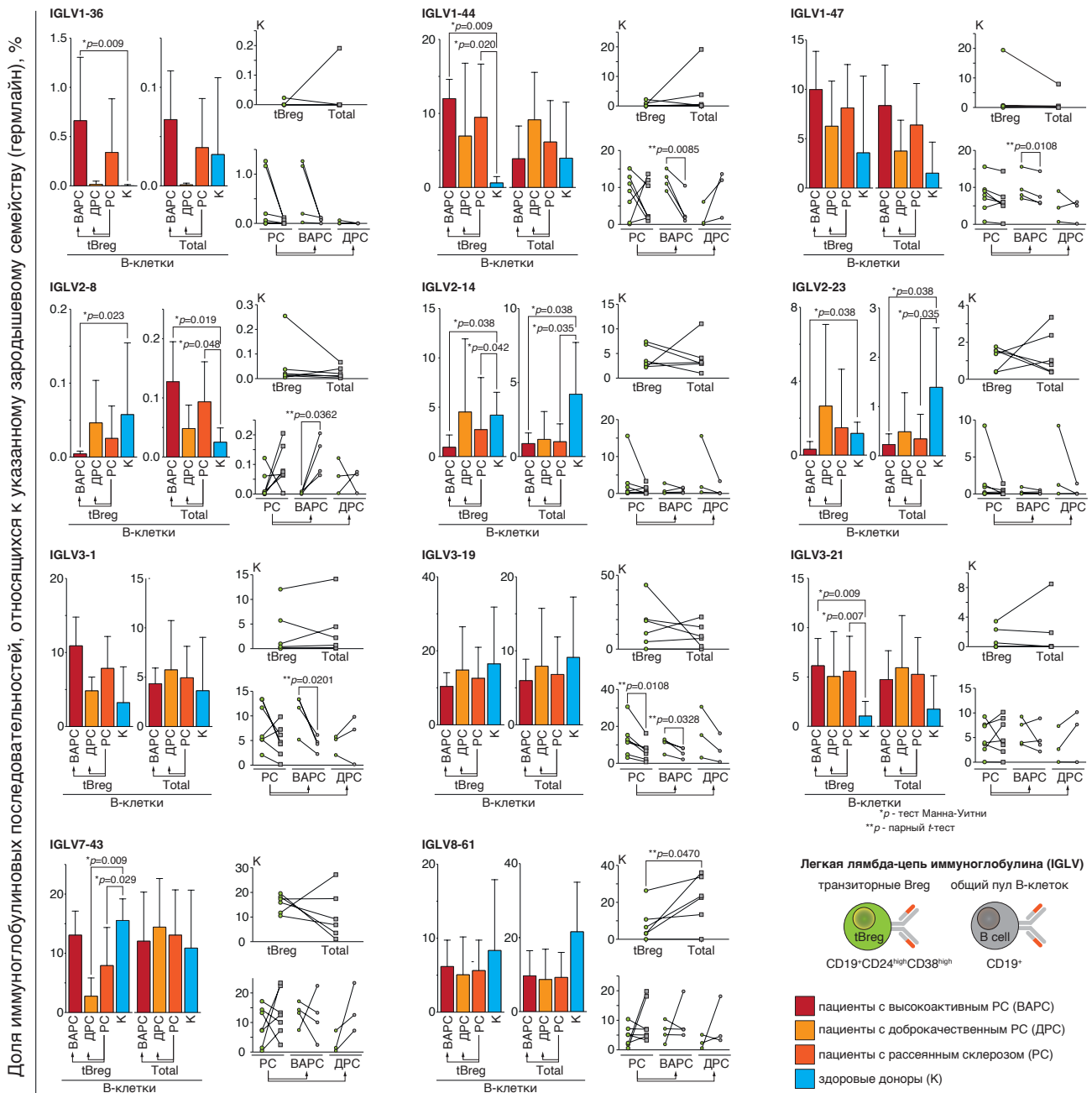


Рис. 3. Частота встречаемости генов зародышевой линии, кодирующих вариабельные фрагменты легкой лямбда-цепи (V_L) иммуноглобулинов у пациентов с РС и условно здоровых доноров. Проанализировано 26 функциональных V_L генов у пациентов с РС, пациентов с доброкачественным течением РС (ДРС) и высокоактивным РС (ВАРС). Контроль (К) – частота встречаемости генов иммуноглобулинов у условно здоровых доноров. Сравнивали распределение репертуара генов зародышевой линии между общим пулом В-клеток периферической крови ($CD19^+$) и транзиторными Vreg ($tBreg$) с фенотипом $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$. Сравнение пациентов с разными типами течения РС и условно здоровых доноров изображено на гистограммах, где приведено среднее для каждой группы пациентов значение ($mean \pm SD$) доли последовательностей Ig, относящихся к указанному гену зародышевой линии. Справа от гистограммы приведена доля иммуноглобулиновых последовательностей, относящихся к указанному гену зародышевой линии, по отдельности для каждого пациента; сравниваются общий пул периферических В-клеток (total – серые точки) и субпопуляция транзиторных регуляторных В-клеток ($tBreg$ – зеленые точки). Приведены данные только для тех генов зародышевой линии, у которых выявлены статистически значимые различия хотя бы одного анализируемого параметра (сравнение разных типов течения РС против условно здоровых доноров – тест Манна–Уитни; сравнение общего пула В-клеток с субпопуляцией транзиторных Vreg ($tBreg$) – парный t -тест; изображены только статистически значимые значения p -value)

представленные, хоть и в небольшом количестве, практически у каждого здорового индивида, исчезают при развитии РС. При этом отличия от нормальных значений увеличиваются в случае более тяжелой формы заболевания. Интересно отметить, что ранее мы обнаружили также более существенные отличия в количестве транзиторных Vreg и уровне их зрелости у пациентов с ВАРС по сравнению с ДРС и условно здоровыми донорами [20]. Таким образом, нами показано, что более значимые сдвиги в репертуаре субпопуляции транзиторных В-регуляторных клеток с фенотипом CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} ассоциированы с осложненным течением РС. В целом, для всех зародышевых линий, кроме IGLV1-44, мы наблюдаем сходную картину – если при развитии РС изменяется частота встречаемости данного гена в общем пуле циркулирующих В-клеток, то сходная картина выявляется также и у транзиторных В-регуляторных клеток. Таким образом, отклонения в распределении генов иммуноглобулиновых рецепторов при развитии аутоиммунной патологии РС могут быть предопределены генетически и происходят уже

на ранней стадии созревания В-клеток. Дальнейшее развитие этой гипотезы требует расширения когорты пациентов, а также изучения различий в структуре и специфичности В-клеточных рецепторов других субпопуляций Vreg. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-10079 «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза», гранта РФФИ № 17-00-00229 (получение периферической крови больных рассеянным склерозом и здоровых доноров) и проекта 075-15-2021-1033 (13.2251.21.0111) в терминах широкомасштабного секвенирования.

Клеточный сортинг проводили с использованием оборудования, предоставленного ИБХ Центром коллективного пользования (ЦКП ИБХ РАН), поддержан Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (075-15-2020-807).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Thompson A.J., Baranzini S.E., Geurts J., Hemmer B., Ciccarelli O. // *Lancet*. 2018. V. 391. P. 1622–1636. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1).
- Belogurov A., Kuzina E., Kudriaeva A., Kononikhin A., Kovalchuk S., Surina Y., Smirnov I., Lomakin Y., Bacheva A., Stepanov A., et al. // *FASEB J*. 2015. V. 29. P. 1901–1913. <https://doi.org/10.1096/fj.14-259333>.
- Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J*. 2013. V. 27. P. 222–231. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213975>.
- Belogurov A., Kudriaeva A., Kuzina E., Smirnov I., Bobik T., Ponomarenko N., Kravtsova-Ivantsiv Y., Ciechanover A., Gabibov A. // *J. Biol. Chem*. 2014. V. 289. P. 17758–17766. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.544247>.
- Gabibov A.G., Belogurov A.A., Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., et al. // *FASEB J*. 2011. V. 25. P. 4211–4221. <https://doi.org/10.1096/fj.11-190769>.
- Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Stepanov A.V., Dronina M.A., Smirnov I.V., Bobik T.V., Pyrkov A.Y., Tikunova N.V., Sharanova S.N., Boitsov V.M., et al. // *Mol. Immunol*. 2014. V. 62. P. 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.01.013>.
- Baecher-Allan C., Kaskow B.J., Weiner H.L. // *Neuron*. 2018. V. 97. P. 742–768. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>.
- Ziganshin R.H., Ivanova O.M., Lomakin Y.A., Belogurov A.A., Kovalchuk S.I., Azarkin I.V., Arapidi G.P., Anikanov N.A., Shender V.O., Piradov M.A., et al. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2016. V. 15. P. 2366–2378. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.056036>.
- Ramasamy R., Mohammed F., Meier U.C. // *Immunol. Lett*. 2020. V. 217. P. 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.imllet.2019.10.017>.
- Wekerle H., Hohlfield R. // *N. Engl. J. Med*. 2003. V. 349. P. 185–186. <https://doi.org/10.1056/NEJMcibr035136>.
- Lomakin Y., Arapidi G.P., Chernov A., Ziganshin R., Tsyganov E., Lyadova I., Butenko I.O., Osetrova M., Ponomarenko N., Telegin G., et al. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00777>.
- Lanz T.V., Brewer R.C., Ho P.P., Moon J.-S., Jude K.M., Fernandez D., Fernandes R.A., Gomez A.M., Nadj G.S., Bartley C.M., et al. // *Nature*. 2022. V. 603. P. 321–327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>.
- Bjornevik K., Cortese M., Healy B.C., Kuhle J., Mina M.J., Leng Y., Elledge S.J., Niebuhr D.W., Scher A.I., Munger K.L., et al. // *Science*. 2022. V. 375. P. 296–301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>.
- Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., Paltsev M.A., Suchkov S.V. // *Autoimmun. Rev*. 2006. V. 5. P. 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2006.01.004>.
- Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 281–286. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509849103>.
- Lomakin Y., Kudriaeva A., Kostin N., Terekhov S., Kaminskaya A., Chernov A., Zakharova M., Ivanova M., Simaniv T., Telegin G., et al. // *Sci. Rep*. 2018. V. 8. P. 12679. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30938-0>.
- Sokolov A.V., Shmidt A.A., Lomakin Y.A. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 11–22.
- Ran Z., Yue-Bei L., Qiu-Ming Z., Huan Y. // *Front. Immunol*. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01884>.
- Matsumoto M., Fujii Y., Baba A., Hikida M., Kurosaki T., Baba Y. // *Immunity*. 2011. V. 34. P. 703–714. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.016>.
- Lomakin Y.A., Zvyagin I.V., Ovchinnikova L.A., Kabilov M.R., Staroverov D.B., Mikelov A., Tupikin A.E., Zakharova M.Y., Bykova N.A., Mukhina V.S., et al. // *Front. Immunol*. 2022. V. 13. P. 3678. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.803229>.

21. Díaz C., Zarco L.A., Rivera D.M. // *Mult. Scler. Relat. Disord.* 2019. V. 30. P. 215–224. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.01.039>.
22. Schaefer L.M., Poettgen J., Fischer A., Gold S., Stellmann J.P., Heesen C. // *Brain Behav.* 2019. V. 9. P. e01259. <https://doi.org/10.1002/brb3.1259>.
23. Sand I.K., Krieger S., Farrell C., Miller A.E. // *Mult. Scler. J.* 2014. V. 20. P. 1654–1657. <https://doi.org/10.1177/1352458514521517>.
24. Cheng J., Torkamani A., Grover R.K., Jones T.M., Ruiz D.I., Schork N.J., Quigley M.M., Hall F.W., Salomon D.R., Lerner R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 560–565. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101148108>.
25. Bolotin D.A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Chudakov D.M. // *Nat. Meth.* 2015. V. 12. P. 380–381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>.
26. Choi J.K., Yu C.R., Bing S.J., Jittayasothorn Y., Mattapallil M.J., Kang M., Park S.B., Lee H.S., Dong L., Shi G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2021. V. 118. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2109548118>.
27. Radomir L., Kramer M.P., Perpinial M., Schottlender N., Rabani S., David K., Wiener A., Lewinsky H., Becker-Herman S., Aharoni R., et al // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. <https://doi.org/10.1038/S41467-021-22230-Z>.
28. Blair P.A., Noreña L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. // *Immunity.* 2010. V. 32. P. 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
29. Zhu H.-Q., Xu R.-C., Chen Y.-Y., Yuan H.-J., Cao H., Zhao X.-Q., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2015. V. 172. P. 101–110. <https://doi.org/10.1111/bjd.13192>.
30. von Büdingen H.C., Kuo T.C., Sirota M., van Belle C.J., Apeltsin L., Glanville J., Cree B.A., Gourraud P.A., Schwartzburg A., Huerta G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. P. 4533–4543. <https://doi.org/10.1172/JCI63842>.
31. Owens G.P., Wings K.M., Ritchie A.M., Edwards S., Burgoon M.P., Lehnhoff L., Nielsen K., Corboy J., Gilden D.H., Bennett J.L. // *J. Immunol.* 2007. V. 179. P. 6343–6351. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.9.6343>.
32. Mikocziova I., Greiff V., Sollid L.M. // *Genes Immun.* 2021. V. 22. P. 205–217. <https://doi.org/10.1038/s41435-021-00145-5>.
33. Henry Dunand C.J., Wilson P.C. // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2015. V. 370. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0238>.
34. Wang Y., Yuan M., Lv H., Peng J., Wilson I.A., Wu N.C. // *Immunity.* 2022. V. 55. P. 1105–1117.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.03.019>.

УДК 577.112.6:615.214.31

Низкомолекулярный миметик BDNF, дипептид ГСБ-214, предотвращает ухудшение памяти у крыс на моделях болезни Альцгеймера

П. Ю. Поварнина^{1*}, А. А. Волкова^{1,2}, О. Н. Воронцова¹, А. А. Каменский², Т. А. Гудашева¹, С. Б. Середенин¹

¹Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, Москва, 125315 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: povarnina@gmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2022

Принята к печати 30.09.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11755

РЕФЕРАТ Известно, что мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) вовлечен в патогенез болезни Альцгеймера (БА). Однако фармакологическое использование полно-размерного нейротрофина затрудняет его макромолекулярная белковая природа. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова создан дипептидный миметик BDNF – ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-метионил-L-серина), активирующий *in vitro* TrkB, PI3K/Akt и PLC- γ 1. ГСБ-214 проявил нейропротекторную активность при транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс (в дозе 0.1 мг/кг, внутривенно (в/в)) и улучшил память в тесте распознавания нового объекта (0.1 и 1.0 мг/кг, в/в). Изучено влияние ГСБ-214 на память в условиях скополаминовой и стрептозотоциновой моделей БА в связи с активацией рецепторов TrkB. БА моделировали хроническим в/в введением скополамина или однократным введением стрептозотоцина в желудочки мозга крыс. ГСБ-214 вводили в течение 10 дней после окончания введения скополамина в дозах 0.05, 0.1 и 1 мг/кг (в/в) или в течение 14 дней после введения стрептозотоцина в дозе 0.1 мг/кг (в/в). Эффект дипептида оценивали в тесте распознавания нового объекта, зависимость мнемотропного действия от Trk-рецепторов выявляли, используя соединение K252A – специфический блокатор нейротрофиновых Trk-рецепторов. ГСБ-214 в дозах 0.05 и 0.1 мг/кг статистически значимо предотвращал вызванное скополамином ухудшение долговременной памяти и не влиял на кратковременную. На стрептозотоциновой модели ГСБ-214 полностью устранял ухудшение кратковременной памяти. Мнемотропный эффект ГСБ-214 не регистрировался при блокаде Trk-рецепторов K252A.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА мозговой нейротрофический фактор, димерный дипептидный миметик, болезнь Альцгеймера, скополамин, стрептозотоцин, память.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BDNF – мозговой нейротрофический фактор (brain-derived neurotrophic factor); SC – скополамин; STZ – стрептозотоцин; БА – болезнь Альцгеймера.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой причиной деменции, на нее приходится 60–80% всех случаев, при этом эффективная патогенетическая терапия заболевания отсутствует [1].

В последние два десятилетия в качестве новых стратегий терапии нейродегенеративных заболеваний рассматривается регуляция активности рецепторов нейротрофинов, в частности мозгового нейро-

трофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). BDNF поддерживает жизнеспособность нейронов, синаптическую пластичность, играет важную роль в процессах обучения и памяти. Опубликованы данные, свидетельствующие об участии BDNF в патогенезе БА [2–4]. Снижение экспрессии BDNF наблюдается уже на ранней стадии заболевания и коррелирует с накоплением β -амилоида и гиперфосфорилированного тау-белка

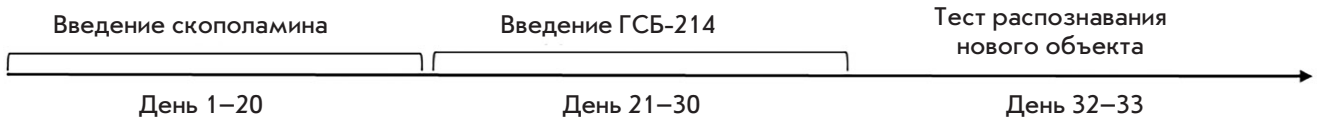


Рис. 2. Схема исследования мнотропной активности ГСБ-214 на скополаминовой модели БА



Рис. 3. Схема исследования мнотропной активности ГСБ-214 на стрептозотоциновой модели БА. STZ – стрептозотозин

ли крысам в/б в дозе 2 мг/кг в течение 20 дней. ГСБ-214 в дистиллированной воде вводили в дозах 0.05, 0.1 и 1.0 мг/кг, в/б в течение 10 дней после скополамина. Группе «Контроль» вместо скополамина вводили физиологический раствор, а вместо ГСБ-214 – дистиллированную воду по той же схеме в эквивалентных объемах. Группе «SC» вводили скополамин и дистиллированную воду.

На 32–33-й дни проводили тест распознавания нового объекта.

Схема эксперимента представлена на рис. 2.

Стрептозотоциновая модель БА

Крыс разделяли случайным образом на группы: «Контроль» ($n = 10$), «Стрептозотозин» (STZ) ($n = 7$), STZ + ГСБ-214 (0.1 мг/кг) ($n = 8$). STZ в цитратном буфере вводили с помощью стереотаксиса в желудочки мозга AP = -1.0; L = 1.5; глубина 3.5 в дозе 3 мг/кг. Объем инъекции составлял 3 мкл в каждый желудочек, скорость введения 1 мкл/мин. Через 1 ч после операции в/б вводили ГСБ-214 в дозе 0.1 мг/кг и далее однократно каждый день в течение 13 дней. Группе «Контроль» вместо STZ вводили цитратный буфер, а вместо ГСБ-214 – дистиллированную воду по той же схеме в эквивалентных объемах. Группе «STZ» вводили STZ и дистиллированную воду.

На 19–20-й дни проводили тест распознавания нового объекта. Схема эксперимента представлена на рис. 3.

Тест распознавания нового объекта

Тест основан на естественном стремлении грызунов исследовать новые объекты [19]. Он широко исполь-

зуется для оценки как кратковременной, так и долговременной памяти [20].

Тест проводили в клетках Т4, идентичных домашним клеткам, в которых содержали животных на протяжении исследования. Крысу сначала сажали в пустую клетку с опилками на 4 мин для адаптации.

Фаза ознакомления. В два ближайших угла клетки помещали два одинаковых незнакомых для крысы

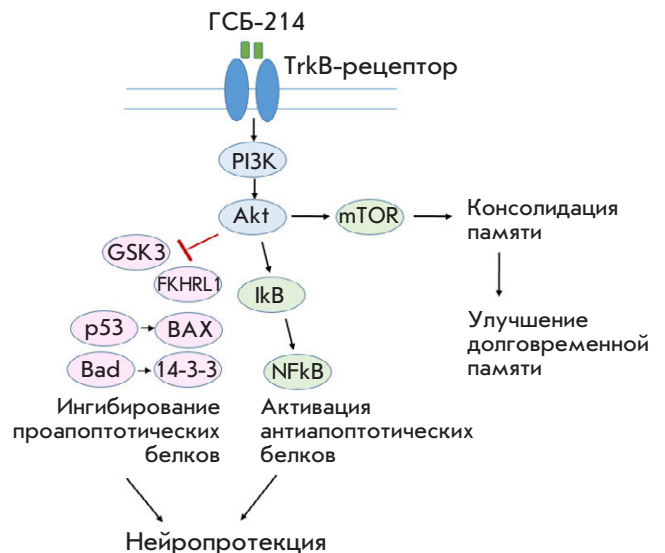


Рис. 4. Возможные механизмы действия дипептидного миметика BDNF ГСБ-214 на моделях БА

объекта. В течение 4 мин регистрировали время исследования объектов. Затем крысу возвращали в домашнюю клетку.

Тест. В те же углы клетки помещали новую пару объектов, в которой один объект был идентичен объектам, предъявляемым в фазе ознакомления, а второй был незнакомым. В течение 4 мин регистрировали время исследования знакомого и нового объектов. Тест проводили через 1 ч (тест 1) и 24 ч (тест 2) после фазы ознакомления для регистрации кратковременной и долговременной памяти соответственно. В тесте 1 и тесте 2 использовали разные незнакомые объекты. Исследованием считали обнюхивание, когда нос животного находился на расстоянии не более 2 см от объекта.

В качестве критерия памяти использовали коэффициент дискриминации [21], который рассчитывали по формуле: $K_d = (T_{нов} - T_{зн}) / (T_{нов} + T_{зн})$, где $T_{нов}$ – время исследования нового объекта, $T_{зн}$ – время исследования знакомого объекта. Значения $K_d > 0$ означают, что животное помнит объект, предъявлявшийся в фазу ознакомления.

Фармакологический ингибиторный анализ

Крысы были разделены случайным образом на группы: «Контроль» (дист. вода и 1% DMSO в физ. растворе, $n = 12$), ГСБ-214 0.1 мг/кг (ГСБ-214 и 1% DMSO, $n = 13$), ГСБ-214 0.1 мг/кг + К252А 100 мкг/кг ($n = 12$), К252А 100 мкг/кг (дист. вода и К252А, $n = 13$). ГСБ-214 в дозе 0.1 мг/кг или эквивалентное количество дистиллированной воды вводили в/б через 20 мин после в/б инъекции К252А в дозе 100 мкг/кг в 1% DMSO или 1% DMSO. Через 24 ч начинали тест распознавания нового объекта. Доза ГСБ-214 выбрана на основании предыдущих экспериментов [22].

Статистический анализ

Статистическую обработку полученных в ходе экспериментов данных проводили с помощью компьютерной программы GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, США). Статистическую значимость различий коэффициентов дискриминации оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Даннета или двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA) с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Тьюки.

Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дипептид ГСБ-214 препятствует ухудшению долговременной памяти в условиях скополаминовой модели БА

По сравнению с контрольной группой хроническое введение скополамина вызывало статистически значимое снижение коэффициента дискриминации как в тесте 1 (через 1 ч после ознакомления с объектами, $p = 0.0212$), так и в тесте 2 (через 24 ч после ознакомления, $p = 0.0077$), что свидетельствует об ухудшении соответственно кратковременной и долговременной памяти (табл. 1). Хроническое введение ГСБ-214 в дозах 0.05 и 0.1 мг/кг противодействовало ухудшению долговременной памяти ($p = 0.0177$ и 0.0304 по сравнению с группой «SC» соответственно), но не влияло на кратковременную память. Дипептид ГСБ-214 в дозе 1.0 мг/кг активно не обладал (табл. 1).

Таким образом, ГСБ-214 в дозах 0.05 и 0.1 мг/кг (в/б, 10 дней) препятствовал ухудшению долговременной памяти в скополаминовой модели БА.

Дипептид ГСБ-214 препятствует ухудшению кратковременной памяти в условиях стрептозотоциновой модели БА

На стрептозотоциновой модели БА нами выявлены статистически значимые нарушения памяти у крыс группы «STZ» через 1 ч после ознакомления с объектами ($p = 0.0045$), но не через 24 ч (табл. 2). Таким образом, в условиях данной экспериментальной БА у крыс наблюдались нарушения кратковременной, но не долговременной памяти, что характерно для ранней стадии развития заболевания [23]. ГСБ-214 в дозе 0.1 мг/кг статистически значимо корректировал эти нарушения ($p = 0.0032$), коэффициент дискриминации в группе животных, получавших лечение, был выше в 4.8 раза по сравнению с группой «STZ» (табл. 2).

Таким образом, дипептид ГСБ-214 полностью подавлял развитие нарушений кратковременной памяти на стрептозотоциновой модели БА.

Мнемотропная активность ГСБ-214 зависит от активации Trk-рецепторов

Для выявления вовлеченности активации Trk-рецепторов в мнемотропные эффекты ГСБ-214 мы изучили влияние К252А, блокатора этих рецепторов, на эффекты ГСБ-214 в тесте распознавания нового объекта. Как видно из табл. 3, дипептид ГСБ-214 статистически значимо улучшал долговременную память, увеличивая коэффициент дискриминации при тестировании через 24 ч примерно в 1.5 раза по сравнению с контролем. Введение бло-

Таблица 1. Эффекты ГСБ-214 на модели скополаминовой амнезии в тесте распознавания нового объекта

Группа	Количество животных в группе	Коэффициент дискриминации	
		Тест 1 (1 ч)	Тест 2 (24 ч)
Контроль	9	0.57 ± 0.05	0.53 ± 0.06
SC	10	0.3 ± 0.06*	0.23 ± 0.06**
SC+ГСБ-214 (0.05 мг/кг)	10	0.48 ± 0.07	0.48 ± 0.04[#]
SC+ГСБ-214 (0.1 мг/кг)	9	0.45 ± 0.07	0.47 ± 0.05[#]
SC+ГСБ-214 (1.0 мг/кг)	10	0.33 ± 0.06	0.44 ± 0.08

Данные представлены в виде значений среднего и стандартных ошибок среднего. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ по сравнению с группой «Контроль»; # $p < 0.05$ по сравнению с группой «SC» (one-way ANOVA, тест Даннета).

Таблица 2. Эффекты ГСБ-214 на память на стрептозотоциновой модели БА в тесте распознавания нового объекта

Группа	Количество животных в группе	Коэффициент дискриминации	
		Тест 1 (1 ч)	Тест 2 (24 ч)
Контроль	10	0.46 ± 0.07	0.49 ± 0.05
STZ	7	0.1 ± 0.08**	0.43 ± 0.07
STZ+ГСБ-214 (0.1 мг/кг)	8	0.48 ± 0.07^{##}	0.48 ± 0.03

Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего. ** $p < 0.01$ по сравнению с группой «Контроль», ## $p < 0.01$ по сравнению с группой «STZ» (one-way ANOVA, тест Даннета).

Таблица 3. Блокатор Trk-рецепторов полностью снимает мнотропный эффект ГСБ-214 на долговременную память

Группа	Количество животных в группе	Коэффициент дискриминации	
		Тест 1 (1 ч)	Тест 2 (24 ч)
Контроль	12	0.53 ± 0.07	0.47 ± 0.06
ГСБ-214 (0.1 мг/кг)	13	0.5 ± 0.05	0.73 ± 0.03***
ГСБ-214 (0.1 мг/кг) + K252A	12	0.53 ± 0.06	0.36 ± 0.03####
K252A	13	0.54 ± 0.06	0.43 ± 0.05

Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок среднего. *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем; #### $p < 0.0001$ по сравнению с группой «ГСБ-214» (two-way ANOVA, тест Тьюки).

катора K252A за 20 мин до ГСБ-214 полностью снимало этот эффект. Сам K252A не оказывал влияния на память крыс. Не выявлено влияния исследуемых соединений на кратковременную память крыс (тест 1) (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы обнаружили положительное влияние дипептидного миметика BDNF ГСБ-214 при его однократном в/б введении в дозах 0.1 и 1.0 мг/кг на долговременную память крыс в тесте распознавания нового объекта [22].

В настоящем исследовании мы изучили мнотропную активность ГСБ-214 в том же тесте в скополаминовой и стрептозотоциновой моделях БА.

Скополаминовая амнезия широко используется для оценки потенциальных терапевтических средств для лечения БА [24–26]. Хроническое введение скополамина приводит к развитию холинергического дефицита, вызванного главным образом блокадой холинорецепторов и, как следствие, когнитивных нарушений [25]. В использованной нами модификации модели [24] нарушения, индуцированные хроническим введением скополамина с его последующей отменой (см. схему эксперимента на рис. 2), объясняются включением механизмов обратной связи, которые сначала ведут к повышению плотности и аффинности холинорецепторов, а затем к холинергическому дефициту, обусловленному ускоренным связыванием «наличного» ацетилхолина.

Модель БА, индуцированной введением стрептозотина в желудочки мозга, также широко применяется, валидирована и хорошо изучена [27, 28]. Диабетогенный токсин стрептозотин проникает в клетки, связываясь с транспортером глюкозы 2 за счет структурного сходства с молекулой сахарозы [28]. Внутримозговое введение стрептозотина вызывает инсулинорезистентность и нарушение метаболизма глюкозы в головном мозге [29]. Это приводит к развитию нейропатологических признаков, характерных для БА, таких, как аккумуляция β-амилоида и гиперфосфорилированного тау-белка, окислительный стресс, гибель нейронов и синапсов [30–33]. Стрептозотоциновая модель БА, как и скополаминовая, ассоциирована с нарушениями памяти [31, 33].

В условиях скополаминовой модели мы выявили нарушения кратковременной и долговременной памяти, что соответствует опубликованным данным [26, 34]. Дипептид ГСБ-214 корректировал только нарушения долговременной памяти и не влиял на кратковременную. Это согласуется с результатами, полученными нами ранее в физиологических условиях в тесте распознавания нового объекта

[22]. Мы предполагаем, что выявленный эффект ГСБ-214 обусловлен активацией пострецепторного сигнального каскада PI3K/Akt, показанной ранее в экспериментах *in vitro* [10]. Компонентом каскада PI3K/Akt является серин/треониновая протеинкиназа mTOR – один из основных регуляторов белкового синтеза [35], который рассматривается как ключевой фактор консолидации памяти и, как следствие, формирования долговременной памяти [36]. С использованием теста распознавания нового объекта установлено, что ингибирование mTOR приводит к нарушениям долговременной, но не кратковременной памяти у крыс [37]. Можно предположить, что эффекты ГСБ-214 в условиях скополаминовой модели БА обусловлены улучшением консолидации памяти посредством активации сигнального каскада TrkB/PI3K/Akt/mTOR. С помощью фармакологического ингибиторного анализа мы показали, что мнемоторная активность ГСБ-214 обусловлена активацией нейротрофиновых Trk-рецепторов, с которыми сопряжен сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR.

В условиях стрептозотоциновой модели мы наблюдали нарушение только кратковременной памяти, что может свидетельствовать об относительно слабо выраженных нейродегенеративных изменениях, характерных для ранней БА [38]. ГСБ-214 корректировал данное нарушение. Поскольку ранее мы не наблюдали влияния ГСБ-214 на кратковременную память в физиологических условиях [22], можно предположить, что восстановление памяти происходило за счет увеличения жизнеспособности нейронов в условиях индуцированной стрептозотоцином токсичности. Нейропротекторные эффекты ГСБ-214 были выявлены ранее в экспериментах *in vitro* [15], а также на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс [16]. Эти эффекты, как и мнемоторные, предположительно связаны с активацией сигнального каскада PI3K/Akt.

Хорошо известно, что этот каскад опосредует нейропротекцию за счет ингибирования проапоптотических белков и увеличения экспрессии антиапоптотических белков [39]. Показано, что PI3K/Akt опосредует снижение активности киназы гликогенсинтазы 3β (GSK-3β), вовлеченной в увеличение продукции β-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка [40].

Интересно отметить, что выявленная ранее антидиабетическая активность ГСБ-214 зависела от активации каскада PI3K/Akt, как установлено с помощью фармакологического ингибиторного анализа [17]. Поскольку хорошо известно о сходстве патогенеза БА и сахарного диабета [18], это свидетельствует в пользу вклада PI3K/Akt и в эффекты ГСБ-214 в стрептозотоциновой модели, которая воспроизводит все основные патофизиологические механизмы заболевания.

Предполагаемые механизмы действия ГСБ-214 на моделях БА приведены на рис. 4. Для установления точных механизмов действия ГСБ-214 в условиях экспериментальной БА необходимы дополнительные исследования.

Активация сигнального каскада PI3K/Akt дипептидом ГСБ-214, выявленная ранее в экспериментах *in vitro* [10], может способствовать нейропротекции за счет ингибирования проапоптотических белков и активации антиапоптотических белков, а также улучшению консолидации памяти и, как следствие, долговременной памяти посредством активации регулятора белкового синтеза mTOR.

ВЫВОДЫ

Таким образом, низкомолекулярный миметик BDNF – дипептид ГСБ-214, корректирует индуцированные нарушения памяти у крыс в условиях скополаминовой и стрептозотоциновой моделей болезни Альцгеймера. Эффект ГСБ-214 зависит от активации Trk-рецепторов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 2019 Alzheimer's disease facts and figures // Alzheimer's Dementia. 2019. V. 15. № 3. P. 321–387.
2. Giuffrida M.L., Copani A., Rizzarelli E. // Aging (Albany, NY). 2018. V. 10. № 8. P. 1791–1792.
3. Iulita M.F., Bistué Millón M.B., Pentz R., Aguilar L.F., Do Carmo S., Allard S., Michalski B., Wilson E.N., Ducatzenzeiler A., Bruno M.A., et al. // Neurobiol. Dis. 2017. V. 108. P. 307–323.
4. Amidfar M., de Oliveira J., Kucharska E., Budni J., Kim Y.K. // Life Sci. 2020. V. 257. P. 118020.
5. Wang Z.H., Xiang J., Liu X., Yu S.P., Manfredsson F.P., Sandoval I.M., Wu S., Wang J.Z., Ye K. // Cell Rep. 2019. V. 28. № 3. P. 655.
6. Arancibia S., Silhol M., Moulière F., Meffre J., Höllinger I., Maurice T., Tapia-Arancibia L. // Neurobiol. Dis. 2008. V. 31. № 3. P. 316–326.
7. Nagahara A.H., Mateling M., Kovacs I., Wang L., Eggert S., Rockenstein E., Koo E.H., Masliah E., Tuszynski M.H. // J. Neurosci. 2013. V. 33. № 39. P. 15596–15602.
8. Jiao S.S., Shen L.L., Zhu C., Bu X.L., Liu Y.H., Liu C.H., Yao X.Q., Zhang L.L., Zhou H.D., Walker D.G., et al. // Transl. Psychiatry. 2016. V. 6. № 10. P. e907.
9. Kopec B., Zhao L., Rosa-Molinar E., Siahaan T. // Med. Res. Arch. 2020. V. 8. № 2. P. 2043.
10. Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Tarasiuk A.V., Seredenin S.B. // Med. Res. Rev. 2021. № 41. P. 2746–2774.
11. Longo F.M., Massa S.M. // Nat. Rev. Drug Discov. 2013. V. 12. № 7. P. 507–525.
12. Zhang Z., Liu X., Schroeder J.P., Chan C.-B., Song M., Yu

- S.P., Weinschenker D., Ye K. // *Neuropsychopharmacology*. 2014. V. 39. № 3. P. 638–650.
13. Aytan N., Choi J.K., Carreras I., Crabtree L., Nguyen B., Lehar M., Blusztajn J.K., Jenkins B.G., Dedeoglu A. // *Eur. J. Pharmacol.* 2018. V. 828. P. 9.
14. Bollen E., Vanmierlo T., Akkerman S., Wouters C., Steinbusch H.M.W., Prickaerts J. // *Behav. Brain Res.* 2013. V. 257. P. 8–12.
15. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Биоорган. химия*. 2012. Т. 38. № 3. С. 280–290.
16. Gudasheva T.A., Povarnina P., Logvinov I.O., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Drug Des. Devel. Ther.* 2016. V. 10. P. 3545–3553.
17. Ягубова С.С., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2020. Т. 169. № 6. С. 712–715.
18. de la Monte S.M., Wands J.R. // *J. Diabetes Sci. Technol.* 2008. V. 2. № 6. P. 1101.
19. Ennaceur A., Delacour J. // *Behav. Brain Res.* 1988. V. 31. № 1. P. 47–59.
20. Antunes M., Biala G. // *Cogn. Process.* 2012. V. 13. № 2. P. 93–110.
21. Beldjoud H., Barsegyan A., Roozendaal B. // *Front. Behav. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 108.
22. Волкова А.А., Поварнина П.Ю., Никифоров Д.М., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. // *Химико-фармацевтический журн.* 2022. Т. 56. № 4. С. 3–6.
23. Richter N., Beckers N., Onur O.A., Dietlein M., Tittgemeyer M., Kracht L., Neumaier B., Fink G.R., Kukulja J. // *Brain.* 2018. V. 141. № 3. P. 903–915.
24. Островская Р.У., Мирзоев Т.Х., Фирова Ф.А. // *Эксп. клин. фармакол.* 2001. Т. 64. № 2. С. 11–14.
25. van Dam D., De Deyn P.P. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 11. P. 956–970.
26. Bhuvanendran S., Kumari Y., Othman I., Shaikh M.F. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 665.
27. Rai S., Kamat P.K., Nath C., Shukla R. // *J. Neuroimmunol.* 2013. V. 254. № 1–2. P. 1–9.
28. Kamat P.K., Kalani A., Rai S., Tota S.K., Kumar A., Ahmad A.S. // *Mol. Neurobiol.* 2016. V. 53. № 7. P. 4548–4562. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12035-015-9384-y>.
29. Kamat P.K. // *Neural Regen. Res.* 2015. V. 10. № 7. P. 1050.
30. Salkovic-Petrisic M., Hoyer S. // *J. Neural Transm. Suppl.* 2007. № 72. P. 217–233.
31. Ravelli K.G., Rosário B. dos A., Camarini R., Hernandez M.S., Britto L.R. // *Neurotox. Res.* 2017. V. 31. № 3. P. 327–333.
32. Bassani T.B., Turnes J.M., Moura E.L.R., Bonato J.M., Cópola-Segovia V., Zanata S.M., Oliveira R.M.M.W., Vital M.A.B.F. // *Behav. Brain Res.* 2017. V. 335. P. 41–54.
33. Afshar S., Shahidi S., Rohani A.H., Komaki A., Asl S.S. // *Psychopharmacol.* 2018. V. 235. № 10. P. 2809–2822.
34. Mugwagwa A.T., Gadaga L.L., Pote W., Tagwireyi D. // *J. Neurodegener. Dis.* 2015. V. 2015. P. 1–9.
35. Switon K., Kotulska K., Janusz-Kaminska A., Zmorzynska J., Jaworski J. // *Neuroscience.* 2017. V. 341. P. 112–153.
36. Hernandez P.J., Abel T. // *Neurobiol. Learn Mem.* 2008. V. 89. № 3. P. 293–311.
37. Jobim P.F.C., Pedroso T.R., Werenicz A., Christoff R.R., Maurmann N., Reolon G.K., Schröder N., Roesler R. // *Behav. Brain Res.* 2012. V. 228. № 1. P. 151–158.
38. Porsteinsson A.P., Isaacson R.S., Knox S., Sabbagh M.N., Rubino I. // *J. Prev. Alzheimer's Dis.* 2021. V. 8. № 3. P. 371–386.
39. Reichardt L.F. // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2006. V. 361. № 1473. P. 1545–1564.
40. Long H.Z., Cheng Y., Zhou Z.W., Luo H.Y., Wen D.D., Gao L.C. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 648636.

УДК 578.424

Потенциальная связь отложенного воздействия катастрофических техногенных выбросов токсичных газов и клинического течения COVID-19

Дж. Суччи¹, В. Педрич², А. П. Богачук³, А. Г. Тормасов¹, А. А. Белогулов^{3,4}, А. Спаллоне^{3,5*}¹Университет Иннополис, Иннополис, 420500 Россия²Университет Альберты, Эдмонтон (AB), T6G 2R3 Канада³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия⁴Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, 127473 Россия⁵Неврологический центр Лациума Институт неврологических наук, Рим, 00178 Италия

*E-mail: aldospallone@hotmail.com

Поступила в редакцию 16.06.2022

Принята к печати 29.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11754

РЕФЕРАТ Пандемия, вызванная коронавирусом D-19 (COronaVIrus Disease 2019, COVID-19), серьезно затронула почти все страны мира: на текущий момент зарегистрировано 6.3 млн летальных исходов этого заболевания, 167 и 380 тысяч из которых приходится на Италию и Российскую Федерацию соответственно. В первую волну распространения инфекции аномально высокий уровень смертности зарегистрирован в Италии. Детальный анализ эпидемиологических данных свидетельствует, что смертность была более высокой в северных регионах, в частности в Ломбардии, в то время как в южных регионах клиническое течение COVID-19 у пациентов было более благоприятным. Подобный необъяснимо высокий уровень смертности в условиях столь грамотно организованной системы здравоохранения, как в Ломбардии, признанной одной из лучших в Италии, безусловно, требует убедительного объяснения. В 1976 году в небольшом городе Севезо, расположенном в Ломбардии, в результате крупной техногенной аварии произошел выброс диоксина. Промышленная катастрофа оказала существенное негативное воздействие на жителей близлежащих районов, более того, в последующие годы наблюдался рост онкологических заболеваний среди пострадавшего населения. В настоящей работе мы выдвигаем и последовательно доказываем гипотезу о роли выброса диоксина в качестве значимого негативного кофактора осложненного клинического течения COVID-19 у жителей Ломбардии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SARS-CoV-2, COVID-19, Италия, Севезо, диоксин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ COVID-19 (COronaVIrus Disease 2019); PM-10 – микроскопические взвешенные частицы; ISTAT – Итальянский институт статистики; ISPRA – Высший институт защиты окружающей среды /Итальянский высший институт защиты и экологических исследований.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия, вызванная коронавирусом D-19 (COronaVIrus Disease 2019, COVID-19), серьезно затронула почти все страны мира, распространившись из Китая на запад в Европу, затем в США, а позднее и в Южную Америку, Африку и Российскую Федерацию. На текущий момент во всем мире зарегистрировано 6.3 млн летальных исходов COVID-19, 380 тысяч из которых приходится на Российскую Федерацию. Последствия пандемии в первую волну распространения инфекции были особенно

значительными в ряде европейских стран, таких, как Испания, Франция, Бельгия, Великобритания и Италия, в то время как другие страны, такие, как Португалия, Германия, Скандинавские государства и Восточная Европа в целом, пострадали менее значительно по сравнению с упомянутыми странами. В частности, высокий уровень смертности зарегистрирован в Италии, где он значительно превысил уровень в остальном мире.

При детальном анализе эпидемиологических данных можно заметить, что этот повышенный

показатель в основном обусловлен более высокой смертностью в северных регионах, в частности в Ломбардии, в то время как в южных регионах клиническое течение COVID-19 было более благоприятным, как и предсказывала наша группа за несколько недель до вспышки болезни [1]. Эти данные особенно поражают, если сравнить общий уровень смертности с показателем за предыдущие 5 лет. Подобный необъяснимо высокий уровень смертности в условиях столь грамотно организованной системы здравоохранения, как в Ломбардии, признанной одной из лучших, если не самой лучшей в стране [2], безусловно, требует убедительного объяснения. Существует предположение о потенциальной негативной роли загрязнения воздуха микроскопическими взвешенными частицами (PM-10), наблюдаемого в Ломбардии [3] и некоторых соседних регионах, также серьезно затронутых пандемией COVID-19. Однако если предположить, что эта гипотеза верна, то трудно объяснить, почему сильно загрязненная Калифорния, подверженная воздействию PM-10, оказалась определенно менее уязвимой по сравнению с другими штатами, прежде всего с Нью-Йорком, концентрация PM-10 в котором ниже.

В 1976 году небольшой город Севезо, расположенный относительно недалеко от Брешии, Бергамо и Милана, стал печально известным из-за выброса диоксида вследствие крупной техногенной аварии. Непосредственное негативное воздействие промышленной катастрофы на жителей близлежащих районов было существенным, более того, в последующие годы наблюдался рост числа онкологических заболеваний у пострадавшего населения [4]. В настоящей работе мы выдвигаем гипотезу о роли выброса диоксида как негативного кофактора осложненного клинического течения COVID-19 у жителей Ломбардии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Нами сопоставлено расстояние от эпицентра выброса диоксида в Севезо с уровнем смертности в потенциально пострадавших провинциях. Сравнили уровень смертности от COVID-19 (число умерших (%) от общего числа инфицированных пациентов) в Ломбардии с данными из другого региона – города Бхопал (Индия), где в 1980 году произошел масштабный выброс токсичного газа метилизоцианата с местного завода Union Carbide, который считается крупнейшей по числу жертв техногенной катастрофой [5, 6].

Нами собраны данные о местных погодных условиях и розе ветров во время техногенных катастроф, а также рассчитано расстояние между

местами утечек и районами, наиболее пострадавшими от COVID-19. Мы также проанализировали загрязнение воздуха в трех точках в терминах концентрации PM-10. Две рассматриваемые техногенные катастрофы были вызваны разными газами: 2,3,7,8-тетрахлородибензодиоксином в Севезо [7] и метилизоцианатом в Бхопале [8–10]. Тем не менее, оба эти газа, как известно, обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [7, 11–15].

В двух описанных сценариях анализ местных условий позволил нам в той или иной степени реконструировать возможное распространение выбросов токсичных газов под воздействием ветра. В случае Севезо хорошие погодные условия в Ломбардии в сочетании с высоким давлением в Альпах (*рис. 1А*) способствовали тому, что воздушный поток Мистраль выносил токсичный газ на юго-восток, т.е. в направлении Бергамо, Брешии и далее на юг до западных провинций Венето и Эмилии-Романьи. Некоторые другие розы Мистралья также могли способствовать распространению газа в направлении восточного Пьемонта и северной части Лигурии (*рис. 1Б*). В регионе Бхопал в декабре, когда произошла авария, муссоны обычно дуют с севера на юго-запад (*рис. 2А*), поэтому выброс метилизоцианата скорее распространился из региона Бхопал штата Мадхья-Прадеш в соседний штат Махараштра (*рис. 2Б*). В случае Италии мы также рассмотрели возможное влияние фактора приезжих из Китая, а также течение инфекции в зависимости от плотности местного населения.

ИСТОЧНИКИ ДАННЫХ

В работе использованы материалы, представленные в общедоступных базах данных. В *табл. 1* показано распределение смертности в 2020 году по сравнению с предыдущими годами, согласно данным Итальянского института статистики (ISTAT). Увеличение особенно значимо в северных областях Италии, в частности в Ломбардии [1]. Сравнительный график представлен на *рис. 3*.

Данные о передвижении жителей Китая в Италию получены также из ISTAT. Данные о росте заболеваемости COVID-19 (<https://github.com/rcm-dpc/COVID-19>) взяты из официального репозитория GitHub правительства Италии [16] и представлены на *рис. 4*.

Данные о добавленной смертности от COVID-19 в Индии взяты из общедоступных источников (*табл. 2*). Данные по распределению концентрации PM-10 в Италии взяты из репозитория ISPRA (Высший институт защиты окружающей среды / Итальянский высший институт защиты и экологических исследований) [17]. На *рис. 5* показана

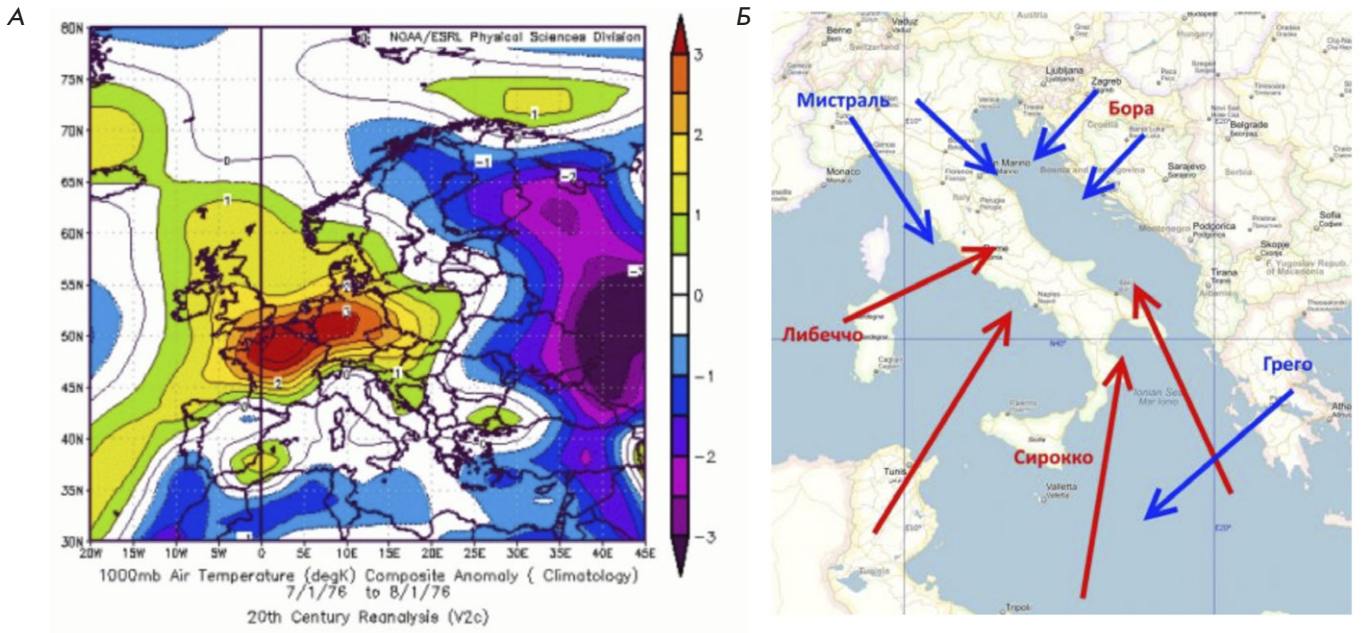


Рис. 1. Типичные погодные условия в Северной Италии в районе Альп (А) и типичная структура ветров в Италии (Б) (по материалам <http://sailroad.ru/article/lociya-srednej-dalmacii-chast-2>)

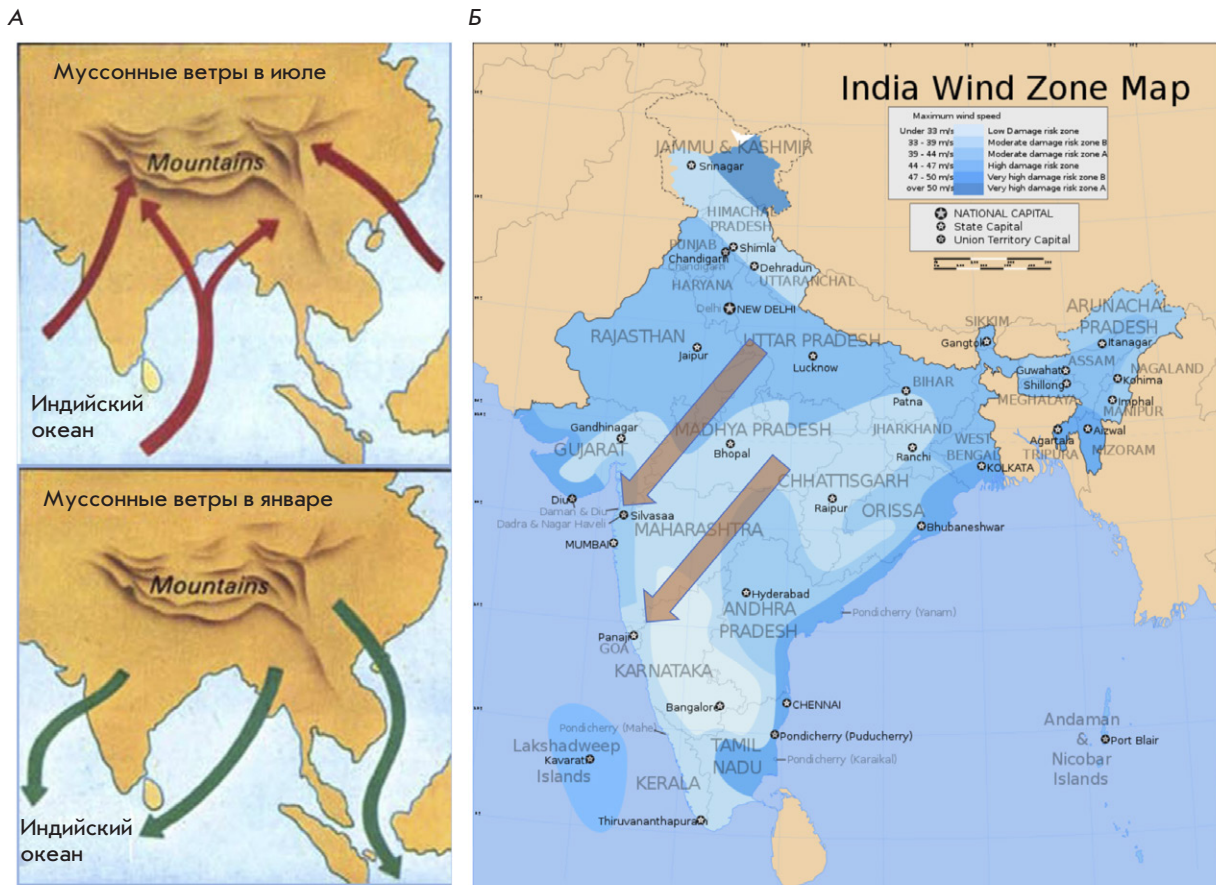


Рис. 2. Типичная структура розы ветров в Индии (А) по материалам <https://cloud.prezentacii.org/19/04/142027/images/screen7.jpg> Роза ветров вокруг Бхопала (Б) (по материалам https://commons.wikimedia.org/wiki/File:India_wind_zone_map_en.svg)

Таблица 1. Изменение смертности (%) за рассматриваемый период (15 февраля–15 апреля) по сравнению с аналогичным периодом 2019 года

Провинция	Коэффициент вариации, %	Провинция	Коэффициент вариации, %	Провинция	Коэффициент вариации, %
Agrigento	-22.22	Livorno	20.29	Pordenone	33.33
Cagliari	-16.67	Forli-Cesena	21.33	Milano	33.80
Matera	-7.69	Grosseto	21.54	Novara	34.73
Crotone	-6.45	Lucca	21.62	Rimini	34.85
Catania	-5.56	Rovigo	22.77	Chieti	36.36
Roma	3.94	Oristano	23.58	Gorizia	36.84
Perugia	5.15	Varese	24.33	Vercelli	37.61
Arezzo	6.60	Frosinone	24.49	Avellino	38.20
Lecce	6.72	Genova	24.65	Monza e Brianza	38.86
Vibo Valentia	7.14	Pistoia	24.79	Siracusa	39.34
Ravenna	7.30	Caltanissetta	25.00	Sud Sardegna	39.58
Foggia	9.16	Ascoli Piceno	25.53	Alessandria	39.64
Taranto	9.46	Savona	25.61	Latina	40.00
Messina	10.81	Asti	26.46	Isernia	40.00
Sassari	10.93	La Spezia	26.55	Campobasso	40.82
Catanzaro	11.11	Como	26.59	Benevento	41.67
Teramo	11.11	Torino	26.88	Trento	42.72
Potenza	11.49	Pescara	26.88	Reggio nell'Emilia	43.48
Ferrara	12.28	Modena	27.51	Mantova	43.77
Salerno	12.98	Firenze	27.66	Enna	44.78
Barletta-Andria-Trani	13.27	L'Aquila	28.00	Biella	45.48
Palermo	14.04	Padova	28.03	Aosta	47.65
Pisa	14.12	Cosenza	28.05	Pesaro e Urbino	49.56
Siena	14.17	Reggio di Calabria	28.26	Lecco	50.17
Fermo	15.00	Viterbo	28.38	Pavia	50.51
Belluno	15.65	Ancona	28.68	Ragusa	51.85
Venezia	17.41	Massa Carrara	28.84	Parma	56.97
Napoli	17.57	Vicenza	28.92	Caserta	59.26
Brindisi	17.90	Verbano-Cusio-Ossola	28.99	Brescia	64.25
Trapani	18.95	Udine	29.41	Piacenza	68.57
Bologna	19.02	Cuneo	30.02	Lodi	70.13
Macerata	19.32	Imperia	31.17	Cremona	71.93
Verona	19.47	Nuoro	31.73	Bergamo	78.77
Terni	20.00	Treviso	31.88		
Bari	20.15	Sondrio	32.34		

Примечание. Отсутствуют данные по провинции Больцано.

концентрация PM-10 в Европе. Хорошо видно, насколько превышена концентрация PM-10 в районе Паданской равнины [18].

СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Для статистической обработки данных мы использовали метод непараметрической ранговой корреляции Спирмена [19]. Этот метод не содержит каких-либо изначальных гипотез относительно исходных данных, кроме ранжирования по порядку, что всегда выполнялось в проведенных расчетах. В каче-

стве порога значимости мы приняли стандартный α -уровень 0.05. В случае нескольких гипотез применяли поправку Бонферрони [20]. В случае многофакторного анализа использовали тест ANOVA [21], также учитывающий α -уровень.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Китайская иммиграция

Присутствие в популяции Италии приезжих из Китая (<https://www.tuttitalia.it/statistiche/>

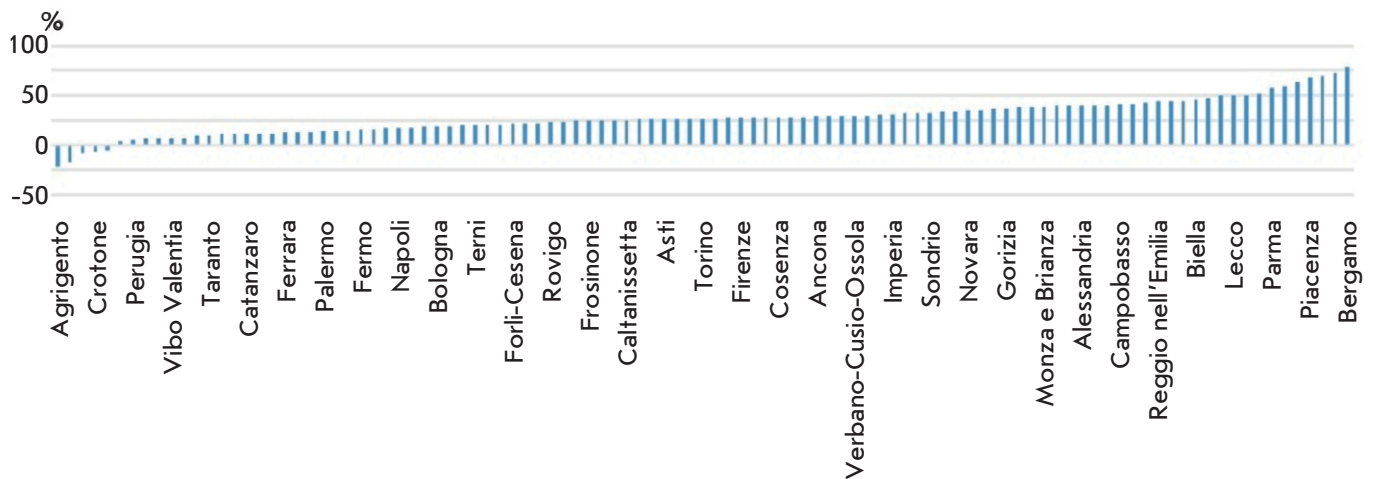


Рис. 3. Процент изменения смертности в провинциях Италии за рассматриваемый период (15 февраля–15 апреля). Приведены крайние значения из табл. 1

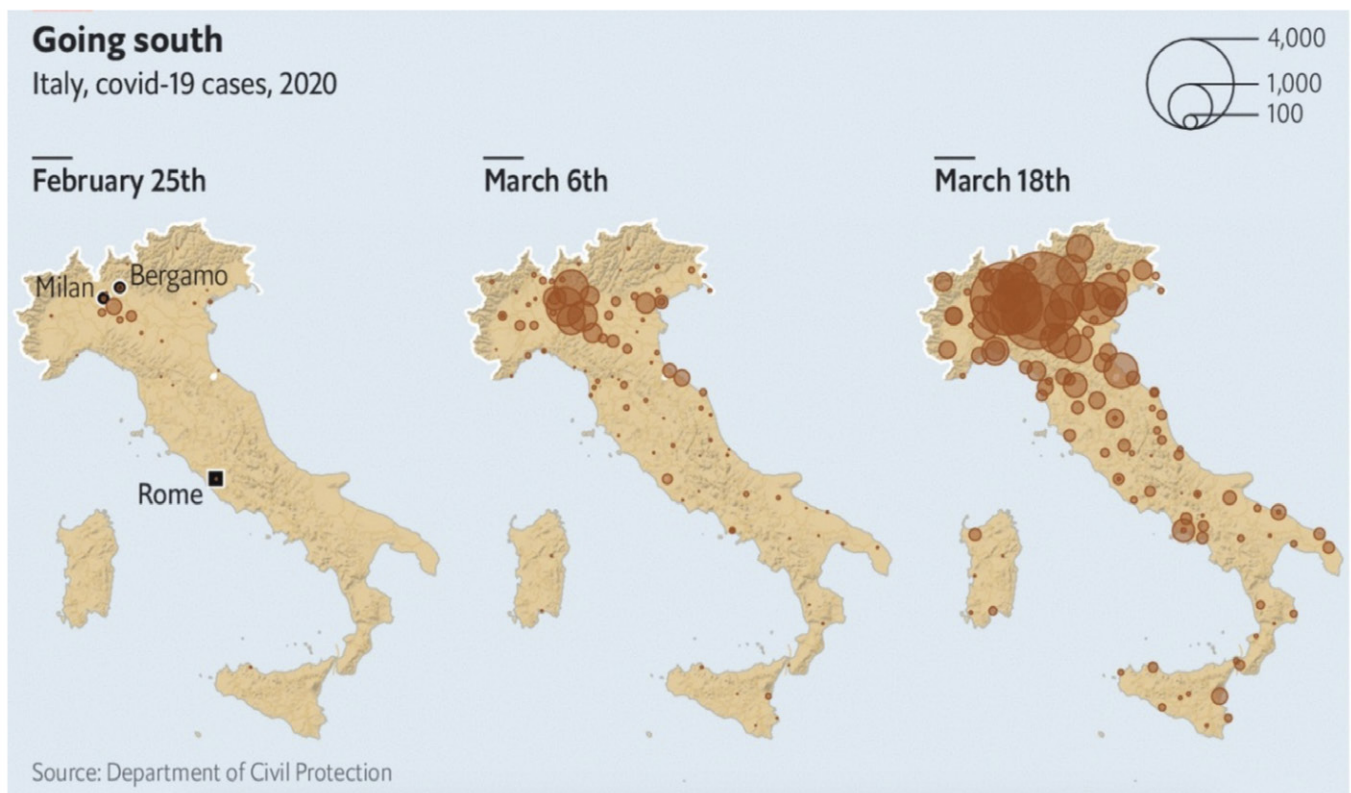


Рис. 4. Карта распространения COVID-19 в Италии по материалам <https://www.economist.com/europe/2020/03/19/italy-is-overtaking-china-as-the-country-worst-hit-by-covid-19>

cittadini-stranieri/repubblica-popolare-cinese/) не является фактором, усиливающим распространение COVID-19 [22]. В 2019 году число китайцев в Милане и Риме составляло 40438 (1.25% от общей численности населения) и 22815 (0.52%) соответственно, тогда как в провинциях с наибольшим процентом добавочной смертности их было значи-

тельно меньше: 4.488 (0.40%) в Бергамо, 1362 (0.35%) в Кремонне и 757 (0.33%) в Лоди.

Плотность населения

Согласно результатам анализа, социальная близость не влияла на распространение инфекции и уровень смертности в Италии. Мы не обнаружили какой-ли-

Таблица 2. Данные о смертности от COVID-19 в Индии по материалам <https://www.mohfw.gov.in/>

№	Штат	Общее число случаев	Вылечен/выписан/мигрировал	Смертельные случаи
1	Andaman and Nicobar Islands	33	33	0
2	Andhra Pradesh	2407	1456	50
3	Arunachal Pradesh	1	1	0
4	Assam	101	41	2
5	Bihar	1262	475	8
6	Chandigarh	191	51	3
7	Chhattisgarh	86	59	0
8	Dadar Nagar Haveli	1	0	0
9	Delhi	10054	4485	160
10	Goa	29	7	0
11	Gujarat	11379	4499	659
12	Haryana	910	562	14
13	Himachal Pradesh	80	44	3
14	Jammu and Kashmir	1183	575	13
15	Jharkhand	223	113	3
16	Karnataka	1147	509	37
17	Kerala	601	497	4
18	Ladakh	43	24	0
19	Madhya Pradesh	4977	2403	248
20	Maharashtra	33053	7688	1198
21	Manipur	7	2	0
22	Meghalaya	13	11	1
23	Mizoram	1	1	0
24	Odisha	828	220	4
25	Puducherry	13	9	1
26	Punjab	1964	1366	35
27	Rajasthan	5202	2992	131
28	Tamil Nadu	11224	4172	78
29	Telengana	1551	992	34
30	Tripura	167	85	0
31	Uttarakhand	92	52	1
32	Uttar Pradesh	4259	2441	104
33	West Bengal	2677	959	238
Общее число подтвержденных случаев		96169	36824	3029

бо значимой непараметрической корреляции между плотностью населения и увеличением смертности по отношению к среднему показателю за последние 5 лет – значения p составляют 0.083 и 0.071 соответственно. Также отсутствует связь между плотностью населения и скоростью распространения инфекции (0.17).

Влияние уровня РМ-10

РМ-10, по-видимому, оказывает некоторое влияние на летальность от COVID-19 при учете количества дней с уровнем РМ-10 выше порогового значения в Италии, в частности в Ломбардии. Выявлена связь между числом смертей в 2019 году ($0.40, p < 10^{-4}$), средним показателем числа смертей за 5 лет ($0.38, p < 10^{-3}$) и уровнем РМ-10. Также существует корреляция между уровнем РМ-10 и процентом больных COVID-19 ($0.41, p < 10^{-4}$). Тем не менее, определение совокупного влияния расстояния от Севезо и присутствия РМ-10, выполненное с использованием теста ANOVA, показало, что расстояние от Севезо сохраняет свою значимость ($t = -15.57, p < 10^{-8}$) в отличие от фактора РМ-10.

Фактор расстояния от Севезо и Бхопала

По нашим расчетам, расстояние от Севезо является определяющим фактором (рис. 3) повышенной летальности COVID-19 в северных областях Италии. Коэффициент корреляции между увеличением смертности (по сравнению с 2019 годом) и расстоянием от Севезо равен $-0.82 (p < 10^{-24})$, в то же время по отношению к среднему показателю за последние 5 лет коэффициент составил $-0.83 (p < 10^{-25})$ (табл. 3). Корреляция между уровнем инфицированности населения (%) и расстоянием от Севезо была еще выше ($-0.88, p < 10^{-32}$). Таким образом, чем ближе к Севезо находились анализируемые области, тем выше был уровень инфицированности населения и смертности, связанной с COVID-19. Аналогичным образом нами выявлена корреляция между расстоянием от Бхопала и количеством зарегистрированных фактов инфицирования ($-0.36, p < 0.05$) и смертей ($-0.52, p < 10^{-2}$) от COVID-19 (табл. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Возможность того, что произошедшие более 40 лет назад техногенные выбросы токсичных газов сыграли определенную роль в увеличении частоты осложненного клинического течения текущей пандемии COVID-19 в пострадавших районах, является интригующей, но в то же время трудно доказуемой гипотезой. В результате обеих аварий произошел выброс двух разных токсичных газов, но оба

Рис. 5. Загрязнение PM-10 в Европе по материалам https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PM10_in_Europe.png

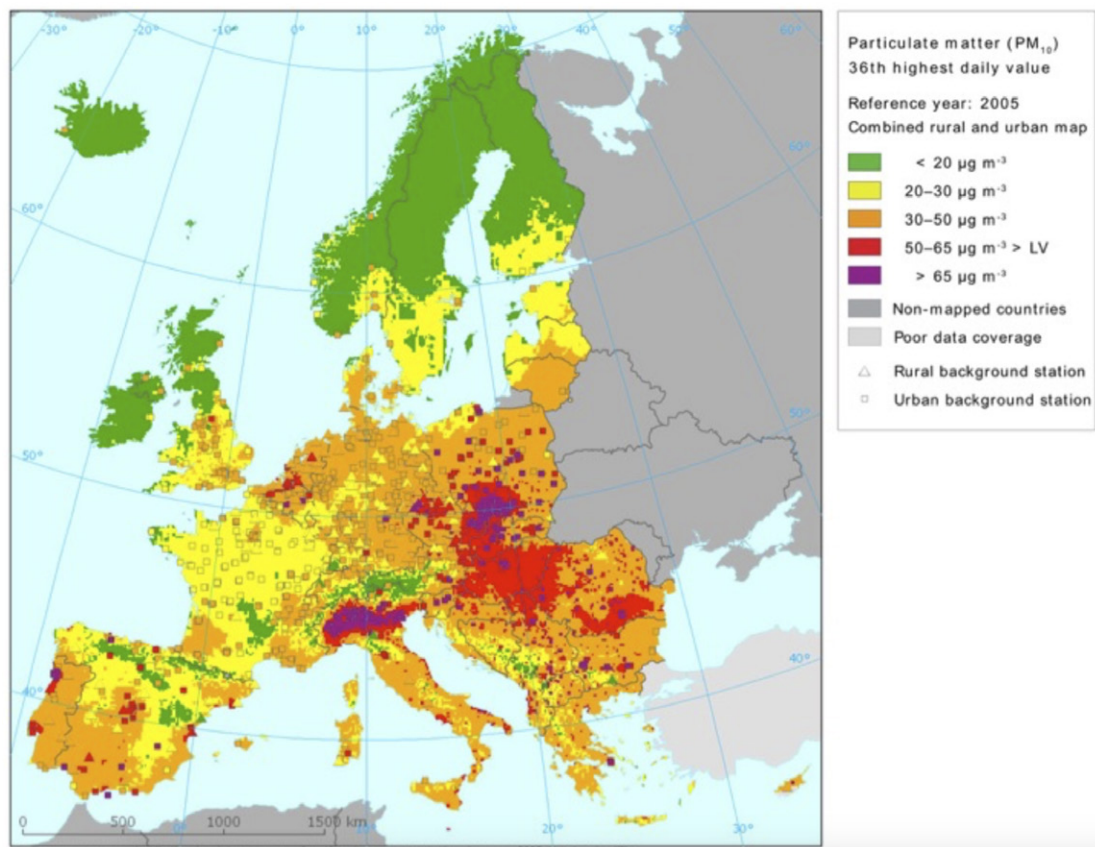


Таблица 3. Выявленные статистически значимые значения факторов, влияющих на уровень заражения и смертности от COVID-19

Страна	Переменная	Функция, %	Ранговая корреляция Спирмена
Италия	Расстояние от Севезо	Изменение смертности за 2019 год Вариация смертности в среднем за 5 лет Заражение	-0.82 ($p < 10^{-24}$) -0.83 ($p < 10^{-25}$) -0.88 ($p < 10^{-32}$)
	Количество дней, в течение которых уровень PM-10 превышает пороговое значение	Изменение смертности за 2019 год Вариация смертности в среднем за 5 лет Заражение	0.40 ($p < 10^{-4}$) 0.38 ($p < 10^{-3}$) 0.41 ($p < 10^{-4}$)
Индия	Расстояние от Бхопала	Смерть из-за COVID-19 Заражение	-0.52 ($p < 10^{-2}$) -0.36 ($p < 0.05$)

газа характеризовались высокой канцерогенностью [7, 11–15, 23, 24]. Повышенный уровень смертности от COVID-19 наблюдался во всех регионах, потенциально подвергнутых воздействию газов, распространяемых ветрами, преимущественными в момент аварии.

Повышенная смертность в первую волну COVID-19 была особенно заметна в Ломбардии, что спустя 2 года все еще нуждается во внятном объяснении. Предположили, что возможной причиной может быть очень высокая вирулентность виру-

са, поразившего Север Италии [1]. Однако разница в уровне смертности остается необъяснимой, даже если предположить, что более легкое течение заболевания, наблюдаемое в южных регионах Италии, было результатом опыта, полученного при лечении пациентов северных областей, который позволил медперсоналу лучше справиться с болезнью на других территориях, где эпидемия началась с некоторой задержкой.

Возможные пагубные последствия загрязнения воздуха микроскопическими взвешенными

частицами PM-10 рассматривают как негативный фактор, который мог способствовать более агрессивному клиническому течению эпидемии COVID-19 из-за их хронического раздражающего воздействия на дыхательную систему [25]. Однако, как мы отмечали выше, этой гипотезе явно противоречит наблюдение об определенно более легком течении COVID-19 у жителей Калифорнии, чем в Нью-Йорке, хотя концентрация PM-10 в западном штате намного выше [26]. Таким образом, повышенный уровень PM-10 не может быть единственным объяснением явления, наблюдаемого в Ломбардии.

Альтернативные гипотезы связывают повышенную смертность от COVID-19 с присутствием в тех или иных районах приезжих из Китая. По данным ISTAT на 1 января 2019 года число китайцев в Милане было выше, чем в Риме, однако в провинциях с наибольшим повышением смертности не наблюдалось повышенного количества приезжих из Китая. Предполагается также, что социальная близость увеличивает вероятность заражения и, как следствие, уровень смертности. Нами достоверно показано, что плотность населения не влияет на увеличение смертности ни по сравнению с 2019 годом, ни по последним 5 годам в среднем. Кроме того, если мы рассмотрим количество заражений, то и в этом случае отсутствует какая-либо существенная корреляция с плотностью населения.

Наше основное предположение состоит в том, что отложенные последствия техногенной катастрофы в Севезо, возможно, в дополнение к негативным последствиям загрязнения воздуха, оказали синергическое действие в Ломбардии, сделав клиническое течение коронавирусной инфекции особенно агрессивным. Эти факторы воздействовали не только путем снижения резистентности дыхательной системы пациентов в Ломбардии к вирусной атаке, обусловленной загрязнением воздуха и, в частности, усиления агрессивного течения вирус-индуцированной аутоиммунной реакции в альвеолах, но и путем хронического повреждения генома популяции в течение последних 45 лет, что также способствует развитию аутоиммунных процессов. В индийском Бхопале уровень смертности от COVID-19 также был выше, чем в остальной части страны, однако эта разница была не столь драматической, как в Ломбардии. Возможно, это связано с тем, что в районе Бхопала концентрация PM-10 в воздухе не столь значительна, как в Паданской равнине, которая является хорошо известным регионом с неблагоприятной экологической обстановкой.

Наши выводы в явной форме подтверждены расчетами с применением ранговой корреляции Спирмена. На первом этапе мы рассмотрели вза-

имосвязь между точным числом случаев смерти в 2020 году по сравнению с предыдущими годами. Рассчитанный коэффициент корреляции между расстоянием от Севезо и увеличением смертности по отношению к 2019 году подтверждает нашу гипотезу ($-0.82, p < 10^{-24}$); еще более очевидным этот показатель становится при сравнении уровня смертности в 2020 году со средним значением за последние пять лет ($-0.83, p < 10^{-25}$). Аналогичным образом мы рассмотрели взаимосвязь между расстоянием от Севезо и уровнем инфицированности населения коронавирусом, в этом случае корреляция еще выше $-0.88 (p < 10^{-32})$.

Для полноты картины мы оценили также потенциальный эффект PM-10, рассчитав корреляцию количества дней с превышением безопасного порога PM-10 со смертностью от COVID-19 в 2019 году. Показано существование зависимости, хотя и намного менее выраженной, чем в случае влияния расстояния от Севезо ($0.40, p < 10^{-4}$). Среднее количество смертей за 5 лет ($0.38, p < 10^{-3}$) и процент инфицированных коронавирусом ($0.41, p < 10^{-4}$) также коррелировали с повышенным уровнем PM-10. Затем с использованием теста ANOVA определили совместный вклад количества дней с уровнем PM-10 выше порогового значения и расстояния от Севезо в смертность от COVID-19. В результате такого анализа выяснилось, что влияние расстояния от Севезо остается статистически значимым, в то время как повышенный уровень PM-10 теряет достоверность.

Для дополнительного подтверждения сформулированной гипотезы мы обратились к аналогичному случаю в Индии и проверили наличие корреляции между расстоянием от Бхопала и зарегистрированным числом инфицированных и умерших от COVID-19 людей. Поскольку открытые популяционные данные об общем числе смертей и уровню PM-10 отсутствовали, нам пришлось полагаться только на общедоступные данные, относящиеся к пандемии COVID-19 в 2020 году. В этом случае мы также выявили статистически значимую ранговую корреляцию Спирмена между расстоянием от Бхопала, процентом инфицированных ($-0.36, p < 0.05$) и умерших от COVID-19 людей ($-0.52, p < 10^{-2}$).

ВЫВОДЫ

Сформулированная в настоящем исследовании гипотеза безусловно требует дополнительного подтверждения, например, путем изучения особенностей генома населения, длительно проживающего на территории Ломбардии, по сравнению с относительно недавно прибывшими индивидами. Это идея особенно актуальна в свете документально зафик-

сированного необъяснимо малого числа иммигрантов среди пациентов с COVID-19, поступивших в отделения интенсивной терапии больниц Ломбардии [27]. В то же время не удалось найти в научной литературе и статистических данных, прямых указаний на повышенную летальность сезонных гриппозных заболеваний в этом регионе до весны 2020.

Техногенная катастрофа и осложненное течение COVID-19 в Ломбардии могут быть связаны с повышенным уровнем сахарного диабета, онкологических и аутоиммунных нарушений. Так, популяционные исследования смертности за 25 лет с момента аварии в 1976, проведенные Консонни и его коллегами, выявили повышенную добавочную смертность от диабета среди женщин во всех зонах заражения, градиентно зависимую от степени поражения территорий [28]. Согласно имеющимся данным, в течение первых 25 лет после техногенной аварии (1976–2001) ни в одной из зон поражения не выявлено увеличения общей смертности от рака. Однако когда анализировали смертность только через 20 или более лет после взрыва, то наблюдали повышение смертности от рака в зоне наиболее сильного поражения [28]. Схожая картина складывается и с аутоиммунными заболеваниями. В зонах поражения выявлена обратная зависимость между уровнем иммуноглобулина и диоксина в плазме крови взрослых пациентов [29]. При этом в другом исследовании обнаружено повышение титров антинуклеарных антител, увеличение отложения иммунных комплексов и уменьшение количества естественных киллеров у пациентов из пораженных районов [30].

Период полураспада диоксина в организме составляет 7–11 лет. Поскольку техногенная катастрофа в Севезо произошла в 1976 году, прямое действие диоксина в настоящее время уже можно не принимать во внимание. Тем не менее, интересно изучить отсроченные эффекты этого вещества

на организм человека. Так как в настоящей работе рассмотрена возможная связь жителей именно этого района с большей летальностью от COVID-19, продолжением этого исследования могло бы быть включение в исследуемую выборку лишь того поколения людей, которые непосредственно пережили данную аварию в 1976 году или переселились в Севезо в течение 7–11 лет, пока не истек период полураспада диоксина. В отдельную группу сравнения можно включить потомков людей, которые пережили аварию и остались проживать на этой территории. Особенно интересно проследить за индивидами, пережившими аварию и их потомками, которые уехали в другие регионы Италии и также перенесли новую коронавирусную инфекцию. К сожалению, на настоящий момент (так как исследование ретроспективное) подобная информация недоступна. Более того, подобная информация не приведена ни в открытых статистических данных, ни в амбулаторных картах пациентов, поэтому требуется значительно больший ресурс для ее систематизации.

Сосредоточив будущие исследования на геномике и протеомике пострадавших пациентов в очагах техногенных катастроф, особенно молодых, у которых наблюдалось тяжелое клиническое течение, можно не только проверить обоснованность нашей гипотезы, но и предсказать генетические детерминанты потенциально худшего прогноза COVID-19. Подобные данные позволят сделать подход к лечению COVID-19 более персонализированным, а также выявить группы риска, которые в первую очередь нуждаются в вакцинации, ревакцинации и защите в терминах ограничения социальных контактов. ●

*Работа выполнена в рамках проекта
Минобрнауки России № 075-15-2021-1049.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Masyagin S., Mazzara M., Succi G., Spallone A., Volpi A. // *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* 2020. V. 27. № 5. P. 21056–21062.
2. Lamberti-Castronuovo A., Parotto E., Della Corte F., Hubloue I., Ragazzoni L., Valente M. // *Front. Public Hlth.* 2022. V. 10. P. 1034196. doi: 10.3389/fpubh.2022.1034196.
3. Carugno M., Consonni D., Bertazzi P.A., Biggeric A., Baccini M. // *Environ. Pollution.* 2017. V. 227. P. 280–286.
4. Pesatori A.C., Consonni D., Rubagotti M., Grillo P., Bertazzi P.A. // *Environ. Hlth.* 2009. V. 8. P. 39. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-39>.
5. De S., Shanmugasundaram D., Singh S., Banerjee N., Soni K.K., Galgalekar R. // *Public Hlth.* 2020. V. 186. P. 20–27. doi: 10.1016/j.puhe.2020.06.043.
6. Varma R., Varma D.R. // *Bull. Sci. Technol. Soc.* 2005. V. 25. № 1. P. 37–45.
7. Homberger E., Reggiani G., Sambeth J., Wipf H.K. // *Ann. Occup. Hyg.* 1979. V. 22. № 4. P. 327–370.
8. Senthilkumar C.S., Malla T.M., Akhter S., Sah N.K., Ganesh N. // *Cien. Saude Colet.* 2020. V. 25 (suppl 2). P. 4225–4230. doi: 10.1590/1413-812320202510.2.28682020.
9. The public health implications of the Bhopal disaster. Report to the Program Development Board, American Public Health Association. Bhopal Working Group // *Am. J. Public Hlth.* 1987. V. 77. № 2. P. 230–236. doi: 10.2105/ajph.77.2.230.
10. Dourson M.L., Kohrman-Vincent M.J., Allen B.C. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2010. V. 58. № 2. P. 181–188. doi: 10.1016/j.yrtph.2010.04.006.
11. Ingrid E. // *Univ. Press (India).* 2005. doi: 10.13140/2.1.3457.5364.
12. Kassie F., Laky B., Nobis E., Kundi M., Knasmüller S.

- // *Mutat. Res.* 2001. V. 490. № 1. P. 1–9. doi: 10.1016/s1383-5718(00)00140-6. Erratum in: *Mutat. Res.* 2001. V. 492. № 1–2. P. 111–113.
13. Kobets T., Smith B.P.C., Williams G.M. // *Foods*. 2022. V. 11. № 18. P. 2828. doi: 10.3390/foods11182828.
14. Eskenazi B., Mocarelli P., Warner M., Needham L., Patterson D.G. Jr, Samuels S., Turner W., Gerthoux P.M., Brambilla P. // *Environ. Hlth Perspect.* 2004. V. 112. № 1. P. 227.
15. Vuong T.P. // *Toxics*. 2022. V. 10. № 7. P. 384. doi: 10.3390/toxics10070384.
16. Monzani D., Vergani L., Pizzoli S.F.M., Marton G., Pravettoni G. // *J. Med. Internet. Res.* 2021. V. 23. № 10. e29820. doi: 10.2196/29820.
17. Mannocci A., Ciarlo I., D'Egidio V., Del Cimmuto A., de Giusti M., Villari P., La Torre G. // *J. Environ. Public Hlth.* 2019. V. 2019. P. 2058467. doi: 10.1155/2019/2058467.
18. Farahani V.J., Altuwayjiri A., Pirhadi M., Verma V., Ruprecht A.A., Diapouli E., Eleftheriadis K., Sioutas C. // *Environ. Sci. Atmos.* 2022. V. 2. № 5. P. 1076–1086. doi: 10.1039/d2ea00043a.
19. Davies S.M., Geppert J., McClellan M., McDonald K.M., Romano P.S., Shojania K.G. Refinement of the HCUP Quality Indicators. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2001 May. Report No.: 01-0035.
20. Dunn O.J. // *J. Amer. Statist. Ass.* 1961. V. 56. № 293. P. 52–64.
21. Rayner J.C.W., Best D.J. // *Australian New Zealand J. Statistics.* 2013. V. 55. № 3. P. 305–319.
22. McKee M., Gugushvili A., Koltai J., Stuckler D. // *Int. J. Hlth Policy Manag.* 2021. V. 10. № 8. P. 511–515. doi: 10.34172/ijhpm.2020.124.
23. Benoit L., Koual M., Tomkiewicz C., Bats A.S., Antignac J.P., Coumoul X., Barouki R., Cano-Sancho G. // *Environ. Int.* 2022. V. 170. P. 107615. doi: 10.1016/j.envint.2022.107615.
24. O'Malley M., Barry T., Verder-Carlos M., Rubin A. // *Am. J. Ind. Med.* 2004. V. 46. № 1. P. 1–15. doi: 10.1002/ajim.20037. PMID: 15202120.
25. Colucci M.E., Veronesi L., Roveda A.M., Marangio E., Sansebastiano G. // *Ig Sanita Publ.* 2006. V. 62. № 3. P. 289–304.
26. Sannigrahi S., Pilla F., Maiti A., Bar S., Bhatt S., Kaparwan A., Zhang Q., Keesstra S., Cerda A. // *Environ. Res.* 2022. V. 210. P. 112818. doi: 10.1016/j.envres.2022.112818.
27. Grasselli G., Zangrillo A., Zanella A., Antonelli M., Cabrini L., Castelli A., Cereda D., Colucello A., Foti G., Fumagalli R., et al. // *Am. J. Med. Assoc.* 2020. V. 323. № 16. P. 1574–1581.
28. Consonni D., Pesatori A.C., Zocchetti C., Sindaco R., D'Oro L.C., Rubagotti M., Bertazzi P.A. // *Am. J. Epidemiol.* 2008. V. 167. № 7. P. 847–858. doi: 10.1093/aje/kwm371.
29. Baccarelli A., Mocarelli P., Patterson D.G. Jr., Bonzini M., Pesatory A.C., Caporaso N., Landi M.T. // *Environ. Hlth Perspect.* 2002. V. 110. № 12. P. 1169–1173.
30. Sweeney M.H., Mocarelli P. // *Food Add. Contam.* 2000. V. 17. P. 303–316.

УДК 578.821

Сравнение эффективности трансэпидермальной и интрадермальной иммунизации мышей вирусом осповакцины

С. Н. Щелкунов*, А. А. Сергеев, К. А. Титова, С. А. Пьянков, Е. В. Старостина, М. Б. Боргоякова, Л. А. Кисакова, Д. Н. Кисаков, Л. И. Карпенко, С. Н. Якубицкий
Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

*E-mail: snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.11.2022

Принята к печати 30.11.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11857

РЕФЕРАТ В 2022 году во многих странах за пределами африканского континента начала распространяться инфекция, вызываемая вирусом оспы обезьян, что с новой силой привлекло внимание медиков и ученых к вопросу о необходимости вакцинации против данной инфекции. Вакцинацию имеющейся в России оспенной вакциной первого поколения на основе штамма LIVP вируса осповакцины (VACV) рекомендовано проводить методом трансэпидермальной инокуляции (скарификации кожи, с/к). Однако многолетний опыт показал, что этот метод не обеспечивает высокой надежности введения вируса в кожу пациентов. Альтернативой методу с/к может быть интрадермальная (внутрикожная, в/к) инъекция вакцины. Эффективность в/к вакцинации может зависеть от места инъекции вируса. В данной работе сравнили развитие гуморального и клеточного иммунных ответов на введение штамма LIVP VACV мышам линии BALB/c в один и тот же район хвоста методами в/к или с/к. В обоих случаях использовали дозу вируса, равную 10^5 БОЕ. Не выявлено статистически значимых различий в динамике и уровне продукции VACV-специфичных IgM и IgG при использовании обоих методов вакцинации. ELISpot-анализ спленоцитов вакцинированных мышей показал, что в/к введение VACV LIVP индуцирует достоверно больший Т-клеточный иммунный ответ, чем с/к инокуляция. Для оценки протективности на 45 день после иммунизации мышей интраназально инфицировали высоколетальными дозами вируса оспы коров (CPXV) или эволюционно далеко отстоящим от VACV и CPXV вирусом экстремелии (ECTV). Оба метода вакцинации обеспечивали полную защиту мышей от заражения CPXV, но в группе в/к иммунизированных мышей, инфицированных ECTV, выжило 50% мышей, а в группе с/к иммунизированных – 17%. Таким образом, в/к инъекция VACV может обеспечивать более надежную иммунную защиту от ортопоксвирусных инфекций по сравнению с классической с/к техникой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ортопоксвирусы, вирус осповакцины, скарификация кожи, внутрикожная инъекция, антитела, Т-клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CPXV – вирус оспы коров; ECTV – вирус экстремелии; VACV – вирус осповакцины; БОЕ – бляшкообразующая единица; в/к – внутрикожно; с/к – скарификация кожи; дни – день после иммунизации; и/н – интраназально; ЛД₅₀ – 50% летальная доза вируса.

ВВЕДЕНИЕ

При массовой вакцинации вирусные препараты обычно вводят либо внутримышечно, либо подкожно, поскольку это наиболее простые в исполнении методы, обеспечивающие точную дозировку вакцины и не требующие высококвалифицированного персонала. Однако ткани организма, в которые при этом доставляются вакцины, относятся к иммунологически бедным и, как правило, не обеспечива-

ют развития длительного напряженного иммунного ответа на вводимый препарат [1–3]. Тем не менее, оспенные вакцины новых поколений (в том числе наиболее изученный штамм MVA) обычно предназначены для внутримышечного или подкожного введения [4, 5].

Кожная иммунизация является привлекательной альтернативой традиционным подкожному и внутримышечному методам введения. Это обусловле-

но тем, что кожа служит не только физическим барьером для проникновения в организм инфекционных агентов, но в ходе эволюции развилась в высокоактивный иммунный орган. Кожа богата различными типами дендритных клеток, и эти профессиональные антигенпредставляющие клетки (antigen presenting cells, APC) способны узнавать, ассимилировать и процессировать антигены. Важно, что дендритные клетки обеспечивают ключевую связь между врожденным и адаптивным иммунными ответами, перемещаясь в лимфатические узлы дренирования кожи и представляя антигены Т- и В-лимфоцитам, индуцируя тем самым развитие патоген-специфичного протективного иммунитета. Более того, эти высокоспециализированные APC обладают большой пластичностью, которая модулируется иммунными сигналами, исходящими от других клеток кожи (включая кератиноциты, фибробласты, меланоциты, тучные клетки и др.), инфицированных вирусом [1–3, 6].

Накожная (transepidermal) иммунизация – исторически первый способ прививки, берет свое начало от вариоляции (variola inoculation). Процедура вариоляции состояла во внесении инфекционного материала от больных оспой в надрезы кожи (skin scarification) здоровых пациентов. Этим же методом Э. Дженнер (E. Jenner) в конце 18-го века предложил прививать людям не инфекционный материал от больных оспой, а содержимое кожных пустул от людей, заразившихся оспой коров. Процедуру называли вакцинацией (vaccine inoculation). Накожную противооспенную вакцинацию осуществляли с помощью скальпеля, ланцета или специальных бифуркационных игл. Этот способ вакцинации, хотя и позволил ликвидировать оспу, но не отличался высокой надежностью доставки в кожу вирусного материала [1]. Более того, такая процедура может сопровождаться размножением в поврежденной коже бактериальной микрофлоры [7].

В 1909 году Ч. Манту (C. Mantoux) [8] предложил способ внутрикожной (intradermal) инъекции с помощью шприца со стандартной иглой. Этот метод стали активно использовать при введении разработанной в 1921 году противотуберкулезной вакцины BCG. Следует отметить, что стандартная техника внутрикожной инъекции спустя столетие используется для введения лишь узкого списка вакцин. Это обусловлено тем, что данный способ инъекции не относится к простым, антиген могут вводить либо слишком глубоко (под кожу), либо происходит вытекание препарата [9], поэтому требуется специальное обучение персонала и опыт таких инъекций.

Эксперименты на животных и клинические испытания на добровольцах последних лет часто

демонстрируют, что внутрикожное введение вакцин обеспечивает более высокий иммунный ответ по сравнению с традиционными внутримышечной или подкожной инъекциями [10–12]. Более того, при внутрикожном введении надежный иммунный ответ можно получить при меньшей вакцинирующей дозе [1, 12], что также важно при необходимости массовой вакцинации и, как следствие, наработке большого числа доз вакцины.

Опубликованы результаты экспериментов, в которых сравнивается эффективность развития иммунного ответа против вируса осповакцины (vaccinia virus, VACV), вводимого лабораторным животным разными способами: внутримышечно, подкожно, внутрикожно, внутривентриально и др. Внутрикожная инъекция VACV часто обеспечивала более выраженный противовирусный иммунный ответ, чем другие методы вакцинации [10, 13]. При этом получаемые результаты зависели от используемых штаммов и доз VACV.

Показано также, что нанесение препарата высокопатогенного для мышей штамма WR VACV на скарифицированную кожу хвоста мышей может приводить к развитию иммунного ответа, превосходящего ответ на внутрикожную инъекцию того же вируса в нижнюю область спины мыши [14]. Известно, что толщина кожи различается на разных участках тела [2], поэтому эффективность внутрикожной вакцинации может зависеть от места инъекции вируса. Все это указывает на необходимость сравнительного изучения влияния способа введения вакцинного штамма вируса в кожу одного и того же участка тела на динамику развития и уровень противовирусного иммунного ответа.

Объектом изучения в нашей работе был штамм LIVP VACV, на основе которого в России создана противооспенная вакцина первого поколения [15]. Целью данной работы было сравнение развития гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию мышей линии BALB/c штаммом LIVP VACV, который вводили в кожу в один и тот же район хвоста методом скарификации (трансэпидермально) или инъекцией с помощью иглы и шприца методом Манту (интрадермально).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Вирусы и культура клеток

В работе использовали клоновый вариант 14 штамма LIVP VACV [16], вирус оспы коров (cowpox virus, CPXV) штамм GRI-90 [17] и вирус экстремелии (ectromelia virus, ECTV) штамм K-1, полученные из коллекции вирусов. Перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартишки CV-1

получена из коллекции клеточных культур ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусы выращивали и титровали на культуре клеток CV-1 как описано ранее [15].

Животные

В исследованиях использовали самок мышей линии BALB/c (возраст 6–7 недель, масса 16–19 г), полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Подопытных животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях. Манипуляции на животных были проведены с одобрения комитета по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 01-04.2021 от 22.04.2021).

Иммунизация мышей

Иммунизацию животных осуществляли методом внутрикожной инъекции (в/к) или скарификации кожи (с/к), используя VACV LIVP в дозе 10^5 БОЕ.

Место для в/к инъекции (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70% этиловым спиртом, иглу 30G (0.3×13 мм), соединенную со шприцем, вводили под небольшим углом, скосом вверх, на глубину примерно 2–3 мм под поверхностный слой эпидермиса. Вирусный материал или физиологический раствор (контрольная группа) в объеме 20 мкл вводили медленно, ожидая расслоения верхних слоев кожи под давлением жидкости, о поступлении которой во внутрикожное пространство свидетельствовало побледнение кожных покровов, распространяющееся в обе стороны от места введения. После введения препарата иглу медленно извлекали, а место инъекции дезинфицировали 70% этиловым спиртом.

Для иммунизации методом с/к место введения (дорсальная сторона хвоста, около 1 см от основания) предварительно обрабатывали 70% этиловым спиртом, после испарения которого делали 10 надрезов кожи иглой 26G (0.45×16 мм), оставаясь в пределах поверхностного слоя эпидермиса. На поврежденный участок кожи немедленно наносили вирусный материал или физиологический раствор в объеме 5 мкл и давали ему впитаться в кожу.

В состав каждой группы входило 36 животных.

Взятие биоматериалов от экспериментальных животных

Через 7, 14, 21 и 28 дней после иммунизации (дпи) мышей вирусом VACV проводили забор проб крови (по 6 животных из каждой группы) из ретроорби-

тального венозного синуса путем его прокалывания иглой 23G (0.6×30 мм). Несмотря на то что взятие пробы крови является кратковременной, но болезненной процедурой, анестезирование животных по согласованию с комитетом по биоэтике не проводили, поскольку ранее было показано, что применение известных методов уменьшения боли влияет на иммунологические показатели крови животных. При заборе крови из ретроорбитального синуса повреждения органа зрения не происходило. После взятия крови животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Селезенки для выделения спленоцитов извлекали в стерильных условиях, используя пинцет и хирургические ножницы, и погружали в транспортировочную среду.

Из индивидуальных образцов крови мышей путем осаждения форменных элементов крови центрифугированием получали препараты сыворотки. Образцы сывороток крови мышей хранили при температуре -20°C .

На 42 дпи проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса мышей (по 12 животных каждой группы) и получали индивидуальные образцы сывороток крови как описано выше.

Оценка уровня протективности у иммунизированных мышей

На 45 дпи группы иммунизированных вирусом и контрольных животных интраназально (и/н) заражали CPXV GRI-90 в дозе 300 ЛД₅₀ (3.2×10^6 БОЕ) (6 животных в каждой группе) или ECTV K-1 в дозе 300 ЛД₅₀ (7.3×10^3 БОЕ) (6 животных в каждой группе). За животными наблюдали в течение 14 суток и регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. Мышей взвешивали каждые 2 суток. Рассчитывали средние арифметические значения массы тела мышей каждой группы на временную точку и выражали в процентах от начального веса. Показатель рассеивания данных относительно среднего значения представлен в виде стандартного отклонения и также выражен в процентах.

Получали данные для групп из 6 животных, иммунизированных (в/к или с/к) VACV LIVP, а также не иммунизированных групп мышей и не инфицированных (отрицательный контроль) или зараженных CPXV GRI-90 или ECTV K-1 (положительный контроль).

Выделение спленоцитов

Спленоциты выделяли путем индивидуального продавливания селезенки через клеточный фильтр (BD Falcon™, США) с использованием поршня шприца. После удаления эритроцитов с помощью

буфера для лизиса эритроцитов (ACK Lysis Buffer, Sigma, США) спленоциты промывали и ресуспендировали в питательной среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 50 мкг/мл гентамицина. Концентрацию клеток определяли на автоматическом счетчике клеток TC20™ (Bio-Rad, США).

Определение количества IFN-γ-продуцирующих клеток с использованием метода ELISpot

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ, с помощью метода IFN-γ ELISpot. Анализ проводили с использованием наборов фирмы R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. По 100 мкл спленоцитов в концентрации 5×10^6 клеток/мл помещали в ячейки планшета. Для каждого образца анализ проводили в повторях. Для стимуляции клеток использовали смесь VACV-специфичных иммунодоминантных для мышей линии BALB/c пептидов SPYAAGYDL, SPGAAGYDL, VGPSNSPTF, KYGRLFNEI, GFIRSLQTI, KYMWCYSQV [18]. Смесь пептидов (100 мкл на ячейку) добавляли в концентрации 20 мкг/мл каждого пептида. Не стимулированные и стимулированные конканавалином А (Con A, 5 мкг/мл) спленоциты использовали как отрицательный и неспецифичный положительный контроли соответственно. После стимуляции в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C с антителами против IFN-γ. Планшеты промывали и добавляли щелочную фосфатазу, конъюгированную со стрептавидином, и субстрат BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate/nitro-blue tetrazolium). Реакцию останавливали, промывая планшеты дистиллированной водой. Количество IFN-γ-продуцирующих клеток подсчитывали с помощью ELISpot-ридера фирмы Carl Zeiss (Германия).

Иммуноферментный анализ сывороток крови

ИФА сывороток крови мышей выполняли как описано ранее [15]. В качестве антигена использовали очищенный препарат VACV LIVP. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG по экспериментальным группам и рассчитывали доверительные интервалы для уровня 95% вероятности совпадения каждой выборки с генеральной совокупностью.

Статистический анализ данных

Полученные данные анализировали с помощью GraphPad Prism 9.0 software (GraphPad Software Inc., США). Различия в иммунных ответах разных

групп оценивали с помощью непараметрического U-теста Манна–Уитни и дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса. Статистический анализ проводили с 95% уровнем значимости. Значение *P* менее 0.05 считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Внутрикожная инъекция VACV LIVP индуцирует у мышей большой Т-клеточный иммунный ответ, чем инокуляция скарификацией кожи

Для оценки динамики развития Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию вирусом LIVP использовали мышей линии BALB/c. Мышам, разделенным на несколько групп (по 6 животных в каждой), вводили VACV LIVP в/к или с/к (хвост, 1 см от основания) в дозе 10⁵ БОЕ/животное. Для проведения ELISpot-анализа спленоцитов извлекали селезенки у каждого из шести животных каждой экспериментальной группы на 7, 14, 21 и 28 дни. В качестве контроля использовали чистых (не иммунизированных) мышей.

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN-γ в ответ на стимуляцию пептидами из состава иммунодоминантных белков VACV [19], с помощью метода IFN-γ ELISpot. Результаты, представленные на *рис. 1*, свидетельствуют о формировании выраженного VACV-специфического Т-клеточного ответа у всех иммунизированных мышей. При этом спленоциты от контрольных животных не продуцировали IFN-γ.

При с/к инокуляции VACV LIVP на 7 дни у мышей индуцировался лишь небольшой уровень VACV-специфического Т-клеточного ответа, который на 14 дни достигал максимума, а на 21 и 28 дни значительно снижался (*рис. 1*).

При в/к инъекции интенсивный Т-клеточный иммунный ответ развивался уже на 7 дни, немного увеличивался к 14 дни и сохранялся на высоком уровне все время наблюдения (до 28 дни).

На 7, 21 и 28 дни уровень Т-клеточного ответа у в/к вакцинированных мышей достоверно превышал такие показатели в группах мышей с/к инокулированных VACV LIVP (*рис. 1*).

Динамика развития гуморального иммунного ответа у мышей на введение VACV LIVP

внутрикожно или скарификацией не различается
На 7, 14, 21, 28 и 42 дни у каждой мыши брали образцы крови из ретроорбитального венозного синуса и получали сыворотки, которые затем анализировали в ИФА, в котором в качестве антигена использовали препарат вирионов VACV LIVP.

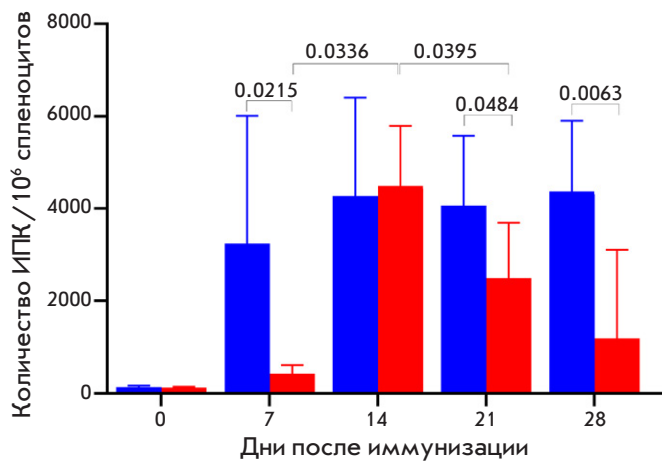


Рис. 1. Оценка Т-клеточного ответа у иммунизированных VACV L1VP мышей BALB/c ($n = 6$ /группа) с помощью анализа IFN- γ ELISpot. Спленциты стимулировали пулом вирус-специфических пептидов в течение 24 ч. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к способ инъекции, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. Данные представлены как среднее геометрическое значение с доверительным интервалом для вероятности 95%. На оси Y представлено количество IFN γ -продуцирующих клеток (ИПК) на 10^6 спленцитов. День 0 – показатель Т-клеточного ответа у неиммунизированных мышей. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения P приведены над горизонтальными скобками

В каждой временной точке анализировали сыворотки от 6 животных каждой группы. Вычисляли средние геометрические значения логарифмов обратного титра VACV-специфических IgM и IgG.

Максимальный уровень VACV-специфических IgM выявляли на 21 дни (рис. 2), в то время как максимум продукции специфических IgG приходился на 28 дни (рис. 3). При в/к инъекции VACV L1VP на 21–42 дни уровень IgM в сыворотках мышей был несколько выше, чем в группах животных, подвергшихся с/к инокуляции этого вируса (рис. 2), но различия не были достоверными.

Не выявлено также достоверных различий в уровнях IgG в сыворотках мышей после в/к или с/к введения VACV L1VP (рис. 3).

Внутрикожная инъекция VACV L1VP обеспечивает более надежную защиту мышей от повторной ортопоксвирусной инфекции по сравнению с иммунизацией методом скарификации

Для выяснения влияния уровня гуморального и клеточного иммунных ответов на вакцинацию мышей VACV L1VP на уровень защиты мышей от повтор-

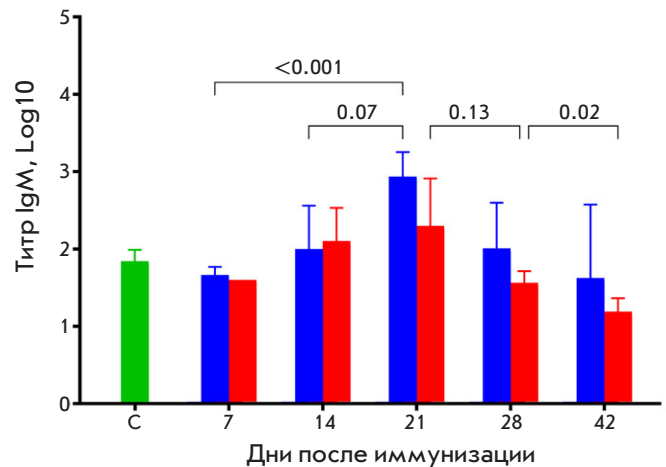


Рис. 2. Концентрация определенных в ИФА VACV-специфических IgM в сыворотках крови мышей, иммунизированных VACV L1VP в дозе 10^5 БОЕ. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к инъекция, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. С – контроль – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор. На диаграмме представлены средние геометрические значения с доверительным интервалом для вероятности 95%. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения P приведены над горизонтальными скобками

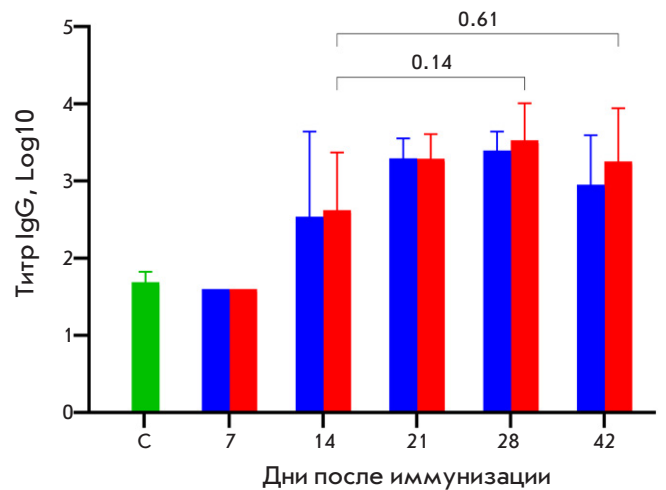


Рис. 3. Концентрация определенных в ИФА VACV-специфических IgG в сыворотках крови мышей, иммунизированных VACV L1VP в дозе 10^5 БОЕ. Столбцы, окрашенные синим цветом, – в/к инъекция, красные столбцы – с/к способ введения VACV L1VP. С – контроль – сыворотки крови мышей, которым вводили физраствор. На диаграмме представлены средние геометрические значения с доверительным интервалом для вероятности 95%. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.0. Значения P приведены над горизонтальными скобками

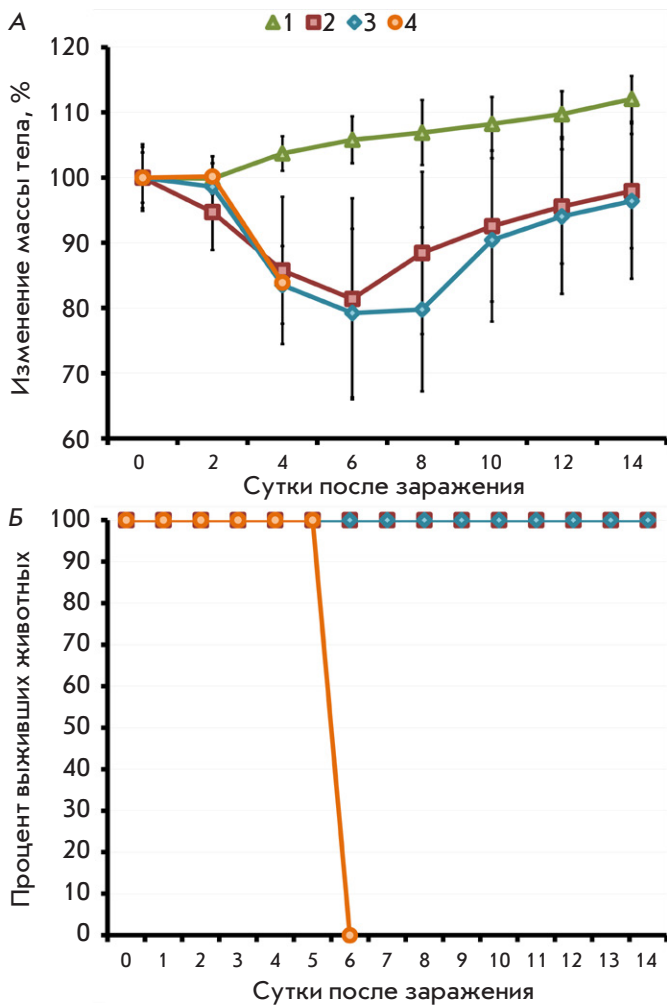


Рис. 4. Динамика изменения массы тела (А) и гибели мышей (Б), иммунизированных вирусом L1VP в дозе 10^5 БОЕ, после интраназального заражения CPXV GRI-90 в дозе 300 ЛД₅₀. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных способами с/к (2) или в/к (3), а также не иммунизированных и не инфицированных (1) или зараженных CPXV GRI-90 (4)

ной летальной ортопоксвирусной инфекции, на 45 день после в/к или с/к введения вируса L1VP мышей и/н заражали летальными дозами CPXV GRI-90 (по 6 животных в группе) или ECTV К-1 (по 6 животных в группе). За мышами наблюдали в течение 14 дней, регистрировали клинические проявления инфекции и гибель. Каждые 2 дня мышей взвешивали для определения динамики изменения массы тела.

После и/н инфекции CPXV в дозе 3.2×10^6 БОЕ (300 ЛД₅₀) у мышей экспериментальных групп с 4 по 8 день наблюдали признаки заболевания и вре-

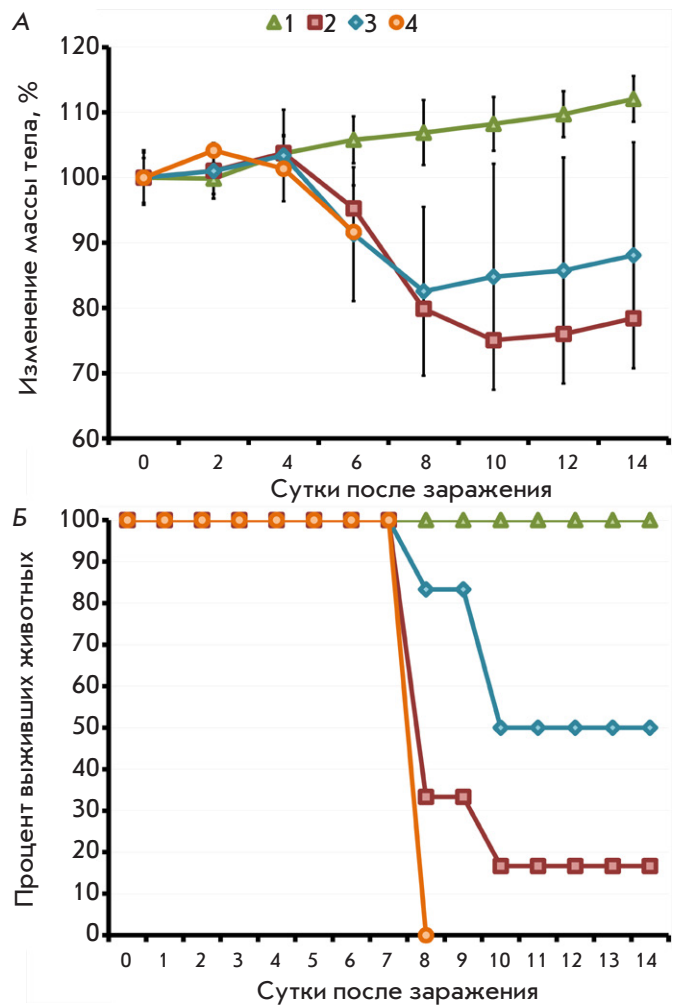


Рис. 5. Динамика изменения массы тела (А) и гибели мышей (Б), иммунизированных вирусом L1VP в дозе 10^5 БОЕ, после и/н заражения ECTV К-1 в дозе 300 ЛД₅₀. Приведены данные для групп из 6 животных, иммунизированных способами с/к (2) или в/к (3), а также не иммунизированных и не инфицированных (1) или зараженных ECTV К-1 (4)

менное снижение массы тела (рис. 4А). Все животные группы положительного контроля погибли к 6 дню, в то время как все мыши экспериментальных групп выздоровели (рис. 4Б).

После и/н инфекции мышей высокопатогенным ECTV в дозе 7.3×10^3 БОЕ (300 ЛД₅₀) в экспериментальных группах с 6 по 10 день наблюдали признаки заболевания и временное снижение массы тела (рис. 5А). Все животные группы положительного контроля погибли к 8 дню. При этом в группе в/к вакцинированных выжило 50% мышей, а в группе с/к вакцинированных – 17% (рис. 5Б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Кожа – обогащенный иммунными клетками орган, содержащий компоненты, которые обеспечивают эффективную индукцию как гуморального, так и клеточного иммунного ответа на инфекцию/вакцинацию [1–3]. При этом существуют два способа кожной вакцинации: исторически первым стал метод трансэпидермальной инокуляции, или скарификации кожи (с/к), и предложенная в начале 20-го века техника внутрикожной инъекции (в/к) [8]. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки.

Метод с/к относительно прост, но при его применении нарушаются кожные покровы, что обуславливает индукцию локальных воспалительных реакций и сложность четкого контроля дозы вводимого препарата. В/к инъекция с помощью иглы и шприца вносит минимальные повреждения в кожу и позволяет точнее вводить вакцину в нужный компартмент кожи и дозировать ее.

Несмотря на долгую историю использования как с/к, так и в/к методов вакцинации, до сих пор не проведено полностью корректного сравнения иммуногенной и протективной эффективности этих двух методов при введении VACV на животных моделях. Такое заключение можно сделать исходя из того, что при сравнении с/к и в/к способов введения VACV в большинстве работ осуществляли в разные области тела лабораторных мышей [19]. Результаты наших предварительных экспериментов показали, что уровень иммунного ответа при в/к инъекции VACV зависит от области тела мыши, куда вводится препарат вируса. Чтобы исключить такое влияние, мы сравнили с/к и в/к техники, используя введение одной и той же дозы VACV в одну и ту же область хвоста мыши.

В качестве объектов исследования использовали мышей линии BALB/c и штамм LIVP VACV. Вирус LIVP в дозе 10^5 БОЕ вводили мышам в/к или с/к в кожу хвоста на расстоянии 1 см от его основания. У шести животных, вакцинированных каждым из двух изучаемых методов, в каждой временной точке (7, 14, 21 и 28 дни) проводили забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали индивидуальные сыворотки для анализа уровня VACV-специфичных антител. После этого у каждого животного извлекали селезенки для выделения спленоцитов и проведения IFN- γ ELISpot-анализа Т-клеточного иммунного ответа. В качестве контроля использовали чистых (не иммунизированных) мышей.

Интенсивность Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных мышей определяли по числу спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ

на стимуляцию пептидами из состава иммунодоминантных белков VACV (рис. 1). При с/к инокуляции VACV LIVP на 7 дни у мышей индуцировался лишь небольшой уровень VACV-специфичного Т-клеточного ответа, который на 14 дни достигал максимума, а на 21 и 28 дни значительно снижался. При в/к инъекции интенсивный Т-клеточный иммунный ответ у мышей развивался уже на 7 дни, сохраняясь на высоком уровне все время наблюдения (до 28 дни). Таким образом, в/к иммунизация VACV LIVP активирует у мышей более выраженный и долговременный Т-клеточный иммунный ответ по сравнению с с/к вакцинацией.

У оставшихся мышей в экспериментальных и контрольных группах (по 12 животных в каждой группе) на 42 дни проводили прижизненный забор проб крови из ретроорбитального венозного синуса и получали образцы сывороток каждой мыши. ИФА всех сывороток иммунизированных мышей показал, что динамика и уровень продукции VACV-специфичных IgM (рис. 2) и IgG (рис. 3) при в/к и с/к методах вакцинации не имели значимых различий. Максимум уровней IgM приходился на 21 дни, а IgG – на 28 дни.

Для оценки протективного иммунитета, развившегося в ответ на в/к или с/к вакцинацию, на 45 дни по шесть мышей каждой группы и/н инфицировали высоколетальными дозами CPXV GRI-90 или ECTV K-1. Оказалось, что оба метода вакцинации обеспечивали полную защиту мышей от заражения CPXV в дозе 300 ЛД_{50} (рис. 4), но при и/н инфекции мышей дозой 300 ЛД_{50} высоковирулентным ECTV, эволюционно относительно далеко отстоящим от VACV и CPXV [20], защита вакцинированных животных была частичной (рис. 5). При этом в группе в/к иммунизированных мышей выжило 50%, а в группе с/к иммунизированных – 17%.

На основании полученных результатов можно заключить, что хотя наибольший вклад в защиту от повторной ортопоксвирусной инфекции вносит гуморальный иммунный ответ [21–23], важное значение имеет и уровень клеточного иммунитета, развившегося в ответ на вакцинацию. Также можно сделать вывод, что в/к инъекция VACV может обеспечить более надежный протективный иммунитет по сравнению с классической с/к техникой.

Полученные нами результаты отличаются от ранее описанных результатов группы T.S. Kupper [14, 19], которые выявили более выраженную иммуногенность и протективность VACV при с/к иммунизации мышей по сравнению с в/к и другими методами введения вируса. В этих работах мышей линии C57BL/6 иммунизировали дефектным по репликации штаммом MVA VACV и оценивали защи-

ту от и/н летальной инфекции нейровирулентным для мышей штаммом WR VACV. При этом при использовании разных способов вирусы вводили в разные части тела мышей.

В нашей работе использовали другую линию мышей BALB/c, а иммунизацию осуществляли реплицирующимся штаммом LIVP VACV. Оценивали протективность иммунизированных мышей от и/н инфекции гетерологичными ортопоксвирусами CPXV и ECTV. В предварительных экспериментах обнаружено, что иммуногенность VACV LIVP значительно отличается при в/к инъекции вируса в разные части тела мышей. Поэтому для корректного сравнения эффективности с/к и в/к техник иммуни-

зации VACV LIVP вводили в один и тот же участок кожи хвоста мышей. По-видимому, именно это стало причиной различий в результатах, полученных нами, и в ранее опубликованных [14, 19].

Наблюдаемое в последние годы развитие современных техник внутрикожного введения вакцинных препаратов [1–3, 24] позволит упростить и повысить надежность этого перспективного подхода к противовирусной иммунизации, особенно при массовой вакцинации. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 19-14-00006-П).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim Y.C., Jarrahan C., Zehrung D., Mitragotri S., Prausnitz M.R. // *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 2012. V. 351. P. 77–112.
- Gamazo C., Pastor Y., Larraneta E., Berzosa M., Irache J.M., Donnelly R.F. // *Ther. Deliv.* 2019. V. 10. P. 63–80.
- Hettinga J., Carlisle R. // *Vaccines.* 2020. V. 8. P. 534.
- Vollmar J., Arndtz N., Eckl K.M., Thomsen T., Petzold B., Mateo L., Schlereth B., Handley A., King L., Hulsemann V., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 2065–2070.
- Jackson L.A., Frey S.E., El Sahly H.M., Mulligan M.J., Winokur P.L., Kotloff K.L., Campbell J.D., Atmar R.L., Graham I., Anderson E.J., et al. // *Vaccine.* 2017. V. 35. P. 1675–1682.
- Lei V., Petty A.J., Atwater A.R., Wolfe S.A., MacLeod A.S. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. 593901.
- Shmeleva E.V., Gomez de Aguero M., Wagner J., Enright A.J., Macpherson A.J., Ferguson B.J., Smith G.L. // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. e1009854.
- Mantoux C. // *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris.* 1909. V. 148. P. 996–998.
- Tarnow K., King N. // *Appl. Nursing Res.* 2004. V. 17. P. 275–282.
- Egunsola O., Clement F., Taplin J., Mastikhina L., Li J.W., Lorenzetti D.L., Dowsett L.E., Noseworthy T. // *JAMA Network Open.* 2021. V. 4. P. e2035693.
- Wilck M.B., Seaman M.S., Baden L.R., Walsh S.R., Grandpre L.E., Devoy C., Giri A., Kleinjan J.A., Noble L.C., Stevenson K.E., et al. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. P. 1361–1370.
- Schnyder J.L., De Pijper C.A., Garcia Garrido H.M., Daams J.G., Goorhuis A., Stijnis C., Schaumburg F., Grobusch M.P. // *Trav. Med. Infect. Dis.* 2020. V. 37. 101868.
- Hughes L.J., Townsend M.B., Gallardo-Romero N., Hutson C.L., Patel N., Dotty J.B., Salzer J.S., Damon I.K., Carroll D.S., Satheshkumar P.S., et al. // *Virology.* 2020. V. 544. P. 55–63.
- Liu L., Zhong Q., Tian T., Dubin K., Athale S.K., Kupper T.S. // *Nat. Med.* 2010. V. 16. P. 224–227.
- Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bauer T.V., Bulichev L.E., Pyankov S.A. // *Viruses.* 2020. V. 12. P. 795.
- Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // *Virology.* 1998. V. 243. P. 432–460.
- Shchelkunov S.N., Sergeev A.A., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A., Kolosova I.V., Starostina E.V., Borgoyakova M.B., Zadorozhny A.M., Kisakov D.N., et al. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 1631.
- Pan Y., Liu L., Tian T., Zhao J., Park C.O., Lofftus S.Y., Stingley C.A., Yan Y., Mei S., Liu X., et al. // *NPJ Vaccines.* 2021. V. 6. P. 1.
- Carrroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., Nakazawa Y., Czerny C.P., Tryland M., Kolodziejek J., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e23086.
- Belyakov I.M., Earl P., Dzutsev A., Kuznetsov V.A., Lemon M., Wyatt L.S., Snyder J.T., Ahlers J.D., Franchini G., Moss B., Berzofsky J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. P. 9458–9463.
- Moss B. // *Immunol. Rev.* 2011. V. 239. P. 8–26. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00975.x
- Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. P. 33–41.
- Lambert P.H., Laurent P.E. // *Vaccine.* 2008. V. 26. P. 3197–3208.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые, приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturae.ru:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте цифрами в квадратных скобках (нумерация в порядке цитирования). Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.