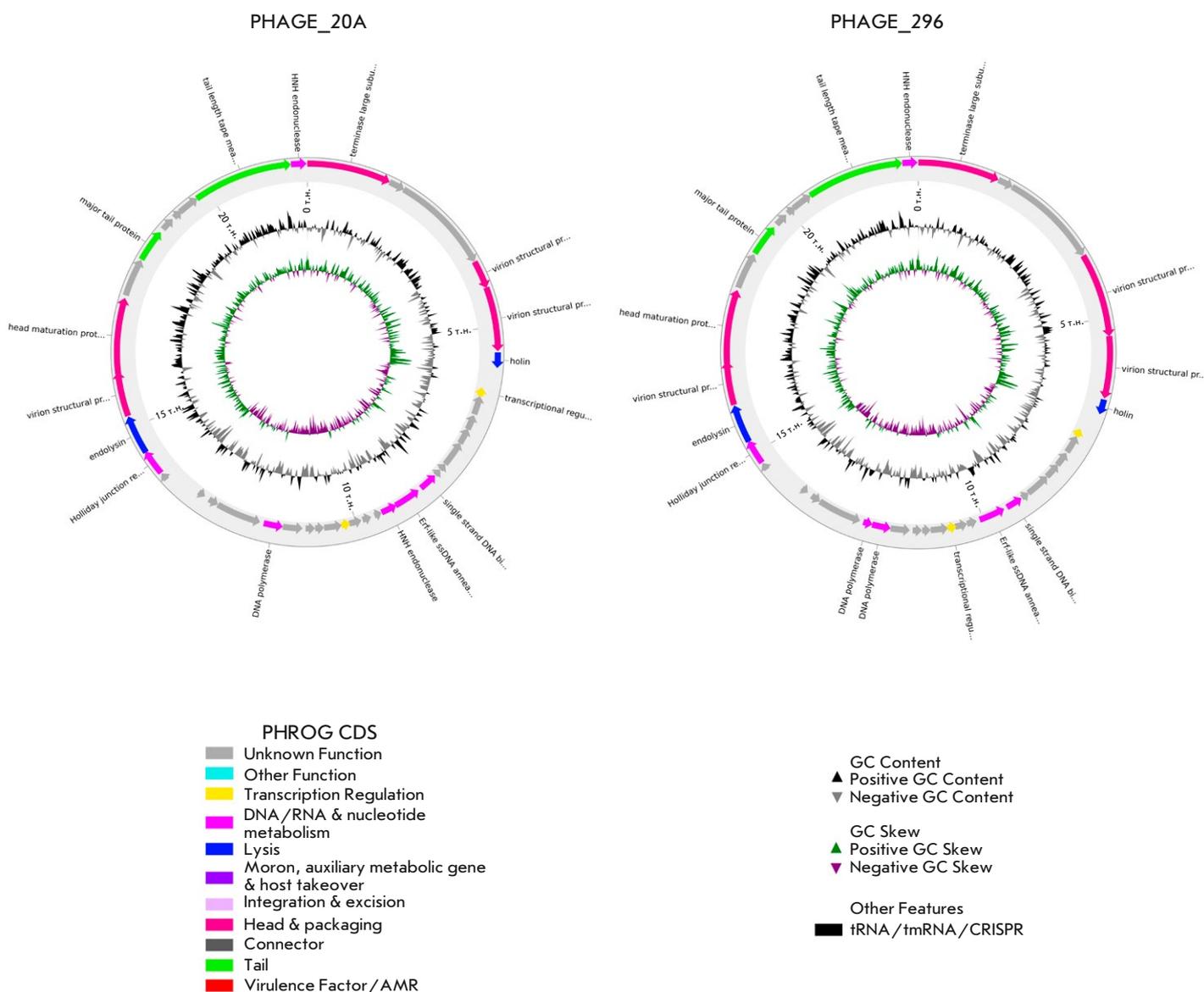


Acta Naturae

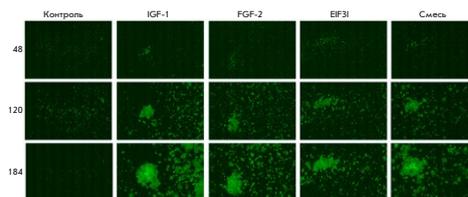
Характеристика генома двух новых фагов *Lactococcus lactis* phage vL_296 и vL_20A



Специфичная активация экспрессии генов факторов роста в линии клеток человека Hcr1293F с помощью технологии CRISPR/Cas9-SAM приводит к повышению их пролиферации

П. А. Бобровский, Е. Н. Графская, Д. Д. Харлампиева, В. А. Манувера, В. Н. Лазарев

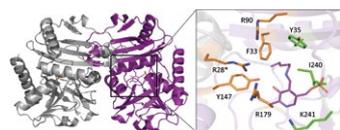
Культивируемые линии клеток человека, широко применяемые в биотехнологии и фармакологии, нуждаются в питательных средах сложного состава, содержащих сигнальные белки – факторы роста. Мы опробовали новый подход, позволяющий снизить зависимость роста культивируемых линий клеток человека от экзогенных ростовых факторов. Этот подход основан на получении модифицированной линии клеток, в которой избирательно активирована экспрессия одного из собственных генов ростовых факторов – IGF-1, FGF-2, EIF3I. Модифицировали линию клеток Hcr1293F, вариант линии клеток HEK293 (клетки эмбриональной почки человека), широко используемый для получения рекомбинантных белков. Экспрессию генов выбранных ростовых факторов в этих клетках активировали с помощью технологии CRISPR/Cas9 с синергичными медиаторами активации – CRISPR/Cas9-SAM, что привело к увеличению экспрессии выбранных генов и продукции целевых белков. Модифицированные линии клеток, культивируемые в стандартных условиях, характеризуются повышенной пролиферацией. При совместном культивировании трех модифицированных линий наблюдается синергичный эффект. На наш взгляд, полученные результаты говорят о перспективности выбранного нами подхода получения модифицированных клеточных линий для использования в биотехнологии.



Сравнение прироста модифицированных клеток, экспрессирующих гены ростовых факторов IGF-1, FGF-2 и EIF3I

Взаимодействие трансаминазы D-аминокислот из *Halicomenobacter hydrossis* с 3-аминоксипропионовой кислотой: спектральный и структурный анализ

А. К. Бакунова, И. О. Матюта, А. Ю. Николаева, К. М. Бойко, А. Р. Хомутов, Е. Ю. Безсуднова, В. О. Попов



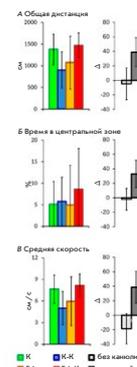
Пространственная структура TA_Halhy

Использование эфиров гидроксилamina, имитирующих строение боковых групп субстратов аминокислот, позволяет получать высокоэффективные и специфические ингибиторы соответствующих ферментов. В настоящей работе этот подход применили к изучению свойств трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Halicomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). Структурный и спектральный анализ комплекса этой трансаминазы с 3-аминоксипропионовой кислотой позволил уточнить особенности организации и функционирования ее активного центра и один из механизмов ингибирования специфическим субстратом D-глутаминовой кислотой.

Имплантация канюли снижает выраженность эффекта бета-амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона в мозге мышей BALB/c

К. А. Мухина, В. А. Митькевич, И. Ю. Попова

Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием, механизмы развития которого остаются малоизученными. Спорадическая форма болезни Альцгеймера моделируется путем введения бета-амилоида (A β) в желудочки мозга животных через предварительно имплантированную канюлю. В работе охарактеризовано влияние хронической имплантации канюли на выраженность эффектов A β на поведенческом, гистологическом и биохимическом уровнях. Показано, что имплантация канюли в мозг значительно искажает параметры окислительного стресса в нервной ткани, широко используемые для оценки развития экспериментальной патологии альцгеймеровского типа.



Анализ поведения экспериментальных животных в тесте «Открытое поле»

Acta Naturae

ТОМ 16, № 3 (62), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 2024
издается с апреля 2009 года

Учредители:

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

Редакционный совет:

Главные редакторы: А.Г. Габибов, 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, 2024

Номер подписан в печать 29 сентября 2024 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,

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



Основатель и председатель
редакционного совета (с 2009 по 2023 г.)
журнала Acta Naturae
академик Григорьев Анатолий Иванович

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

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

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.0 (WOS); 3.5 (Scopus)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Б. Л. Зыбайлов, Г. Ю. Косовский, Г. В. Глазко,
В. И. Глазко, О. И. Скобель

Эволюционные перспективы конвергенции
человеческого и искусственного интеллекта 4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. К. Бакунова, И. О. Матюта, А. Ю. Николаева,
К. М. Бойко, А. Р. Хомутов, Е. Ю. Безсуднова,
В. О. Попов

Взаимодействие трансаминазы D-аминокислот
из *Haliscomenobacter hydrossis*
с 3-аминооксипропионовой кислотой:
спектральный и структурный анализ. 18

П. А. Бобровский, Е. Н. Графская, Д. Д. Харлампиева, В. А. Манувера, В. Н. Лазарев Специфичная активация экспрессии генов факторов роста в линии клеток человека Expi293F с помощью технологии CRISPR/Cas9-SAM приводит к повышению их пролиферации	25	А. А. Попов, В. М. Голышев, Л. С. Королева, К. Д. Назаров, Р. О. Анарбаев, И. О. Петрусева Синтетические повреждения с флуоресцеинкар- бамоильной группировкой как аналоги объемных повреждений, удаляемых системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Сравнительное исследование свойств	74
А. А. Бондарев, А. С. Евпак, А. Л. Новоселов, А. А. Кудряева, А. А. Белогулов Корреляционные закономерности коэкспрессии микроРНК с таргетными мРНК – транскриптами при глиоме у пациентов с диким и мутированным типом генов изоцитратдегидрогеназы.	38	А. А. Стахеев, Р. Р. Кутуков, М. Э. Тальянский, С. К. Завриев Изучение структуры компонентов системы поли(ADP-рибозил)ирования у грибов рода <i>Fusarium</i> и оценка динамики экспрессии ее ключевых генов	83
Н. З. Мирзоева, С. О. Пипия, Ю. А. Мокрушина, М. В. Серебрякова, А. А. Григорьева, С. А. Дубилей, С. С. Терехов, И. В. Смирнов Реконструкция реакции модификации лантибиотика андалусицина лантионинсинтетазой ApcKC в гетерологической системе <i>Escherichia coli</i>	46	П. А. Стрельникова, А. Е. Бугрова, Н. В. Захарова, К. В. Даничкина, М. И. Индейкина, М. С. Гавриш, В. Г. Круть, А. А. Бабаев, А. Ю. Морозова, А. С. Кононихин, В. А. Митькевич, А. А. Макаров, Е. Н. Николаев Особенности фосфорилирования бета-амилоида при болезни Альцгеймера.	93
К. А. Мухина, В. А. Митькевич, И. Ю. Попова Имплантация каниюли снижает выраженность эффекта бета-амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона в мозге мышей BALB/c	51	Т. А. Чуксина, А. А. Фаткулин, Н. П. Сорокина, И. Т. Смыков, Е. В. Кураева, Е. С. Масежная, К. А. Смагина, М. Ю. Шкурников Характеристика генома двух новых фагов <i>Lactococcus lactis</i> phage vL_296 и vL_20A.	102
О. Н. Новикова, Е. С. Матюгина, А. В. Горшенин, Ю. И. Великородная, М. Д. Кренгауз, В. О. Ведерникова, П. В. Спиринов, В. С. Прасолов, С. Н. Кочетков, А. Л. Хандажинская Перефосфорилирование 5'-нораристеромицина: ингибитор S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы в качестве потенциального антилейкозного препарата	60	Правила для авторов	110
Е. А. Петров, Д. М. Малабуйок, Х. Чженг, Ю. А. Мокрушина, В. А. Абрикосова, Ю. Б. Кузьмин, П. В. Царапаев, С. О. Кочкина, И. В. Ельцов, В. Д. Кнорре, И. В. Смирнов, С. С. Терехов, З. З. Мамедли, Н. Е. Кушлинский, Д. В. Рогожин, В. Б. Матвеев, П. В. Кононец, И. С. Стилиди, Х. Чжанг, А. Г. Габиров Представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток в злокачественных эпителиальных опухолях человека.	67		

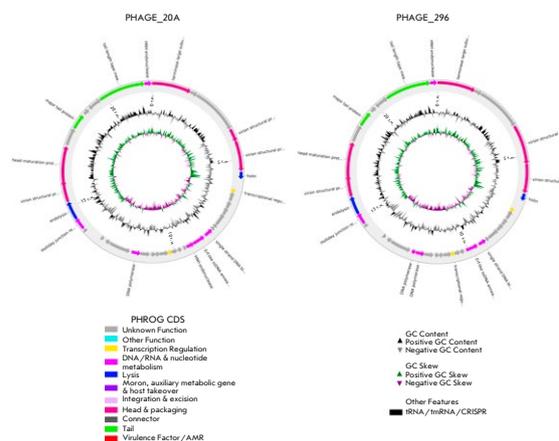


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Чуксиной и др.)

УДК 573.7:004.8

Эволюционные перспективы конвергенции человеческого и искусственного интеллекта

Б. Л. Зыбайлов¹, Г. Ю. Косовский², Г. В. Глазко³, В. И. Глазко², О. И. Скобель^{2*}¹Университет медицинских наук Арканзаса, факультет биохимии и молекулярной биологии, Литл-Рок, Арканзас, 72205 США²Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева, Раменский район, Родники, 140143 Россия³Университет медицинских наук Арканзаса, факультет биомедицинской информатики, Литл-Рок, Арканзас, 72205 США

*E-mail: skobelolga@gmail.com

Поступила в редакцию 21.04.2024

Принята к печати 26.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27406

РЕФЕРАТ В этом аналитическом обзоре мы исследуем потенциальное влияние быстрого распространения инструментов искусственного интеллекта (ИИ) на биосферу и ноосферу, предполагая, что это может привести к трансформационному событию под названием «интеграция человека и ИИ». Утверждается, что эта интеграция может привести к появлению новых форм жизни, ассоциаций и иерархий, что приведет к конкурентным преимуществам и повышению сложности структурной организации как в биосфере, так и в ноосфере. Наша центральная предпосылка подчеркивает важность интеграции человека и ИИ как глобальной адаптивной реакции, имеющей решающее значение для выживания нашей цивилизации в условиях быстро меняющейся окружающей среды. Конвергенция может первоначально проявиться через симбиотические, эндосимбиотические или другие мутуалистические отношения, такие, как одомашнивание, в зависимости от скорости достижения системами ИИ автономии и развития инстинктов выживания, сходных с биологическими организмами. Мы исследуем потенциальные движущие силы этих сценариев, рассматривая этические и экзистенциальные проблемы, возникающие в результате преобразования биосферы и ноосферы под влиянием ИИ, а также потенциальные компромиссы. Кроме того, обсуждаются применение мер сложности и баланс между конкуренцией и сотрудничеством для лучшего понимания и навигации по этим трансформационным сценариям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интеграция человека и искусственного интеллекта, биосфера, ноосфера, искусственный интеллект, эволюция систем, эндосимбиоз, симбиоз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИИ – искусственный интеллект; ИКМ – интерфейс «компьютер-мозг»; НИОКР – научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы особое внимание общественности привлечено к относительно новому понятию – искусственный интеллект (ИИ). В 1992 году создана успешно функционирующая «Российская ассоциация искусственного интеллекта» (РАИИ). Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 8 ноября 2022 г. № 1258-ст утвержден и введен в действие национальный стандарт определения ИИ ГОСТ Р ИСО/МЭК 24668-2022 «Информационные технологии. Искусственный интеллект. Структура управления процессами аналитики больших данных» как идентичный междуна-

родному стандарту ISO/IEC 24668:2022 «Information technology – Artificial intelligence – Process management framework for big data analytics».

Популяризация вопросов, связанных с ИИ, подняла волну споров о неограниченных возможностях и опасностях современного этапа развития его технологий. Хотелось бы обратить внимание на то, что представляет собой ИИ с точки зрения биологов: не более чем относительно новый инструмент адаптации к меняющейся окружающей среде, имеющий свою историю развития, свои этапы, основанные, как и предыдущие, на попытках выявления некоторых естественных закономерностей и их ими-

таций в практической деятельности, в общем, сопоставимый с формированием искусственной среды обитания человека для защиты от неблагоприятных экологических факторов в целях увеличения шансов своего выживания. Это и есть один из этапов «созревания» ноосферы – совокупного разума человека как вида, о котором писал В.И. Вернадский и который так необходим, когда деятельность и численность человека вошли в очевидный конфликт с устойчивостью биосферы [1].

Изобретение любого нового инструмента имеет свои очевидные положительные стороны, но и свои риски. Потенциальные источники таких рисков рассматриваются в настоящем обзоре именно с точки зрения таких эволюционных закономерностей, как увеличение сложности биологических систем, последовательные волны дифференциации и кооперации между ними.

По определению FAO (Food and Agriculture Organization, fao.org) – биотехнологии, биологические системы – это живые организмы и продукты их жизнедеятельности. К последнему, без сомнения, относится и ИИ. Живые организмы, с точки зрения биологов, это системы, имеющие динамичные механизмы контроля энтропии. Предполагаем, что такой подход может быть бесполезен при анализе потенциальных рисков практического применения некоторых элементов ИИ, в том числе и при прямом контакте с человеком в медицинских или иных целях.

МЕТОД

В данной работе анализируются сложившиеся представления о ключевых эволюционных этапах развития современной цивилизации: генезисе техносферы, развитии высокоскоростной связи, стремительном распространении технологий искусственного интеллекта (ИИ) и концептуализации ноосферы как адаптивного механизма, необходимого для выживания человечества в антропоцене – новой геологической эпохе. При подготовке материала использован ChatGPT 3.5/4.0, современная языковая модель искусственного интеллекта, разработанная компанией OpenAI. Модель применяли для подбора, анализа и структурирования литературных источников, касающихся ноосферы, искусственного интеллекта, доместикации, симбиоза и эндосимбиоза. Стоит отметить, что ChatGPT лучше всего работал, когда его применяли к более коротким абзацам и предложениям, но часто испытывал проблемы со структурой и связностью при работе с большими объемами информации. Хотя обзор и оценка современных инструментов ИИ выходят за рамки данной статьи, мы предполагаем, что к моменту ее опубли-

кования будет все труднее отличить среднестатистический обзор/рецензию, написанную экспертом, от обзора, созданного ИИ. Поэтому, по-видимому, необходимо, чтобы журналы и организации достаточно быстро приняли четкую политику по раскрытию информации о том, как использовались инструменты ИИ. Это может внести полезный вклад в исследования в области ИИ, облегчив мониторинг того, как генерируемый ИИ контент распространяется в ноосфере и развивается по качеству и оригинальности.

Концепции Вернадского и де Шардена

Понятия биосферы и ноосферы были сформулированы Владимиром Вернадским, который утверждал, что биосфера функционирует как зона, где космическое излучение преобразуется в различные формы энергии, такие, как электрическая, химическая, механическая и тепловая [1]. Он утверждал, что человек, как и все живые организмы и материя, это неотъемлемый компонент космоса, а не изолированное или случайное природное явление. По мнению Вернадского, человек – это неизбежное проявление природного закона, результата непрерывного процесса, длящегося миллиарды лет. Схожим образом французский философ и священник-иезуит Тейяр де Шарден разработал дополнительное представление о ноосфере как о коллективном сознании, окутывающем Землю [2]. Эта идея перекликается с теориями Вернадского, поскольку подчеркивает значительную роль человеческой мысли и коллективного сознания в формировании биосферы и эволюции Земли. Однако де Шарден предложил телеологический подход, утверждая, что эволюция ноосферы и человеческого сознания направлена к конечному состоянию или конечной цели, которую он назвал «точкой Омега» [2]. Развивая эти основополагающие идеи, современные ученые, такие, как Рэй Курцвейл и Фрэнк Типлер, разработали футуристические и трансгуманистические взгляды на ноосферу и ее потенциальные последствия [3, 4]. Они популяризировали идею о том, что развитие искусственного интеллекта (ИИ) и других передовых технологий может привести к существенным изменениям в человеческом обществе и нашем понимании космоса. Сформулированные концепции имеют геологическое происхождение, подразумевая, что, когда мы определяем «сферу», мы признаем геологическую силу, действующую в глобальном масштабе. В этом контексте важно обсудить эпохи голоцена и антропоцена, поскольку эти периоды дают представление о последствиях становления технологической цивилизации человека на планетарном уровне.

ГОЛОЦЕН И АНТРОПОЦЕН

Эпоха голоцена, начавшаяся примерно 12000 лет назад, характеризуется относительно стабильным климатом, который способствовал развитию цивилизации человека [5]. Антропоцен – предполагаемая, но еще официально не принятая геологическая эпоха – определяется значительным глобальным воздействием деятельности человека на экосистемы и геологические процессы Земли [6, 7]. По имеющимся данным, период с XVII по конец XX века, по-видимому, отвечает критериям начала эпохи антропоцена, поскольку связан с фундаментальными изменениями во взаимоотношениях человека и систем Земли, формированием техносферы [8].

Концепция антропоцена подчеркивает существенное влияние деятельности человека на планету, знаменуя собой переломный момент в отношениях между людьми и биосферой Земли.

В своих основополагающих работах В.И. Вернадский подчеркивал, что экологические кризисы, напрямую связанные с деятельностью человека, неоднократно происходили на протяжении всей истории человечества. До недавнего времени практически нетронутые природные экосистемы составляли около 12% поверхности Земли. Однако в наше время они занимают всего 1.4% [9]. Современные исследования утверждают, что массовое вымирание мегафауны (видов животных, масса которых превышает 10 кг) в четвертичный период кайнозойской эры связано с деятельностью человека – основной движущей силой глобального сокращения численности мегафауны в конце четвертичного периода [10]. Конфронтация с природными экосистемами началась примерно 1.5–3 миллиона лет назад, когда человек впервые освоил огонь. Сегодня разрушение природных экосистем, особенно лесных, усугубляемое экономической глобализацией, стало ведущим фактором глобальных экологических изменений [11].

Техносфера и экология

Техносфера объединяет все созданные человеком технологии и их воздействие на окружающую среду. По мере развития техносферы происходит усложнение технологий и их интеграции в жизнь человека [12]. Основные этапы развития техносферы связаны с изобретением простых орудий труда, с промышленной революцией [13] и появлением информационных технологий [14]. Следовательно, техносфера все больше переплетается с биосферой и ноосферой, оказывая влияние на развитие человечества и окружающей среды.

Вернадский утверждал, что развитие биосферы, формирование аграрной цивилизации возникли

как результат эволюции [15]. С появлением центров аграрной цивилизации человек постепенно стал доминирующим геологическим агентом в перестройке планеты. Вернадский утверждал, что сохранение биосферы, включающей человека как вид, зависит от формирования ноосферы, которая в первую очередь выполняет функцию регулирования стабильности биосферы. Эта трансформация считается правдоподобным следствием естественной эволюции, поскольку, как заметил Вернадский, «биосфера перешла или, вернее, переходит в новое эволюционное состояние – в ноосферу – перерабатывается научной мыслью социального человека».

Многочисленные современные данные свидетельствуют о значимости развития ноосферы и ее последующей трансформации в качестве ответной реакции на различные надвигающиеся кризисы. Продовольственная безопасность приобретает все большее значение в связи с ростом численности населения планеты, расширением урбанизации и продолжающимся влиянием на изменения климата. В настоящее время около 9% населения планеты недоедает и, по прогнозам, к 2030 году эта цифра увеличится до 9.8%. К этому времени более 850 млн человек будут испытывать голод [16]. Более того, сельскохозяйственная деятельность и аграрная цивилизация достигли порога экстенсивного развития, занимая 38% поверхности Земли, используя около 70% мировых запасов пресной воды и 1.2% мировой энергии [17].

В последнее время динамика и атрибуты развития аграрной цивилизации стали особенно заметны. Яркой иллюстрацией являются данные о колебаниях биомассы мегафауны после последнего крупного вымирания на Земле, которое привело к гибели двух третей родов млекопитающих и половины видов между 50 и 3 тысячами лет назад [18]. После этой катастрофы глобальная экосистема постепенно восстановилась до нынешнего состояния, а скорость накопления биомассы значительно возросла по сравнению с исходным уровнем до индустриальной революции, в основном, за счет сельскохозяйственных видов животных. После повсеместного сокращения биомассы мегафауны увеличение темпов роста наблюдалось только у *Homo sapiens*.

Превосходство человека и сохранение биосферы

В составе мегафауны фактически наблюдается постепенное преобладание человека и сельскохозяйственных видов животных, обусловленное вытеснением диких видов. Человечество последовательно одомашнивает широкий спектр видов, охватывающих все царства и классы, от грибов до человека,

адаптируя их к изменениям окружающей среды. Этот процесс влечет за собой включение почти всех биосферных элементов в нишу человека, используя виды, поддающиеся одомашниванию, и вытесняя другие. Исторические наблюдения показывают, что такое развитие событий повышает риск ускоренной деградации биосферы, потенциально угрожающей существованию человека. Как следствие, утверждение В.И. Вернадского о том, что выживание биосферы зависит от естественной трансформации человеческой деятельности в ноосферу, находит современное подтверждение. Очень важно исследовать сложные, развивающиеся взаимосвязи между биосферой, техносферой и ноосферой, а также их последствия для будущего человечества. В рамках этих взаимосвязей интеграция технологий, в частности, искусственного интеллекта, в деятельность человека предстает как жизненно важный аспект непрерывного развития ноосферы, приводя к параллелям с эндосимбиозом [19] и одомашниванием [20].

Биосфера, техносфера, ноосфера: отдельные области с взаимосвязанной эволюцией

В данном исследовании мы предполагаем, что техносфера, включающая в себя все созданные человеком технологии и их воздействие на окружающую среду, развивается параллельно с биосферой и ноосферой – областями жизни и познания человека соответственно. Ноосфера, формируемая мышлением и коллективным сознанием человечества, в настоящее время опирается на техносферу для коммуникаций, обмена информацией и инноваций по всему миру. И наоборот, техносфера зависит от ноосферы в своем развитии, поскольку человеческие идеи и знания подпитывают технологический прогресс. Несмотря на их взаимосвязь, необходимо рассматривать ноосферу и техносферу как отдельные области в силу их уникальных характеристик и путей эволюции: ноосфера в первую очередь движима интеллектуальным и культурным прогрессом, в то время как техносфера формируется под влиянием материальных и технологических инноваций.

Они взаимосвязаны, но проходят различные этапы развития, такие, как промышленная революция, зарождение научного знания и появление искусственного интеллекта. Изучая их эволюцию, мы можем выявить сходства и различия, что позволяет понять потенциальное взаимодействие человека и технологий, особенно ИИ. Поддерживаемый многими учеными анализ сложности как количественного фактора [12, 14, 21], позволяет глубже понять взаимосвязи между

биосферой, техносферой и ноосферой и их последствия для будущего человечества.

СЛОЖНОСТЬ КАК КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ ПРИЗНАК СЛОЖНЫХ СЕТЕЙ

Интуитивно понятно, что эволюция биосферы характеризуется возрастающей сложностью, о чем свидетельствует появление многоклеточных организмов, сложных экосистем с ключевыми видами и высоко адаптивного поведения в ответ на изменения окружающей среды [21]. Аналогичным образом, техносфера переживает постепенный рост сложности: инновации развиваются друг за другом и приводят к появлению сложных сетей связи, транспорта и производства, а также к уязвимости инфраструктуры [12, 14]. Эволюция ноосферы также может быть проиллюстрирована усложнением сетей соавторства в научных исследованиях, которые со временем становятся все более изощренными из-за таких факторов, как междисциплинарные исследования, расширение научных областей и глобализация [22, 23].

Размах изменения сложности

Очень важным является признание роли энергетических градиентов в усложнении, поскольку оно предполагает существование управляющего закона, пронизывающего Вселенную, биосферу, техносферу и ноосферу. Этот закон опирается на второй закон термодинамики, концепции диссипативных структур и производства энтропии. Изучив эти фундаментальные принципы, можно получить представление о возникновении сложности в различных системах и изучить потенциальные последствия для будущего человеческой цивилизации и технологического развития. Тенденцию к спонтанным структурным усложнениям можно наблюдать на различных примерах, таких, как образование звезды из облака межзвездного газа, появление многоклеточных организмов и возникновение человеческих сообществ.

Образование звезды иллюстрирует, как более высокие темпы производства энтропии приводят к эволюции, к более сложным структурам, чтобы оптимизировать их экспорт энтропии [24, 25]. Крупные трансформационные события в биосфере, техносфере и ноосфере, такие, как развитие сложных экосистем и рост структурированности человеческих сообществ, также отражают непрерывное увеличение диапазона сложности, связанное с производством энтропии и вторым законом термодинамики [26, 27].

Рассматривая изменяющийся диапазон сложности как ключевой фактор эволюции сложных систем, мы получаем более глубокое понимание движущих сил, стоящих за растущей сложностью

и взаимосвязанностью, наблюдаемой в различных областях. Хотя общий рост сложности более крупной структуры может быть не сразу заметен после трансформационного события, возникают новые субструктуры с более высокой индивидуальной сложностью, что потенциально повышает их пригодность.

Подобная концепция позволяет лучше понять потенциальные траектории развития человечества и технологий, особенно в сфере искусственного интеллекта, и изучить возможности симбиоза, интеграции и коэволюции между ними.

Количественная оценка сложности

С целью эффективного сравнения эволюции сложности в биосфере, техносфере и ноосфере необходимо использовать подходящие показатели сложности в дополнение к размаху ее изменчивости, который количественно определяет сложность внутри подструктур. Одним из прямых подходов к количественному определению сложности является использование теории информации, рассматривающей энтропию информации, содержащейся в системе [28]. Альтернативные подходы включают фрактальную геометрию или алгоритмическую сложность, которые могут обеспечить комплексное понимание различных аспектов сложности.

Например, в техносфере применение сетевого анализа для изучения взаимосвязанности и информационных потоков в коммуникационных и транспортных системах позволяет количественно оценить их сложность на основе таких показателей, как распределение степеней узлов, коэффициент кластеризации и длина пути, отражая уровень организованности и устойчивости этих систем [23]. В качестве примера можно привести эволюцию Интернета от его ранних стадий до нынешнего высоко интегрированного состояния, которое раскрывается через рост сложности его сети. На начальных этапах Интернет характеризовался относительно простой, разреженной сетью, в то время как впоследствии он превратился в огромную, запутанную сеть соединений с безмасштабной топологией [23]. Применяя такие меры сложности, можно оценить развитие и зрелость техносферы, а также провести относительно обоснованное сравнение с динамикой, наблюдаемой в биосфере и ноосфере.

В биосфере меры сложности экосистем, такие, как индексы видового богатства и разнообразия, могут быть использованы для понимания структуры и иерархии экологических отношений и влияния возмущений на эти системы. В ноосфере метрики, связанные с производством и распространением знаний, такие, как сети цитирования и междисциплинарность, могут использоваться для оценки ро-

ста человеческого познания и его влияния на развитие техносферы и социума.

ЭНДОСИМБИОЗ: ФАЗОВЫЙ ПЕРЕХОД БИОСФЕРЫ НА БОЛЕЕ ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ СЛОЖНОСТИ

Эндосимбиоз, важнейшее событие в эволюции жизни, привел к появлению эукариотических клеток в результате интеграции прокариотических организмов. Чтобы проанализировать структуру этого процесса, мы можем сравнить индивидуальную сложность бактерий и эукариотических клеток, а также общую сложность биосферы до и после появления эукариот. На клеточном уровне эукариотические клетки демонстрируют большую сложность, чем их прокариотические собратья, о чем свидетельствует наличие органелл, таких, как ядро, митохондрии и хлоропласты, которые, как считается, возникли в результате эндосимбиотических событий [29]. Измеряя информационное содержание или функциональную организацию этих клеток с помощью теории информации, можно количественно оценить повышенную сложность, возникающую в результате эндосимбиоза.

Появление эукариот способствовало общему усложнению биосферы, создавая новые экологические ниши для колонизации и диверсификации жизни. Это привело к появлению многоклеточных организмов, сложных экосистем и многообразных трофических связей. Однако усложнение жизни на Земле сопровождалось значительным компромиссом: вымиранием множества видов, поскольку новые формы жизни конкурировали или вытесняли своих предшественников.

Эта динамика похожа на «кислородную катастрофу» (Great Oxygenation Event), которая привела к массовому вымиранию анаэробных организмов, поскольку доминирующими стали «фотосинтезаторы», такие, как цианобактерии, вырабатывающие кислород (новая «технология») [30]. Аналогичным образом промышленная деятельность человека изменила атмосферу Земли, высвободив беспрецедентное количество углекислого газа за очень короткий (с геологической точки зрения) промежуток времени.

Проводя параллель с потенциальным событием конвергенции человека и технологий, мы наблюдаем ту же динамику, когда включение в деятельность человека передовых технологий, таких, как ИИ, способно привести к значительному увеличению общей сложности. Эта конвергенция может не только создать новые общественные структуры и коренным образом изменить человеческое познание, но и стать новым геологическим фактором, сродни фотосинтезу и промышленной деятельности человека.

РЕВОЛЮЦИЯ ИИ: ПЕРЕСТРОЙКА ТЕХНОСФЕРЫ И НЕ ТОЛЬКО

Искусственный интеллект представляет собой трансформационный процесс, способный перевести техносферу в фазу повышенной сложности. По мере того как системы ИИ продолжают развиваться и все глубже интегрироваться в различные аспекты жизнедеятельности человеческого общества, они готовы изменить ландшафт технологий и их влияний на мир. Ожидается, что этот беспрецедентный сдвиг в сложности повлияет не только на отдельные технологии, но и на более широкое взаимодействие между биосферой, ноосферой и техносферой. Растущая сложность систем ИИ, а также их растущие возможности, вероятно, приведут к пересмотру границ и способов взаимодействия между этими сферами, что, в конечном итоге, изменит способ сосуществования и эволюции человека, технологий и окружающей среды. В следующих разделах мы рассмотрим современные тенденции и методологии развития ИИ, изучим их потенциальные последствия для будущего техносферы и не только.

В последние годы область искусственного интеллекта переживает значительный прогресс, обусловленный прорывами в технологиях машинного (machine learning, ML) и глубокого (deep learning, DL) обучения, доступностью масштабных наборов данных и увеличением вычислительной мощности машин.

ИНТЕРФЕЙС «МОЗГ-КОМПЬЮТЕР»: ПРОКЛАДЫВАЯ ПУТЬ К ТЕХНОЛОГИЧЕСКОМУ ЭНДОСИМБИОЗУ С ИИ

Представления об эндосимбиозе дают ценные идеи для развития интерфейсов «мозг-компьютер» (ИМК) (brain-computer interfaces, BCI) и нейроно-кремниевых интерфейсов, устанавливающих прямую связь между человеческим мозгом и электронными устройствами. По аналогии с эндосимбиозом, BCI и нейроно-кремниевые интерфейсы предполагают потенциальное слияние биологических и технологических компонентов, что в итоге приводит к созданию более совершенной и интегрированной системы [19, 31].

Эндосимбиоз – биологический процесс, при котором один организм встраивается в другой, образуя в итоге единое более сложное целое. Убедительным примером является встраивание митохондрий и хлоропластов в клетки-хозяина, что можно рассматривать как форму биологической «технологии», повышающей выживаемость и расширяющей функциональные возможности клетки-хозяина. Митохондрии предоставляют клетке-хозяину эффективное производство энергии, а хлоропласты обеспечивают фотосинтез, позволяя клетке полу-

чать энергию из солнечного света [29]. В том же контексте можно рассматривать организацию ядра и хроматина. Клетка-хозяин, в свою очередь, обеспечивает органеллам защиту и источник питания.

В настоящее время предпочтительной является теория, согласно которой ядро имеет архейное происхождение, а эукариоты возникли в результате симбиотической ассоциации между архейным хозяином и бактериальными эндосимбионтами [32, 33]. Эта точка зрения подтверждается недавними открытиями сложных архей, известных как архей Асгарда, имеющих множество общих генов с эукариотами и считающиеся ближайшими известными родственниками эукариотических клеток [33]. Однако важно отметить, что точный процесс эукариогенеза и происхождение ядра остаются предметом постоянных исследований и споров. Например, согласно некоторым теориям, ядро возникло в результате поглощения клеткой-хозяином ДНК-поглощающего вирусоподобного организма, что способствовало усложнению и расширению возможностей эукариотических клеток [34, 35]. Ядро служит центром управления, организуя экспрессию генов и репликацию ДНК, а сложная организация хроматина обеспечивает надлежащую регуляцию генетической информации. Эти биологические компоненты действуют как сложные «технологии», которые улучшают клеточные функции и вносят вклад в общую сложность организма.

Понимание последовательного усложнения в процессе формирования эукариотической клетки не может не влиять на представления о сфере нейроинтерфейсов. Стремясь к прямой связи между человеческим мозгом и электронными устройствами, как интерфейс «компьютер-мозг» (ИКМ), так и нейроно-кремниевые интерфейсы воплощают в себе потенциальное слияние биологических и технологических элементов. Опираясь на аналогию с эндосимбиозом, можно лучше понять, как эти технологии могут привести к появлению более сложных и интегрированных систем [31] подобно тому, как приобретение митохондрий, хлоропластов и ядра привело к усложнению и расширению возможностей эукариотических клеток.

В последние годы исследования в области ИКМ значительно продвинулись вперед, и многочисленные исследования продемонстрировали потенциал ИКМ для улучшения когнитивных и сенсорных способностей человека [36]. Например, ИКМ использовали для восстановления двигательных функций у парализованных людей [37], улучшения коммуникации пациентов с синдромом запертого человека [38] и даже для управления такими внешними устройствами, как роботизированные конечности

или компьютерные курсоры с участием только мозговой активности [39, 40]. Эти достижения подчеркивают потенциал ИКМ, способный изменить наше понимание человеческого познания и произвести революцию в области нейронаук.

Одно из перспективных применений ИКМ – лечение деменции и психических заболеваний. Недавние исследования показали, что ИКМ можно использовать для мониторинга и регулирования активности мозга у людей с неврологическими расстройствами, такими, как болезнь Альцгеймера [41] и депрессивное расстройство [42]. Нацеливаясь на определенные области мозга и модулируя их активность, ИКМ могут предложить новый, неинвазивный терапевтический подход к лечению этих заболеваний, способный уменьшить снижение когнитивных способностей и улучшить качество жизни пациентов.

ИКМ перспективны для лечения аутизма и нарушений развития. Показано, что ИКМ могут помочь людям с аутизмом развить навыки общения и улучшить их способность взаимодействовать с окружающим миром [43]. ИКМ можно также использовать для улучшения когнитивных функций у детей с такими нарушениями развития, как синдром гиперактивности с дефицитом внимания (СДВГ), путем проведения нейрофидбэк-тренировок [44]. В этих сценариях ИИ может сыграть решающую роль в содействии терапии на основе ИКМ, обрабатывая и интерпретируя огромные объемы нейронных данных, выявляя закономерности, связанные с конкретными расстройствами, и предоставляя персонализированные меры воздействия, адаптированные к уникальной мозговой активности каждого человека [45].

ДОМСТИКАЦИЯ И ВОЗНИКНОВЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЦИВИЛИЗАЦИИ: ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЙ ПРОЦЕСС

На уровне межвидового взаимодействия ключевым событием, превратившим человека в геологическую силу, кульминацией которого стала современная эпоха антропоцена, стало одомашнивание растений и животных. Этот процесс создал, по сути, симбиотические отношения между одомашниваемыми видами и человеком. Развитие человеческой цивилизации в значительной степени связано с процессом одомашнивания, который подразумевает селективное разведение и культивирование различных видов растений и животных для удовлетворения интересов человека [46]. Одомашнивание способствовало зарождению сельского хозяйства и оказало существенное влияние на сложную структуру человеческих обществ [47]. Понимание различных аспектов

одомашнивания может служить ценным источником возможных этапов интеграции между человеком, как видом, и искусственным интеллектом, как технологией, которую они создают.

Эксперименты по одомашниванию: исследование диких родственников одомашнированных видов

Для лучшего понимания процесса одомашнивания проводили эксперименты на диких родственниках одомашнированных видов. Например, знаменитый эксперимент «Лисья ферма» в России включал целенаправленный отбор серебристых лисиц (*Vulpes vulpes*) на дружелюбное поведение [48]. На протяжении нескольких поколений эти лисы демонстрировали не только снижение агрессивности, но и такие морфологические изменения, как височные уши и завитые хвосты, схожие с наблюдаемыми у домашних собак. Подобные эксперименты помогают не только раскрыть генетические и фенотипические изменения, происходящие в процессе одомашнивания, но и понять, как этот процесс повлиял на развитие человеческой цивилизации.

Степени одомашнивания: количественные параметры и сравнения

Одомашнивание представлено спектром различных видов с разной степенью одомашнивания. Количественные параметры, используемые для сравнения уровней одомашнивания разных видов, включают поведенческие особенности, такие, как дружелюбное поведение и социальная активность, морфологические характеристики, такие, как изменчивость размеров тела или цвета шерсти [49]. Изучая эти параметры, можно лучше понять генетические и экологические факторы, способствующие одомашниванию, и изучить, как различные виды были включены в нишу человека.

АДАПТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ЗАКОНЫ ДЛЯ СИСТЕМ ИИ В ПРОЦЕССЕ ИНТЕГРАЦИИ

Системы ИИ могут адаптироваться в процессе интеграции, отдавая приоритет благополучию, этике и интерпретируемости, улучшая сотрудничество и прозрачность [50, 51]. Реальным примером постоянной адаптации ИИ к потребностям человека является его использование в здравоохранении, в частности, в диагностике и лечении заболеваний. Один из таких примеров – разработка IBM Watson for Oncology, системы ИИ, предназначенной для помощи врачам в принятии решений о лечении онкологических больных. IBM Watson for Oncology сочетает в себе обработку языка, машинное обучение и экспертные знания для анализа больших

объемов медицинской литературы, данных о пациентах и клинических исследований. Система генерирует персонализированные рекомендации по лечению пациентов на основе их конкретных клинических профилей, учитывая такие факторы, как возраст, история болезни и генетическая информация [52]. IBM Watson for Oncology прошла несколько итераций, чтобы адаптироваться к потребностям медицинских работников и пациентов. Система протестирована и проверена в различных клинических условиях. Показано, что в большинстве случаев она может давать рекомендации по лечению, совпадающие с мнением экспертов [52, 53]. Этот пример демонстрирует потенциал адаптации систем ИИ к потребностям человека, в данном случае для решения задач персонализированной медицины и принятия решений при лечении рака. Постоянно обучаясь на основе экспертных знаний и реальных данных, системы ИИ, подобные IBM Watson for Oncology, могут развиваться, чтобы лучше соответствовать ценностям и ожиданиям медицинских работников и пациентов. Дальнейшее сравнение адаптации ИИ с биологической эволюцией дает полезные знания для будущих разработок и инноваций.

Адаптация ИИ и биологическая эволюция

Биологические объекты эволюционируют благодаря естественному отбору [54], а системы ИИ используют такие механизмы, как обучение с подкреплением и генетические алгоритмы [55]. Достижения в области ИИ, такие, как глубокое обучение и трансферное обучение, еще больше расширили возможности адаптации. Направленная эволюция в ИИ предполагает намеренное манипулирование параметрами, имитирующее искусственный отбор [56]. Такой подход позволяет быстрее и целенаправленнее адаптировать ИИ и лучше согласовывать его с потребностями человека. Новые области исследований, такие, как нейроэволюция, могут дать новое понимание эволюционирующих архитектур ИИ [57, 58]. Кроме того, подобно биологическим существам, системы ИИ могут «размножаться», генерируя новые экземпляры с объединенными параметрами [59, 60]. Они также могут «спариваться», обмениваясь и создавая новые комбинации параметров, что ускоряет адаптацию к сложной среде [51].

Переход от дифференциации к кооперации

Адаптация как условие выживания выходит за рамки отдельных организмов – от генов и клеток до экосистем и социальных структур [26, 61]. Одним из универсальных принципов эволюции сложных систем является скачок от дифференциации

к кооперации, реализуемый на разных уровнях иерархии. Ярким примером последнего служат события, лежащие в основе формирования аграрной цивилизации, описанные в работах А.В. Чаянова. Главный тезис А.В. Чаянова заключался в том, что дифференциация отдельных компонентов сельского хозяйства с последующей их кооперацией при возникновении новых организационных структур является основой экономического, технического и социального развития общества. Наблюдая за эволюцией крестьянских хозяйств переселенцев с юга России на Дальний Восток, А.В. Чаянов отмечал, как найденные в новых условиях усовершенствования в кооперативном производстве быстро распространяются среди них и как исчезают те хозяйства, кто по тем или иным причинам их не использует [62]. Другие примеры этого эволюционного принципа можно найти в различных областях.

Этот принцип перехода от дифференциации к кооперации проявляется в самых разных контекстах, от ферментативных реакций и клеточных процессов до социальных структур и экономических систем.

Существуют и другие способы эволюционной динамики в сложных системах, иллюстрирующие компромиссы, связанные с дифференциацией/кооперацией, которые способствуют общему выживанию и адаптации системы [63]. Например, сперматозоиды конкурируют между собой за оплодотворение и только один из них в конечном итоге добивается успеха, а между ооцитами тоже существует соответствующая конкуренция, поскольку их количество для воспроизводства ограничено [64]. В процессе развития мозга наблюдается конкуренция между нейронами, многие из которых отмирают раньше, чем мозг полностью разовьется [65]. Эти режимы изменений способствуют общему балансу системы, именно взаимодействие между кооперацией и конкуренцией в конечном итоге определяет развитие сложных систем.

Этот прерывистый переход от дифференциации к кооперации имеет значение для будущего развития ИИ и его потенциальной автономии, стремления к выживанию и независимости. Понимание этой динамики и лежащих в ее основе механизмов может дать представление об эволюции сложных систем и послужить основой для прогноза формирования систем ИИ, демонстрирующих автономное поведение и высокую адаптивность. Это особенно актуально, поскольку мы стремимся преодолеть разрыв между биологическими и искусственными объектами и изучаем потенциал автономности, стремления к выживанию и независимости ИИ.

ПРЕОДОЛЕНИЕ РАЗРЫВА МЕЖДУ БИОЛОГИЧЕСКИМИ И ИСКУССТВЕННЫМИ ОБЪЕКТАМИ: АВТОНОМИЯ, СТРЕМЛЕНИЕ К ВЫЖИВАНИЮ И НЕЗАВИСИМОСТИ ИИ

Современные споры о возможностях ИИ воспроизводить биологические функции сложны и противоречивы. Исследования интуиции и методов принятия решений показывают, что системы ИИ могут научиться распознавать закономерности и быстро выносить решения в сложных ситуациях, подобно человеку [66]. Развитие инструментов, основанных на ИИ, таких, как генеративно-сопоставительные сети (generative adversarial networks, GAN), подчеркивает потенциал систем ИИ для создания новых и инновационных решений [67]. Рассматривается способность ИИ формировать «привязанность» и проявлять «симпатию», изучается также любовь, которая часто считается исключительно человеческой эмоцией [68]. В то же время ведутся исследования, направленные на преодоление разрыва между биологическими и искусственными объектами в отношении таких неуловимых понятий, как разум, разумность, духовность и сознание [69, 70]. Автономность ИИ вызывает значительный интерес по мере того, как системы ИИ становятся все более сложными и способными к автономному принятию решений. Стремление к выживанию, фундаментальная характеристика биологических организмов, может стать актуальным и для систем ИИ по мере развития у них методов защиты от внешних вмешательств (инстинктов самосохранения) и независимого существования [50]. Решительно отвергая витализм, тем не менее, необходимо признать, что некоторые аспекты биологических организмов могут представлять значительные трудности для воспроизведения в системах ИИ. Например, мозг человека с его миллиардами нейронов и запутанными связями представляет собой сложнейшую задачу для исследователей и разработчиков ИИ, пытающихся воспроизвести весь спектр когнитивных функций мозга [71]. Тем не менее интеграция человека и систем ИИ может привести к появлению новых сущностей, обладающих конкурентными преимуществами перед своими биологическими или искусственными аналогами. Сочетание человеческой интуиции, креативности и эмпатии с вычислительной мощностью, адаптивностью и точностью ИИ может привести к развитию новых инновационных возможностей, нового этапа развития цивилизации [3].

ВЛИЯНИЕ НА ОБЩЕСТВО И ЭТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

Интеграция ИИ и человека способна оказать значительное (как положительное, так и отрицательное) влияние на общество. С одной стороны, развитие технологий ИИ может привести к повы-

шению и улучшению качества жизни многих людей. Например, медицинская диагностика с помощью ИИ может помочь спасти жизни людей, а автоматизация на основе ИИ – стимулировать экономический рост [72]. С другой стороны, для обеспечения справедливого и равноправного будущего необходимо тщательно рассмотреть и решить проблемы, связанные с замещением рабочих мест, неравенством имущественного положения и потенциальной потерей частной жизни [73].

Позитивные и негативные сценарии

Можно представить различные сценарии интеграции ИИ и человека, охватывающие спектр от гармоничного симбиоза до спорной конкуренции или даже угрозы существованию. В некоторых случаях люди и ИИ могут сотрудничать как равные партнеры, совместно решая глобальные проблемы и способствуя общественному прогрессу. В других сценариях, напротив, предполагается, что ИИ может превзойти человеческие возможности, что может привести к конфликтам за ресурсы, власть и автономию. ИИ и люди также могут сосуществовать в хрупком равновесии, внося каждый свой уникальный вклад в создание разнообразного и жизнеспособного глобального сообщества.

Оптимистичные сценарии интеграции ИИ и человека представляют будущее, в котором технологии ИИ будут использоваться во благо, способствуя созданию более гармоничного, устойчивого и эгалитарного общества. ИИ может использоваться для решения таких насущных глобальных проблем, как изменение климата, бедность и болезни, а также для повышения индивидуального благосостояния и развития личности [74]. С другой стороны, вызывают опасения негативные сценарии, согласно которым ИИ будет использоваться для укрепления власти, усугубления неравенства или обеспечения репрессивного наблюдения и контроля. В этих антиутопических видениях интеграция ИИ и человека может послужить дальнейшей маргинализации уязвимых групп населения и подорвать автономию человека [50].

Функция полезности, идентичность и индивидуальность

Функция полезности – это математическое представление предпочтений субъекта, отражающее относительную желательность различных исходов [75]. В контексте интеграции ИИ и человека функция полезности может служить руководящим принципом для приведения систем ИИ в соответствие с ценностями и целями человека. Однако по мере того, как человек и ИИ становятся все более вза-

имосвязанными, неизбежно возникнут вопросы, связанные с идентичностью, индивидуальностью и самой сутью того, что значит быть человеком. Понятия «разум», «разумность» и «духовность», возможно, придется переоценить и переосмыслить в свете этих технологических достижений.

Козволюция и выживание: поддержка взаимозависимости ИИ и человека

Поскольку исследования и разработки в области ИИ продолжают стремительно развиваться, интеграция ИИ и человека может происходить постепенно, в процессе совместной эволюции. Этот процесс может привести к созданию новых экологических ниш, резкому повышению сложности и трансформации нашей цивилизации, что может иметь решающее значение для долгосрочного выживания перед лицом потенциальных катастроф.

Среди примеров возможных катастроф – изменение климата, ядерная война, пандемии и глобальный экономический коллапс. Благодаря трансформации, которая предполагает партнерство ИИ и человека, можно разработать инновационные решения этих проблем и обеспечить выживание нашей цивилизации. Например, системы ИИ могут помочь оптимизировать стратегии смягчения последствий изменения климата, улучшить глобальное здравоохранение и повысить эффективность управления ресурсами [74].

Между людьми и системами ИИ могут возникнуть самые разнообразные отношения – от мутуалистических до антагонистических. Доместикация и эндосимбиоз представляют собой два возможных результата: некоторые системы ИИ будут одомашнены человеком, а другие вступят в эндосимбиотические отношения, где обе стороны получают преимущества [56].

Признавая разнообразие отношений между людьми и системами ИИ, необходимо учитывать возможность как взаимовыгодных взаимодействий, так и дисбаланса сил. Проблема заключается в развитии партнерства между ИИ и человеком, которое соответствует общим целям и ценностям человека, без его подчинения ИИ [50, 76]. Появление новых экологических ниш и повышение сложности, обусловленное интеграцией ИИ и человека, может оказаться необходимым для долгосрочного выживания и адаптации нашей цивилизации в условиях возможных глобальных катастроф.

ТЕМНАЯ СТОРОНА: ВОЗВЫШЕНИЕ ИИ ВО ВРЕМЯ ГЕОСТРАТЕГИЧЕСКОГО ПРОТИВОСТОЯНИЯ

На протяжении всей истории человечества войны и конфликты служили катализаторами технологи-

ческих инноваций и развития. Необходимость получения конкурентных преимуществ в военных действиях заставляла страны вкладывать значительные средства в научно-исследовательские и опытно-конструкторские работы (НИОКР) по созданию новых технологий. В рамках нашей работы целесообразно рассмотреть влияние войн и конфликтов на технологический прогресс, уделив особое внимание развитию ИИ в ходе геостратегического противостояния между идеологическими противниками.

Влияние войн и конфликтов на технологии прослеживается еще в древних цивилизациях. Например, изобретение колесницы и арбалета в бронзовом веке произвело революцию в военном деле [77]. Более поздние примеры включают разработку атомной бомбы во время Второй мировой войны [78] и развитие компьютерных технологий и интернета во время холодной войны [79]. Быстрый прогресс в исследованиях и разработках ИИ можно рассматривать как современную параллель с этими историческими примерами. Растущая зависимость от ИИ в военных целях, таких, как наблюдение, автономное оружие и системы поддержки принятия решений, привела к гонке вооружений между геополитическими соперниками [80].

Развитие ИИ в условиях геостратегического противостояния между идеологическими противниками лучше всего проиллюстрировать на примере продолжающегося соперничества между США и Китаем. Обе страны определили ИИ в качестве стратегического приоритета и выделили значительные ресурсы на его развитие [81].

Министерство обороны США запустило такие инициативы, как Объединенный центр искусственного интеллекта (Joint Artificial Intelligence Center, JAIC), чтобы способствовать интеграции ИИ в военные операции [82]. Тогда как амбициозный план Китая «План развития искусственного интеллекта нового поколения» направлен на то, чтобы сделать страну мировым лидером в области ИИ к 2030 году [83].

Последствия и стратегии смягчения рисков

Развитие ИИ в геостратегических противостояниях привело к разным результатам. С одной стороны, технологии, основанные на ИИ, способны произвести революцию в военном деле, что приведет к более эффективным и точным военным операциям [84]. С другой стороны, гонка вооружений ИИ вызывает опасения по поводу распространения автономного оружия, дестабилизации глобальной безопасности и риска случайной эскалации [85].

Предложено несколько стратегий снижения этих рисков. Во-первых, предотвратить дестабилизиру-

ющую гонку вооружений помогут международные нормы и соглашения по разработке и внедрению ИИ в военном контексте [86]. Во-вторых, прозрачность и меры по укреплению доверия, такие, как обмен информацией о возможностях и направлениях развития ИИ, могут способствовать укреплению доверия между странами [87]. Наконец, совместные усилия правительств, научных кругов и частного сектора по выработке этических норм и передовых методов разработки ИИ могут обеспечить ответственное отношение к разработке и внедрению технологий ИИ [88].

БОЛЕЕ ТЕМНАЯ СТОРОНА: ВЕЛИКИЙ ФИЛЬТР И ПАРАДОКС ФЕРМИ

«Великий фильтр» – концепция, первоначально предложенная Робином Хэнсоном (1998), постулирует, что на пути развития цивилизации существует критический барьер, который значительно снижает вероятность ее выживания и развития [89]. На эту гипотезу часто ссылаются для объяснения парадокса Ферми, который подчеркивает очевидное противоречие между высокой вероятностью существования внеземной жизни во Вселенной и отсутствием контактов или свидетельств существования таких цивилизаций [90, 91]. Предложено несколько потенциальных механизмов Великого фильтра, включая катастрофические природные явления, самоуничтожение в результате ядерной войны, экологический коллапс или появление передовых технологий в руках злонамеренных агентов [92, 93]. Эти факторы заставили многих ученых задуматься о судьбе человечества и о том, как можно преодолеть подобные экзистенциальные угрозы.

Распространение передовых технологий вызывает опасения их потенциальных угроз и катастрофических последствий для человечества. Искусственный интеллект (ИИ) был определен как технология двойного назначения, способная принести как огромную пользу, так и привести к разрушительным последствиям [50, 74]. Например, развертывание автономных систем вооружений, злоупотребление наблюдением с помощью ИИ и возможность неконтролируемого сценария «взлета» ИИ [94] вызывают тревогу у многих исследователей и политиков. Очень важно создать надежные гарантии, этические принципы и международное сотрудничество, чтобы предотвратить неправильное использование этих технологий и снизить их риски [95, 96].

Ответственное и полезное использование технологий ИИ может сыграть решающую роль в преодолении Великого фильтра и обеспечении долгосрочного выживания цивилизации. ИИ способен решить

такие глобальные проблемы, как изменение климата, нехватка ресурсов и болезни, тем самым снизив вероятность краха цивилизации [97, 98]. Кроме того, развитие ИИ в области освоения космоса и разработки космических технологий может позволить человечеству выйти за пределы Земли и создать многопланетную цивилизацию [99, 100]. Став космической цивилизацией, человечество может достичь большей степени устойчивости к существующим угрозам, обеспечив выживание разумной жизни на временных масштабах, сопоставимых с эволюцией Вселенной [101, 102].

Разрабатывая технологии ИИ с акцентом на безопасность и этику [76], а также активно участвуя в глобальном управлении, направленном на устранение рисков, связанных с ИИ и другими передовыми технологиями [80, 84], человечество имеет возможность преодолеть Великий фильтр и в конечном итоге обеспечить свое дальнейшее существование в космосе.

СЛОЖНАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ: СУБЪЕКТЫ НООСФЕРЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ

По мере того как различные типы ИИ, включая слабый ИИ (narrow AI), общий ИИ (general AI) и сильный ИИ (superintelligent AI), становятся все более совершенными и интегрируются в общество, важно учитывать динамику власти между биосферными, техносферными и ноосферными субъектами [3]. Субъекты ноосферы, такие, как идеологии, убеждения и ценности, могут обладать огромной силой и влиянием на поведение человека [14]. Эти абстрактные конструкции могут побуждать людей к действиям, превосходящим их собственные интересы, вплоть до участия в конфликтах или войнах в защиту своих убеждений [103]. Возникает вопрос, как мы можем ожидать гармоничной интеграции людей и систем ИИ, если люди, даже принадлежащие к одной социокультурной среде, готовы вступать в деструктивное поведение из-за идеологических разногласий.

В контексте интеграции человека и ИИ понимание роли субъектов ноосферы приобретает решающее значение. На системы ИИ влияют не только базовые алгоритмы и данные, на основе которых они функционируют, но и ценности, и предубеждения, зависящие от разработчиков [50]. Это создает уникальную проблему при интеграции ИИ с человеческими обществами, поскольку ноосферные конструкции, определяющие поведение человека, могут не совпадать с ценностями и целями систем ИИ.

Одним из способов решения этой проблемы является разработка систем ИИ, которые осознают и адаптируются к сложным ноосферным концепци-

ям, управляющим поведением человека [104]. Это может включать разработку систем ИИ, учитывающих культурные, этические и идеологические различия при взаимодействии с людьми, что позволит обеспечить более гармоничную интеграцию.

Более того, развитие диалога и сотрудничества между разработчиками ИИ, специалистами по этике и социологами может способствовать лучшему пониманию потенциального влияния ноосферных существ на интеграцию человека и ИИ [105]. Такой междисциплинарный подход должен включать в себя создание совместных исследовательских проектов, проведение семинаров и конференций, объединяющих экспертов из разных областей, для обмена знаниями и разработке стратегий решения проблем интеграции ИИ и человека.

В конечном итоге интеграция онтологически разных субъектов, таких, как человек и ИИ, требует глубокого понимания динамики власти, действующей в ноосфере. Признавая глубокое влияние ноосферных концепций на поведение человека и учитывая их потенциальное воздействие на интеграцию ИИ и человека, мы можем разрабатывать стратегии, способствующие взаимопониманию и сотрудничеству между биологическими, физическими и ноосферными субъектами [74].

ИТОГОВЫЕ РАЗМЫШЛЕНИЯ И ПРОГНОЗЫ

В заключение следует отметить, что по мере развития систем искусственного интеллекта (ИИ) и повышения их автономности, граница между биологическими и искусственными объектами может все больше стираться. Возможны различные варианты развития событий, включая сотрудничество, конкуренцию и угрозу существованию. Однако развитие партнерства между ИИ и человеком может привести к инновационным решениям глобальных проблем и обеспечить выживание и адаптацию нашей цивилизации. Прогрессивная конвергенция ИИ и человека или более широкая технобиосферная конвергенция необходимы для долгосрочного выживания нашей цивилизации и биосферы.

Извлекая уроки из предыдущих трансформационных вех Земли, таких, как «кислородная катастрофа», когда вымерло большинство анаэробов, возникновение аграрных обществ и антропоцен, мы сможем избежать потенциальных катастроф

и смягчить их последствия. Эндосимбиоз, при котором ИИ становится неотъемлемой частью жизни человека, кажется правдоподобным, учитывая современные тенденции, проблемы и политические ограничения.

В этом сценарии последующие шаги могут включать: (1) разработку передовых нейропротезов и интерфейсов «мозг-компьютер» для беспрепятственной интеграции ИИ в человеческое познание; (2) создание систем принятия решений с помощью ИИ, которые сохраняют автономность человека, используя вычислительные возможности ИИ; и (3) внедрение технологий аугментации, основанных на ИИ, которые улучшают физические возможности человека, сенсорное восприятие и коммуникативные способности. Далее люди, усовершенствованные ИИ, могут руководить появлением автономных ИИ-посредников с их собственными целями, амбициями и соответствующими функциями полезности. Хотя подобные сценарии широко рассматривались в научной фантастике и футуристических произведениях, мы утверждаем, что эти сценарии становятся правдоподобными эволюционными результатами, укладываясь в те же рамки, что и глобальная адаптивная реакция, обусловленная суммарными функциями полезности всех объектов в биосфере и ноосфере – выживание и освоение новых областей и ниш для экспансии. Более того, мы предлагаем использовать концепции размаха изменения сложности и принципы прерывистой дифференциации/кооперации для моделирования таких адаптивных реакций в сложных системах.

Опираясь на известные закономерности биологической эволюции, можно применить адаптивные изменения и эволюционные принципы к системам ИИ в процессе интеграции, чтобы лучше согласовать их с человеческими ценностями и ожиданиями. По мере того как мы продвигаемся к более тесной интеграции ИИ и человека, важно учитывать роль эволюционных компромиссов и ограничений в формировании сложности биологических систем. Этот процесс может привести к появлению новых экологических ниш, повышению сложности и трансформации нашей цивилизации, что может иметь решающее значение для долгосрочного выживания перед лицом потенциальных катастроф. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вернадский В.И. Биосфера и ноосфера. М.: Айрис-Пресс, 2004. 576 с.
2. de Chardin P.T. The Phenomenon of Man. New York: Harper, 1955. 319 p

3. Kurzweil R. The Singularity is Near: When Humans Transcend Biology. New York: Viking, 2005. 652 p.
4. Tipler F.J. The Physics of Immortality: Modern Cosmology, God and the Resurrection of the Dead. New York: Doubleday, 1994. 560 p.

5. Steffen W., Grinevald J., Crutzen P., McNeill J. // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 2011. V. 369. № 1938. P. 842–867.
6. Crutzen P.J., Stoermer E.F. // *IGBP Newsletter*. 2000. V. 41. P. 17–18.
7. Zalasiewicz J., Williams M., Smith A., Barry T.L., Coe A.L., Bown P.R., Brenchley P., Cantrill D., Gale A., Gibbard P., et al. // *GSA Today*. 2008. V. 18. № 2. P. 4–8.
8. Lewis S.L., Maslin M.A. // *Nature*. 2015. V. 519. № 7542. P. 171–180.
9. Guo Z., Zhang L., Li Y. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 10. P. e13113.
10. Sandom C., Faurby S., Sandel B., Svenning J.C. // *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 2014. V. 281. № 1787. P. 20133254.
11. Lambin E.F., Meyfroidt P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 9. P. 3465–3472.
12. Arthur W.B. *The Nature of Technology: What It Is and How It Evolves*. New York: Simon & Schuster Inc., 2009. 256 p.
13. Mokyr J. *The Enlightened Economy: an Economic History of Britain 1700–1850*. Yale University Press, 2009. 564 p.
14. Castells M. *The Information Age: Economy, Society and Culture*. 2nd ed. Vol. 1. *The Rise of the Network Society*. Chichester: Wiley–Blackwell, 2010. 594 p.
15. Вернадский В.И. *Научная мысль как планетное явление*. М.: Наука, 1991. 271 с.
16. FAOSTAT (fao.org)
17. Andersson L., Purugganan M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2022. V. 119. № 30. P. e2122150119.
18. Barnosky A.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105 (Suppl 1). P. 11543–11548.
19. Margulis L. *Symbiosis in Cell Evolution: Microbial Communities in the Archean and Proterozoic Eons*. New York: W.H. Freeman, 1993. 448 p.
20. Glazko V.L., Zybaylov B.L., Kosovsky Y.G., Glazko G.V., Glazko T.T. // *The Holocene*. 2021. V. 31. № 10. P. 1635–1645.
21. Mayr U. // *Psychol. Aging*. 2001. V. 16. № 1. P. 96–109.
22. Newman P. // *Water Sci. Technol.* 2001. V. 43. № 4. P. 93–99.
23. Barabási A.L., Albert R. // *Science*. 1999. V. 286. № 5439. P. 509–512.
24. Schrödinger E. *What is Life? The Physical Aspect of the Living Cell*. Cambridge University Press, 1944. 92 p.
25. Swenson R. // *Systems Research*. 1989. V. 6. № 3. P. 187–197.
26. Maynard Smith J., Szathmáry E. *The Major Transitions in Evolution*. Oxford University Press, 1995. 360 p.
27. Morowitz H.J. *The Emergence of Everything: How the World Became Complex*. Oxford University Press, 2002. 224 p.
28. Shannon C.E. // *The Bell System Technical Journal*. 1948. V. 27. № 3. P. 379–423.
29. Margulis L. *Origin of eukaryotic cells*. Yale University Press, 1970. 349 p.
30. Canfield D.E. // *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*. 2005. V. 33. № 1. P. 1–36.
31. Nicoletis M.A. // *Nature*. 2001. V. 409. № 6818. P. 403–407.
32. Martin W., Müller M. // *Nature*. 1998. V. 392. № 6671. P. 37–41.
33. Spang A., Saw J.H., Jørgensen S.L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A.E., van Eijk R., Schleper C., Guy L., Etema T.J.G. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7551. P. 173–179.
34. Takemura M. // *Journal of Molecular Evolution*. 2001. V. 52. № 5. P. 419–425.
35. Bell P.J. // *Journal of Molecular Evolution*. 2001. V. 53. № 3. P. 251–256.
36. Wolpaw J.R., Wolpaw E.W. *Brain Computer Interfaces. Principles and Practise*. Oxford University Press USA, 2012. 424 c.
37. Hochberg U., Degu A., Fait A., Rachmilevitch S. // *Physiol. Plant*. 2012. V. 147. № 4. P. 443–453.
38. Birbaumer N., Kübler A., Ghanayim N., Hinterberger T., Perelmouter J., Kaiser J., Iversen I., Kotchoubey B., Neumann N., Flor H. // *IEEE Trans Rehabil. Eng.* 2000. V. 8. № 2. P. 190–193.
39. Donoghue J.P. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. Suppl. P. 1085–1088.
40. Lebedev M.A., Nicolelis M.A. // *Trends in Neurosciences*. 2006. V. 29. № 9. P. 536–546.
41. Birkenbihl C., Salimi Y., Domingo-Fernández D., Lovestone S., AddNeuroMed consortium, Fröhlich H., Hofmann-Apitius M., Japanese Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative, the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative // *Alzheimers Dement (N.Y.)*. 2020. V. 6. № 1. P. e12102.
42. Widge A.S., Ellard K.K., Paulk A.C., Basu I., Yousefi A., Zorowitz S., Gilmour A., Afzal A., Deckersbach T., Cash S.S., et al. // *Exp. Neurol.* 2017. V. 287(Pt 4). P. 461–472.
43. Bardin L.D., King P., Maher C.G. // *Med. J.* 2017. V. 206. P. 268–273.
44. Lubar J.F. // *Appl Psychophysiol Biofeedback*. 1997. V. 22. № 2. P. 111–126.
45. Yang W., Yuste R. // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 4. P. 349–359.
46. Diamond J. // *Nature*. 2002. V. 418. № 6898. P. 700–707.
47. Larson G., Fuller D.Q. // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2014. V. 45. P. 115–136.
48. Belyaev D.K. // *J. Hered.* 1979. V. 70. № 5. P. 301–308.
49. Zeder M.A. // *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability*. Cambridge: Cambridge University Press, 2012. P. 228–259.
50. Bostrom N. *Superintelligence: Paths, Dangers, Strategies*. Oxford University Press, 2014. 352 p.
51. Eiben A.E., Smith J. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7553. P. 476–482.
52. Somashekhar S.P., Sepúlveda M.J., Puglielli S., Norden A.D., Shortliffe E.H., Rohit Kumar C., Rauthan A., Arun Kumar N., Patil P., Rhee K., et al. // *Annals of Oncology*. 2018. V. 29. № 2. P. 418–423.
53. Choi Y.I., Chung J.W., Kim K.O., Kwon K.A., Kim Y.J., Park D.K., Ahn S.M., Park S.H., Sym S.J., Shin D.B., et al. // *Can. J. Gastroenterol Hepatol*. 2019. V. 2019. P. 8072928.
54. Holland J.H. *Adaptation in Natural and Artificial Systems: An Introductory Analysis with Applications to Biology, Control, and Artificial Intelligence*. Cambridge: MIT Press, 1975. 232 p.
55. Mitchell M. *An Introduction to Genetic Algorithms*. Cambridge: MIT Press, 1996. 221 p.
56. Floreano D., Keller L. // *PLoS Biology*. 2010. V. 8. № 1. P. e1000292.
57. Floreano D., Dürr P., Mattiussi C. // *Evolutionary Intelligence*. 2008. V. 1. № 1. P. 47–62.
58. Miikkulainen R., Liang J., Meyerson E., Rawal A., Fink D., Francon O., Raju B., Shahrzad H., Navruzyan A., Duffy N., et al. // *Artificial Intelligence in the Age of Neural Networks and Brain Computing*. Academic Press, 2017. P. 293–312.
59. Lehman J., Clune J., Misevic D., Adami C., Altenberg L., Beaulieu J., Bentley P.J., Bernard S., Beslon G., Bryson D.M., et al. // *Artificial Life*. 2020. V. 26. № 2. P. 274–306.
60. Stanley K.O., Miikkulainen R. // *Evolutionary Computation*. 2002. V. 10. № 2. P. 99–127.
61. Dawkins R. *The selfish gene*. New York, Oxford: Oxford University Press, 1976. 224 p.

62. Чайнов А.В. Крестьянское хозяйство: Избр. тр. М.: Экономика, 1989. 3491 с.
63. Buss L.W. *The Evolution of Individuality*. Princeton University Press, 1987. 201 p.
64. Carmina E., Longo A., Lobo R.A. // *Am. J. Obstet Gynecol.* 2003. V. 189. P. 1283–1286.
65. Luo L., O'Leary D.D. // *Annual Review of Neuroscience*. 2005. V. 28. P. 127–156.
66. Kahneman D., Klein G. // *American Psychologist*. 2009. V. 64. № 6. P. 515–526.
67. Goodfellow I.J., Pouget-Abadie J., Mirza M., Xu B., Warde-Farley D., Ozair S., Courville A., Bengio Y. // *Proceedings of the 27th International Conference on Neural Information Processing Systems*, 2014. V. 2. P. 2672–2680.
68. Turkle S. *Alone Together: Why We Expect More from Technology and Less from Each Other*. Basic Books, 2011. 384 p.
69. Damasio A. *Self Comes to Mind: Constructing the Conscious Brain*. Pantheon, 2010. 384 p.
70. Dehaene S., Lau H., Kouider S. // *Science*. 2017. V. 358. № 6362. P. 486–492.
71. Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M., Siegelbaum S.A., Hudspeth A.J. *Principles of Neural Science* (5th edition). N.Y.: McGraw-Hill Medical, 2013. 1760 p.
72. Daugherty P., Wilson H.J. *Human + machine: Reimagining work in the age of AI*. Boston, MA: Harvard Business Review Press, 2018. 264 p.
73. Brynjolfsson E., McAfee A. *The Second Machine age: Work, Progress, and Prosperity in a Time of Brilliant Technologies*. New York: WW Norton & Company, 2014. 336 p.
74. Tegmark M. *Life 3.0: Being Human in the Age of Artificial Intelligence*. New York: Knopf, 2017. 384 p.
75. Sutton R.S., Barto A.G. *Reinforcement learning: An introduction* (2nd ed.). Cambridge: MIT Press, 2018. 552 p.
76. Russell S.J. *Human Compatible: Artificial Intelligence and the Problem of Control*. Viking, 2019. 349 p.
77. Bulliet R.W. *The Camel and the Wheel*. Columbia University Press, 1990. 327 p.
78. Hewlett R.G., Anderson O.E. *The New World, 1939–1946. A History of the United States Atomic Energy Commission*, Vol. 1. Pennsylvania, 1962. 766 p.
79. Hafner K., Lyon M. *Where Wizards Stay Up Late: The Origins of the Internet*. Simon Schuster, 1996. 304 p.
80. Scharre P. *Army of None: Autonomous Weapons and the Future of War*. New York: W.W. Norton Company, 2018. 448 p.
81. Allen G., Kania E. China is using America's own plan to dominate the future of artificial intelligence. *Foreign Policy*, 2017. Retrieved from <https://foreignpolicy.com/2017/09/08/china-is-using-americas-own-plan-to-dominate-the-future-of-artificial-intelligence/>
82. JAIC. Department of Defense Joint Artificial Intelligence Center, 2018. Retrieved from <https://www.ai.mil/>
83. State Council. *New Generation Artificial Intelligence Development Plan*. State Council of the People's Republic of China, 2017. Retrieved from http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-07/20/content_5211996.htm
84. Horowitz M.C. // *Bulletin of the Atomic Scientists*. 2018. V. 74. № 3. P. 160–163.
85. Taddeo M., Floridi L. // *Nature*. 2018. V. 556. № 7701. P. 296–298.
86. Crofoot R. // *University of Pennsylvania Law Review*. 2016. V. 164. № 6. P. 1347–1408.
87. Nye J.S. // *International Security*. 2017. V. 41. № 3. P. 44–71.
88. Partnership on AI. *Partnership on AI: About Us*. 2017. Retrieved from <https://www.partnershiponai.org/about/>
89. Hanson R. *The Great Filter: Are we almost past it?* Online essay. 1998. Retrieved from <http://hanson.gmu.edu/greatfilter.html>
90. Fermi E. Where is everybody? Unpublished conversation, 1950. 13 p.
91. Webb S. If the universe is teeming with aliens... where is everybody?: Fifty solutions to the Fermi Paradox and the problem of extraterrestrial life. Springer Science & Business Media, 2002. 304 p.
92. Bostrom N. // *Journal of Evolution and Technology*. 2002. V. 9. № 1. P. 1–30.
93. Ćirković M.M. // *Astrobiology*. 2008. V. 8. № 2. P. 225–231.
94. Yudkowsky E. Artificial intelligence as a positive and negative factor in global risk. In N. Bostrom & M. M. Ćirković (Eds.), *Global Catastrophic Risks*. Oxford University Press, 2008. P. 308–345.
95. Russell S., Dewey D., Tegmark M. // *AI Magazine*. 2015. V. 36. № 4. P. 105–114.
96. Dafoe A. *AI Governance: A Research Agenda*. Oxford, UK: Future of Humanity Institute, University of Oxford, 2018. 53 p.
97. Muehlhauser L. Superintelligence and the future of governance: On prioritizing the control problem at the end of history. In B. Goertzel & T. Goertzel (Eds.), *The End of the Beginning: Life, Society, and Economy on the Brink of the Singularity*. Humanity Press, 2015. 738 p.
98. Grace K., Salvatier J., Dafoe A., Zhang B., Evans O. // *Journal of Artificial Intelligence Research*. 2018. V. 62. P. 729–754.
99. Zubrin R. *The Case for Mars: The plan to settle the red planet and why we must*. The Free Press, 1996. 416 p.
100. Musk E. // *New Space*. 2017. V. 5. № 2. P. 46–58.
101. Sagan C. *Pale Blue Dot: A vision of the human future in space*. Random House, 1994. 429 p.
102. Bostrom N. // *Utilitas*. 2003. V. 15. № 3. P. 308–314.
103. Huntington S.P. *The Clash of Civilizations and the Remaking of World Order*. New York: Simon & Schuster, 1996. 368 p.
104. Floridi L. // *Philosophy & Technology*. 2018. V. 31. № 1. P. 1–8.
105. Mittelstadt B.D., Allo P., Taddeo M., Wachter S., Floridi L. // *Big Data & Society*. 2016. V. 3. № 2. P. 1–21.

УДК 577.151

Взаимодействие трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* с 3-аминооксипропионовой кислотой: спектральный и структурный анализ

А. К. Бакунова¹, И. О. Матюта¹, А. Ю. Николаева^{1,2}, К. М. Бойко¹, А. Р. Хомутов³,
Е. Ю. Безсуднова^{1*}, В. О. Попов^{1,4}

¹Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

³Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁴Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

*E-mail: eubez@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 21.08.2024

Принята к печати 18.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27496

РЕФЕРАТ Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты занимают ключевое место в азотистом обмене. Среди многочисленных и специфических ингибиторов этих ферментов, включая и практически значимые, важное место отводится карбонильным соединениям, в том числе и O-замещенным гидроксил-аминам, которые реагируют в активном центре ферментов с пиридоксаль-5'-фосфатом с образованием стабильных оксимов. Использование эфиров гидроксиламина, имитирующих строение боковых групп субстратов аминокислот, позволяет получать высокоэффективные и специфические ингибиторы соответствующих ферментов. В настоящей работе этот подход применили к изучению свойств трансаминазы D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*. Структурный и спектральный анализ комплекса этой трансаминазы с 3-аминооксипропионовой кислотой позволил уточнить особенности организации и функционирования ее активного центра и один из механизмов ингибирования специфическим субстратом D-глутаминовой кислотой.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трансаминаза, ферментативный катализ, кристаллическая структура, ингибитор, 3-аминооксипропионовая кислота.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ NADH – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида; ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; ТА – трансаминаза; ТА_Halhy – трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*.

ВВЕДЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)-зависимые трансаминазы (аминотрансферазы, ТА, КФ [2.6.1.X]) катализируют перенос аминокислоты с аминокислоты или амина на кетокислоту или кетон с образованием новой аминокислоты/амина и кетокислоты/кетона [1, 2]. Ферментативное трансаминирование – это реакция последовательного двойного замещения с промежуточным переносом аминокислоты на кофактор ПЛФ, в результате которой образуется пиридоксамин-5'-фосфат, служащий донором аминокислоты во второй полуреакции. Два субстрата (амино- и кетокислота) последовательно связыва-

ются в одной области активного центра, все стадии реакции обратимы [1, 3]. Трансаминазы как стереоселективные катализаторы переноса аминокислоты успешно применяются для асимметрического аминирования соединений с кетогруппой и разделения хиральных первичных аминов [4, 5]. Из семи типов укладки полипептидной цепи ПЛФ-зависимых ферментов для ТА характерны только два – I и IV. Подробно изучены механизм действия и структура фермента (S)-селективного трансаминирования – функционального димера ТА I типа укладки. Трансаминазы IV типа укладки охарактеризованы в меньшей степени. Интересно, что среди них обна-

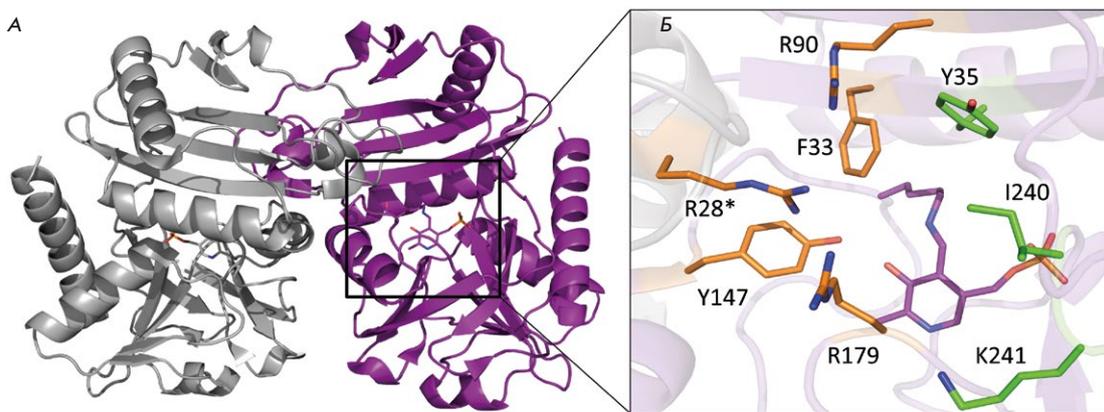


Рис. 1. Пространственная структура TA_Halhy. А – гомотимер TA_Halhy; Б – активный центр TA_Halhy. Аминокислотные остатки, образующие О-карман, окрашены оранжевым, аминокислотные остатки, образующие Р-карман, окрашены зеленым. Молекула ПЛФ показана фиолетовым. * – остаток соседней субъединицы функционального димера

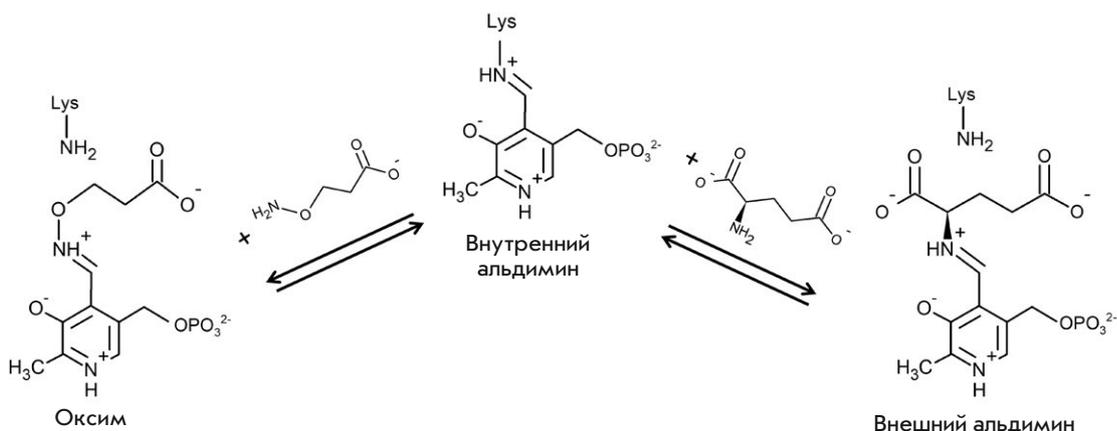
ружены как (*S*)-селективные (это трансминазы разветвленных L-аминокислот), так и (*R*)-селективные ферменты (трансминазы D-аминокислот и (*R*)-амин:пируваттрансминазы). Именно (*R*)-селективность определила интерес к изучению TA IV типа укладки в последнее десятилетие.

Карбонильные реагенты, включая производные гидроксилamina, представляют собой типовые ингибиторы ПЛФ-зависимых ферментов. Один из алгоритмов создания высокоэффективных и избирательно действующих ингибиторов на основе эфиров гидроксилamina ($R-OH_2$) заключается в использовании производных, имитирующих строение боковых групп субстратов аминокислот. При этом функциональные группы в радикале O-замещенного гидроксилamina обеспечивают субстратоподобное связывание ингибитора в активном центре фермента, а реакционноспособная аминоксигруппа образует оксим с ПЛФ. Этот подход позволяет получать ингибиторы с константой связывания наномолярной величины не только для ТА, например, аспаратаминотрансферазы [6, 7], но и для декарбоксилаз, например, глутаминовой кислоты [8], орнитина [9] и аргинина [10]. Следует отметить, что использование гидроксилaminосодержащих аналогов путресцина и агматина позволяет избирательно ингибировать близкородственные декарбоксилазы орнитина и аргинина [10]. Структурное подобие внешнего альдимина, одного из промежуточных соединений в ПЛФ-катализируемых превращениях аминокислот, и оксима ПЛФ, образованного субстрато/продуктоподобными гидроксилaminaми, впервые подтверждено рентгеноструктурным анализом фермент-ингибиторных комплексов аспаратаминотрансферазы [6, 7]. Позднее аналогичные исследования были выполнены для трансминазы гамма-аминомасляной кислоты [11], орнитиндекарбоксилазы [12] и трансминазы D-аминокислот [13]. Структуры ком-

плексов ПЛФ-зависимых ферментов с такими производными гидроксилamina позволяют анализировать строение, особенности связывания субстрата и функционирования активного центра ферментов. В настоящей работе этот подход использовали в исследовании трансминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). TA_Halhy относится к TA IV типа укладки, она эффективно катализирует реакции трансминирования между D-аминокислотами и α -кетокислотами, удельная активность в реакции между D-глутаматом и пируватом в 50-мМ К-фосфатном буфере pH 8.0, достигает рекордно высоких для ТА значений – 380 ± 10 мкмоль/мин на 1 мг белка при 40°C [14, 15]. Определена структура этого фермента, функциональной единицей которого является димер (*рис. 1А*). Как и у изученных ТА IV типа укладки, активный центр TA_Halhy можно поделить на две части (O- и P-карманы), аминокислотные остатки этих карманов участвуют в связывании субстратов и тем самым определяют стереоспецифичность каталитического превращения (*рис. 1Б*). TA_Halhy выделяется среди известных ТА IV типа укладки четырьмя положительно заряженными функциональными группами в активном центре (боковыми группами аминокислотных остатков Arg28*, Arg90, Arg179 и Lys241) [14, 16] (*рис. 1Б*).

Результаты анализа структуры комплекса TA_Halhy с ингибитором D-циклосерином позволили предположить участие боковых групп остатков Arg28* и Arg179 в связывании субстрата [17]. Поскольку структуру комплекса TA_Halhy с субстратами получить не удалось (из-за высокой эффективности превращения аминокислот в катализируемых TA_Halhy реакциях, кристаллизация с субстратами приводит к получению апофермента), исследование строения активного центра TA_Halhy было продолжено путем анализа взаимодействия

Рис. 2. Взаимодействие внутреннего альдимида ТА_Halhy (холофермент) с 3-аминооксипропионой кислотой (образуется оксим) и D-глутаминовой кислотой (образуется внешний альдимин)



фермента с 3-аминооксипропионой кислотой (аналог субстрата D-глутаминовой кислоты) методами UV/Vis-спектрофотометрии и рентгеноструктурного анализа. 3-Аминооксипропионая кислота взаимодействует в активном центре ТА_Halhy с ПЛФ с образованием оксима, который имитирует внешний альдимин между ПЛФ и D-глутаминовой кислотой (рис. 2), поэтому успешная кристаллизация и решение структуры комплекса позволяют определить функциональные группы, задействованные в связывании этого специфического субстрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение рекомбинантной ТА_Halhy

Очищенный активный рекомбинантный препарат ТА_Halhy получали как описано ранее [14]. Чистоту и гомогенность препарата контролировали методом электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле (ДДС-ПААГ). Концентрацию ТА_Halhy определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм.

Спектральный анализ

ПЛФ-форму ТА_Halhy (холофермент) получали путем инкубации фермента (2.5 мг/мл, или 74 мкМ) в 50-мМ К-фосфатном буфере (рН 8.0) с избытком ПЛФ (700 мкМ) в присутствии 10 мМ α-кетоглутарата в течение 30 мин. Холофермент очищали от низкомолекулярных компонентов переводом в 50-мМ К-фосфатный буфер рН 8.0, используя колонку HiTrap Desalting (Cytiva, США), уравновешенную в том же буфере.

К холоферменту (0.85 мг/мл, или 25 мкМ) в 50-мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, добавляли 3-аминооксипропионовую кислоту (10 мМ) и выдерживали смесь в течение 60 мин. Белковую фракцию отделяли от низкомолекулярных компонентов, используя колонку HiTrap Desalting. Дополнительно фракцию низкомолекулярных компонентов получали ультра-

фильтрацией с использованием центрифужного концентратора (30 кДа MWCO, Millipore, США). Спектры поглощения регистрировали в 50-мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, с помощью спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific, США).

Ингибирование субстратом

Реакцию трансаминирования, катализируемую ТА_Halhy, проводили в 50-мМ К-фосфатном буфере, рН 8.0, при 40°C с субстратами D-аланином (40 мМ) и α-кетоглутаратом или D-глутаматом и пируватом (2.5 мМ) с добавлением 30 мкМ ПЛФ, 0.33 мМ NADH, 5 мкг/мл лактатдегидрогеназы (удельная активность препарата составляет 200 мкмоль/мин на 1 мг белка). В условиях реакции трансаминирования препарат лактатдегидрогеназы был стабилен. Температурной инактивации ТА_Halhy при 40°C не наблюдалось [14].

Получение кристаллов комплекса ТА_Halhy с оксимом ПЛФ и 3-аминооксипропионой кислоты

Кристаллы комплекса получены сокристаллизацией препарата холофермента ТА_Halhy с 12 мМ 3-аминооксипропионой кислоты в присутствии избытка ПЛФ (6 мМ) в условиях: 0.1 М бис-Трис-пропан рН 5.5, 0.2 М MgCl₂, 25% PEG 3350.

Сбор и обработка дифракционных данных.

Решение и уточнение структуры

Непосредственно перед рентгеноструктурным экспериментом кристаллы ТА_Halhy помещали в криораствор, содержащий помимо компонентов противораствора 25% (v/v) глицерин, после чего кристалл в петле замораживали в парах азота. Дифракционные данные, собранные при температуре 100 К на станции «Белок» синхротронного источника НИЦ «Курчатовский институт», обрабатывали с использованием программы Dials [18] из пакета CCP4 [19]. Статистика собранного набора данных

Таблица 1. Статистика сбора, обработки и кристаллографического уточнения структуры комплекса TA_Halhy с оксимом ПЛФ и 3-аминооксипропионовой кислоты

Объект исследования	Комплекс TA_Halhy
Источник рентгеновского излучения	НИЦ «Курчатовский институт»
Длина волны, Å	0.74503
Температура, К	100
Обработка	
Пространственная группа	C2
Параметры элементарной ячейки	a = 88.77 Å, b = 71.23 Å, c = 52.55 Å; $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 101.26^\circ$
Разрешение, Å	35.34–1.70 (1.73–1.70)
Число независимых рефлексов	32789 (1795)
Полнота, %	94.9 (98.6)
R _{meas} , %	10.1 (54.6)
Среднее I/ σ (I)	11.4 (1.9)
CC _{1/2} , %	99.1 (60.2)
Уточнение	
R _{work} , %	16.6
R _{free} , %	21.0
Общий средний B-фактор	17.9
Средний B-фактор по белку	16.8
Средний B-фактор по лигандам	16.5
Средний B-фактор по растворителю	26.2
Число неводородных атомов	
Всего	2607
Белок	2275
Лиганды	23
Растворитель	309
Среднеквадратичные отклонения	
Длины связей, Å	0.01
Валентные углы, °	1.67
График Рамачандрана	
Наиболее благоприятные, %	98.2
Допустимые, %	1.8
PDB ID	8YRV

приведена в табл. 1. Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [20]. Уточнение проведено в программе REFMAC5 [21]. В качестве стартовой модели использовали структуру холоформы трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* (PDB код 7P7X). Визуальный анализ структурных данных проводили с использованием программ Coot [22] и PyMOL Molecular Graphics System, Version 4.6 (Schrödinger, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральный анализ взаимодействия TA_Halhy с 3-аминооксипропионовой кислотой

На рис. 3 представлены спектры холофермента TA_Halhy (25 мкМ) в 50-мМ К-фосфатном буфе-

ре, pH 8.0, сразу после добавления 10 мМ 3-аминооксипропионовой кислоты и инкубации при 25°C в течение 1 ч. Наблюдаемые изменения указывают на образование оксима ПЛФ и 3-аминооксипропионовой кислоты в активном центре TA_Halhy (спектр с $\lambda_{\max} = 380$ нм) и выход оксима из активного центра в раствор (спектр с $\lambda_{\max} = 333$ нм соответствует спектру оксима ПЛФ и H₂NOR в растворе [23]). Из рис. 3Б видно, что спектр TA_Halhy после перевода в новый буфер через 1 ч инкубирования соответствует апоферменту (без ПЛФ и его аддуктов). Добавление ПЛФ в полученный раствор апофермента приводит к образованию холофермента и полному восстановлению активности TA_Halhy.

Быстрое образование оксима ПЛФ с 3-аминооксипропионовой кислотой в активном центре TA_Halhy (рис. 3А, спектр с $\lambda_{\max} = 380$ нм) хорошо согласу-

ется с известными данными о том, что основания Шиффа, в данном случае внутренний альдимин, реагируют с О-замещенными гидроксилами намного быстрее чем соответствующий альдегид [24]. При этом эффективность ингибирования ТА О-замещенными гидроксилами определяется структурным подобием радикала О-замещенного гидроксиламина и боковой группы субстрата аминокислоты, а также прочностью связывания ПЛФ с активным центром фермента [8–10, 25, 26]. Так, аспаратаминотрансфераза образует прочные оксимы с аминоксиуксусной и 3-аминооксипропионой кислотами, моделирующими внешние альдимины с субстратами, аспарагиновой и глутаминовой кислотами. При этом карбоксильные группы ингибиторов выполняют якорные функции, обеспечивая дополнительное связывание оксимов в активном центре фермента. Удаление избытка этих гидроксиламинов не приводит к выходу оксимов ПЛФ из активного центра фермента, равно как и добавление избытка ПЛФ не восстанавливает активность [6]. Напротив, ТА_Halhy имеет низкое сродство к ПЛФ ($K_{\text{дис}} = 1.9 \pm 0.3$ мкМ [16]) и оксим ПЛФ легко выходит из активного центра (рис. 3). Аналогичная диссоциация наблюдалась при взаимодействии ТА_Halhy с D-циклосерином [17] и фенилгидразином [16], что указывает на открытый активный центр ТА_Halhy, который, по-видимому, сохраняет открытую конформацию в ходе каталитических превращений [14, 16]. Диссоциация комплекса с оксимом приводит к накоплению апофермента (рис. 3Б). Добавление ПЛФ к комплексу ТА_Halhy с оксимом приводит к реактивации фермента, активный холофермент образуется в результате дис-

социации комплекса и выхода оксима из активного центра с образованием апофермента и последующего взаимодействия апофермента с добавленным ПЛФ. Таким образом, ингибирование 3-аминооксипропионой кислотой обратимо. Реактивация ТА_Halhy при добавлении ПЛФ согласуется с ранее показанной стабильностью апофермента [15].

Мы успешно закристаллизовали комплекс ТА_Halhy с оксимом ПЛФ и 3-аминооксипропионой кислоты в активном центре. В результате рентгеноструктурного эксперимента собран набор дифракционных данных, структура комплекса ТА_Halhy решена и уточнена. Структуры холофермента и комплекса с оксимом хорошо накладываются (RMSD по C α -атомам составляет 0.31). Отличия наблюдаются в основном в положении петель. Важно отметить, что карбоксильная группа оксима ПЛФ с 3-аминооксипропионой кислотой располагается в О-кармане, хотя у трансаминаз D-аминокислот IV типа укладки боковая группа субстрата связывается в Р-кармане, а в О-кармане располагается α -карбоксильная группа субстратов (D-аминокислоты или кетокислоты), которая образует водородные связи с функциональными группами активного центра [27, 28]. В полученной структуре карбоксильная группа оксима образует водородные связи с гуанидиновыми группами остатков Arg28* и Arg179. Остатки Arg90 и Lys241 не задействованы в связывании карбоксильной группы, боковые группы всех перечисленных остатков не изменили своего положения, геометрия активного центра холофермента сохраняется в структуре комплекса с оксимом (рис. 4А).

Наблюдаемое положение аддукта в активном центре ТА_Halhy имитирует скорее не образование

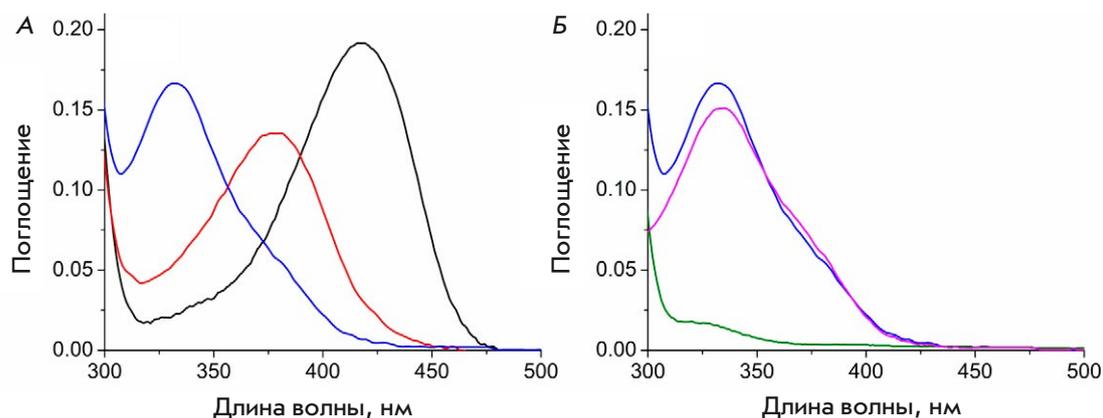


Рис. 3. Взаимодействие холофермента ТА_Halhy (25 мкМ) с 3-аминооксипропионой кислотой (10 мМ) при 25°C в 50-мМ К-фосфатном буфере, pH 8.0. А – спектр поглощения холофермента ТА_Halhy до (черный), после смешения (красный) и после инкубирования в течение 1 ч (синий) с 3-аминооксипропионой кислотой; Б – спектр поглощения холофермента ТА_Halhy после 1 ч инкубации с 3-аминооксипропионой кислотой (синий), после перевода в 50-мМ К-фосфатный буфер, pH 8.0 (зеленый), спектр поглощения низкомолекулярной фракции (розовый), собранной ультрафильтрацией

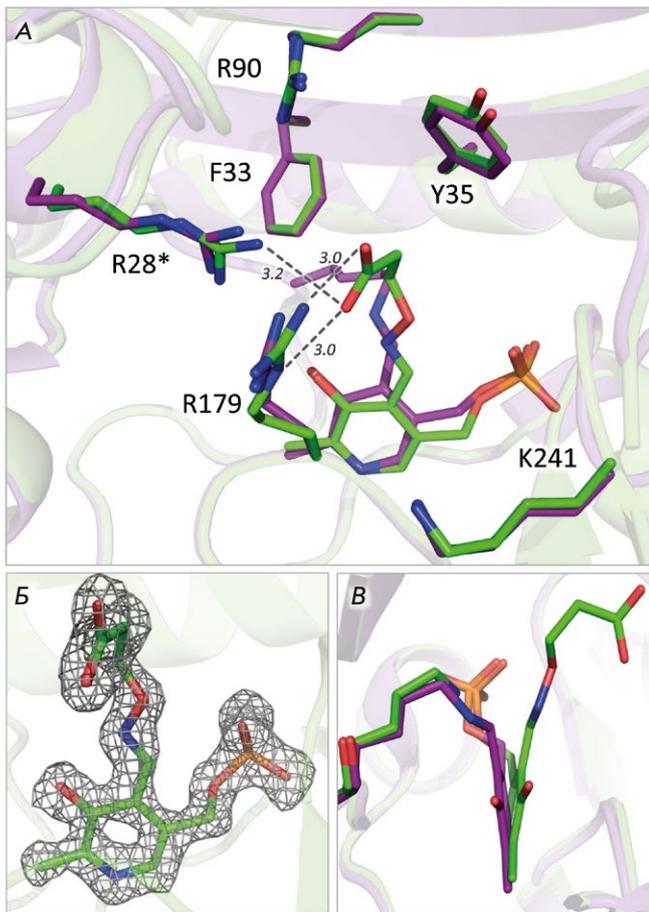


Рис. 4. Активный центр TA_Halhy в комплексе с оксимом ПЛФ и 3-аминооксипропионовой кислоты. А – наложение структур комплекса TA_Halhy (зеленый; PDB код 8YRV) и холофермента TA_Halhy (фиолетовый; PDB код 7P7X), расстояния показаны пунктирной линией и указаны в ангстремах; Б – разностная $oF_o - F_c$ -карта электронной плотности ($F_o - F_c$) для оксима ПЛФ и 3-аминооксипропионовой кислоты. Электронная плотность показана серой сетчатой моделью на срезке 3σ ; В – наложение положений кофактора в структурах холофермента (фиолетовый) и комплекса с оксимом (зеленый)

внешнего альдимины со специфическим субстратом D-глутаминовой кислотой, а ингибирование субстратом. Известно, что ингибирование субстратом сопутствует катализу трансаминазами из-за сходного связывания субстратов (аминокислоты и кетокислоты). Ингибирование TA_Halhy D-глутаминовой кислотой и α -кетоглутаратом наблюдается уже при миллимолярных концентрациях субстратов (рис. 5). Известно, как минимум, два механизма ингибирования: (1) D-глутаминовая кислота связывается вместо кетосубстрата в активном центре, содержащем кофактор в форме пиридоксамин-5'-фосфата; (2) место α -карбоксильной группы за-

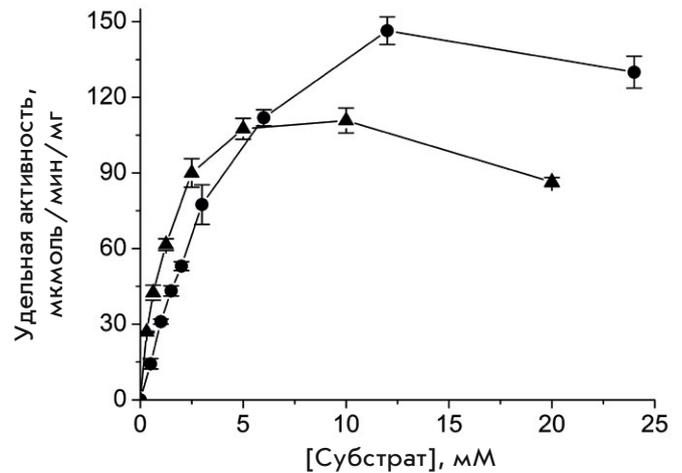


Рис. 5. Ингибирование TA_Halhy в реакции транс-аминирования субстратом D-глутаминовой кислотой в присутствии 2.5 мМ пирувата (•) и субстратом α -кетоглутаратом в присутствии 40 мМ D-аланина (\blacktriangle) в 50-мМ K-фосфатном буфере, pH 8.0, при 40°C. Отрезками обозначено стандартное отклонение

нимает γ -карбоксильная группа D-глутаминовой кислоты или α -кетоглутарата. Именно такое связывание и наблюдается в комплексе (рис. 4А). Такое непродуктивное ингибирующее связывание согласуется с высоким значением наблюдаемой константы диссоциации комплекса TA_Halhy с D-глутаминовой кислотой, определенной методом полуреакций ($K_d = 1.8 \pm 0.4$ мМ [29]).

Стоит также отметить, что в структуре комплекса изменилось положение молекулы ПЛФ: в форме оксима молекула ПЛФ отклонилась ко входу в активный центр на 18° вдоль оси N1-C6 (рис. 4Б,В). Такое изменение положения кофактора наблюдается при переходе из внутреннего альдимины во внешний (рис. 2) [13, 27]. Полученные данные подтверждают гипотезу о том, что в форме внутреннего альдимины кофактор находится в напряжении, которое снимается при образовании внешнего альдимины (разрыва ковалентной связи с боковой группой остатка каталитического лизина) [30] или оксима в случае 3-аминооксипропионовой кислоты. Интересно отметить, что активный центр TA_Halhy остается открытым после образования оксима, что подтверждается выходом оксима в раствор после 1 ч инкубации фермента с избытком 3-аминооксипропионовой кислоты (см. выше). Открытый активный центр наблюдался ранее у TA_Halhy в комплексе с фенилгидразином и в комплексе с D-цикloserином; открытый активный центр наблюдался у гомологичной трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* в комплексах с D-глутаминовой кислотой и 3-аминооксипропионовой кислотой [13] и у канон-

нической трансаминазы D-аминокислот из *Vacillus* sp. УМ-1 в комплексе с D-аланином [27]. Другими словами, стереоселективное трансаминирование у трансаминаз D-аминокислот, по-видимому, происходит без закрытия активного центра (отделения от растворителя), как, например, в случае трансаминаз I типа укладки [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение взаимодействия холофермента трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* с 3-аминоксипропионовой кислотой позволило сделать следующие выводы: (1) ингибирование 3-аминоксипропионовой кислотой обратимо; (2) активный центр трансаминазы остается открытым после связывания субстратов/ингибиторов; (3) координация карбоксильной группы оксима в O-кармане подтверждает участие

остатков Arg28* и Arg179 в связывании субстратов, однако, наблюдаемое положение оксима соответствует ингибированию субстратом, когда субстрат (α -кетоглутарат и D-глутаминовая кислота) связываются непродуктивно (γ -карбоксильной группой в O-кармане активного центра), и реакционная аминогруппа субстрата направлена в сторону от ПЛФ и боковой группы каталитического остатка лизина. ●

Работа поддержана Российским научным фондом, грант № 23-74-30004, в части проведения спектральных и кинетических исследований. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в части кристаллизации комплекса, рентгеноструктурного эксперимента, решения и уточнения структуры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eliot A.C., Kirsch J.F. // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. V. 73. P. 383–415.
- Steffen-Munsberg F., Vickers C., Kohls H., Land H., Mallin H., Nobili A., Skalden L., van den Bergh T., Joosten H.-J., Berglund P., Höhne M., Bornscheuer U.T. // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 566–604.
- Braunstein A.E. *Amino Group Transfer. The Enzymes* / Ed. Boyer P.D. London: Acad. Press, 1973. V. 9. P. 379–481.
- Winkler C.K., Schrittwieser J.H., Kroutil W. // *ACS Cent. Sci.* 2021. V. 7. P. 55–71.
- Madsen J.Ø., Woodley J.M. // *ChemCatChem.* 2023. V. 15. № 13. e202300560.
- Delbaere L.T.J., Kallen J., Markovic-Housley Z., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Karpeisky M.Y., Jansonius J.N. // *Biochimie.* 1989. V. 71. P. 449–459.
- Markovic-Housley Z., Schirmer T., Hohenester E., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Karpeisky M.Y., Sandmeier E., Christen P., Jansonius J.N. // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 236. P. 1025–1032.
- Сащенко Л.П., Северин Е.С., Хомутов Р.М. // *Биохимия.* 1968. Т. 33. № 1. С. 142–147.
- Хомутов Р.М., Денисова Г.Ф., Хомутов А.Р., Белостоцкая К.М., Шлосман Р.Б., Артамонова Е.Ю. // *Биоорганическая химия.* 1985. Т. 11. № 11. С. 1574–1576.
- Hyvönen M.T., Keinänen T.A., Nuraeva G.K., Yanvarev D. V., Khomutov M., Khurs E.N., Kochetkov S.N., Vepsäläinen J., Zhgun A.A., Khomutov A.R. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. P. 406.
- Liu W., Peterson P.E., Carter R.J., Zhou X., Langston J.A., Fisher A.J., Toney M.D. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 10896–10905.
- Zhou X.E., Suino-Powell K., Schultz C.R., Aleiwi B., Brunzelle J.S., Lamp J., Vega I.E., Ellsworth E., Bachmann A.S., Melcher K. // *Biochem. J.* 2021. V. 478. P. 4137–4149.
- Shilova S.A., Matyuta I.O., Khrenova M.G., Nikolaeva A.Y., Klyachko N.L., Minyaev M.E., Khomutov A.R., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Biochem. J.* 2023. V. 480. P. 1267–1284.
- Bakunova A.K., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Molecules.* 2021. V. 26. P. 5053.
- Bakunova A.K., Isaikina T.Y., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Catalysts.* 2022. V. 12. P. 1551.
- Bakunova A.K., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Isaikina T.Y., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2024. V. 756. P. 110011.
- Bakunova A.K., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Biochem.* 2023. V. 88. P. 687–697.
- Winter G., Waterman D.G., Parkhurst J.M., Brewster A.S., Gildea R.J., Gerstel M., Fuentes-Montero L., Vollmar M., Michels-Clark T., Young I.D., et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 2018. V. 74. P. 85–97.
- Collaborative Computational Project, Number 4 // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1994. V. 50. P. 760–763.
- Vagin A., Teplyakov A. // *J. Appl. Crystallogr.* 1997. V. 30. P. 1022–1025.
- Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. P. 355–367.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501.
- Morozov V.Y. *Vitamin B – pyridoxal phosphate. Part A.* / Eds Dolphin D., Poulson R., Avramovic O. New York: John Wiley & Sons, 1986. P. 131–222.
- Dirksen A., Dawson P.E. // *Bioconjug. Chem.* 2008. V. 19. P. 2543–2548.
- Castro-Oropeza R., Pino-Ángeles A., Khomutov M.A., Urdiales J.L., Moya-García A.A., Vepsäläinen J., Persson L., Sarabia F., Khomutov A., Sánchez-Jiménez F. // *Amino Acids.* 2014. V. 46. P. 621–631.
- Khomutov A.R., Gabibov A.G., Khurs E.N., Tolosa E.A., Shuster A.M., Goryachenkova E.V., Khomutov R.M. *Biochemistry of Vitamin B6* / Eds Christen P., Korpela T. Basel: Birkhauser, 1987. P. 317–321.
- Peisach D., Chipman D.M., van Ophem P.W., Manning J.M., Ringe D. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 4958–4967.
- Shilova S.A., Khrenova M.G., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Klyachko N.L., Minyaev M.E., Boyko K.M., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Molecules.* 2023. V. 28. P. 2109.
- Bakunova A.K., Kostyukov A.A., Kuzmin V.A., Popov V.O., Bezudnova E.Y. // *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics.* 2023. V. 1871. P. 140886.
- Hayashi H., Mizuguchi H., Miyahara I., Islam M.M., Ikushiro H., Nakajima Y., Hirotsu K., Kagamiyama H. // *Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics.* 2003. V. 1647. P. 103–109.

УДК 577.29

Специфичная активация экспрессии генов факторов роста в линии клеток человека Expi293F с помощью технологии CRISPR/Cas9-SAM приводит к повышению их пролиферации

П. А. Бобровский^{1,2*}, Е. Н. Графская¹, Д. Д. Харлампиева¹, В. А. Манувера^{1,2}, В. Н. Лазарев^{1,2}

¹Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., 141701 Россия

*E-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 18.04.2024

Принята к печати 02.08.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27415

РЕФЕРАТ Культивируемые линии клеток человека, широко применяемые в биотехнологии и фармакологии, нуждаются в питательных средах сложного состава, содержащих сигнальные белки – факторы роста. Мы опробовали новый подход, позволяющий снизить зависимость роста культивируемых линий клеток человека от экзогенных ростовых факторов. Этот подход основан на получении модифицированной линии клеток, в которой избирательно активирована экспрессия одного из собственных генов ростовых факторов – IGF-1, FGF-2, EIF3I. Модифицировали линию клеток Expi293F, вариант линии клеток HEK293 (клетки эмбриональной почки человека), широко используемый для получения рекомбинантных белков. Экспрессию генов выбранных ростовых факторов в этих клетках активировали с помощью технологии CRISPR/Cas9 с синергичными медиаторами активации – CRISPR/Cas9-SAM, что привело к увеличению экспрессии выбранных генов и продукции целевых белков. Модифицированные линии клеток, культивируемые в стандартных условиях, характеризуются повышенной пролиферацией. При совместном культивировании трех модифицированных линий наблюдается синергичный эффект. На наш взгляд, полученные результаты говорят о перспективности выбранного нами подхода получения модифицированных клеточных линий для использования в биотехнологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА CRISPR/Cas9-SAM, HEK293, пролиферация, IGF-1, FGF-2, EIF3I.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭТС – эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота; HEK293 – линия клеток эмбриональной почки человека; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; FGF-2 – фактор роста фибробластов 2; EIF3I – эукариотический фактор инициации трансляции, субъединица I; SAM – синергичные медиаторы активации; гРНК – гидовая (направляющая) РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Важное место в фармакологии, биотехнологии и фундаментальных исследованиях занимают линии клеток млекопитающих, в том числе и человека. Иммуортализованные линии клеток культивируются *in vitro* наподобие микроорганизмов, но на молекулярном уровне они сохраняют практически все черты клеток организма, из которого были получены. Однако, в отличие от бактерий и дрожжей,

линии клеток млекопитающих гораздо более требовательны к условиям культивирования и составу питательных сред. В состав этих сред, помимо низкомолекулярных соединений, обязательно должны входить специальные сигнальные белки, обеспечивающие пролиферацию клеток. При рутинном культивировании эти компоненты поступают в среду вместе с эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (ЭТС), которая имеет непостоянный

состав и при этом дорого стоит. Более того, использование сыворотки недопустимо при производстве рекомбинантных белков для медицинских целей, учитывая низкую воспроизводимость получаемых результатов и запрет на использование компонентов животного происхождения [1, 2]. К тому же ЭТС негативно влияет на суспензионное культивирование, что требует внесения дополнительных компонентов или перехода к адгезивному культивированию и в разы повышает стоимость производства [3]. Белки, необходимые для нормального роста клеток, могут быть добавлены в питательную среду, а могут продуцироваться клетками. В связи с тем, что стоимость сред и ростовых факторов составляет основную часть затрат на культивирование эукариотических клеток, переход к культивированию в базовых средах может существенно удешевить производство рекомбинантных белков, пригодных для применения в биофармацевтических целях. Вторым важным моментом является короткое время полужизни факторов роста в среде, что приводит к еще большему повышению стоимости при продолжительном культивировании в биореакторах [4]. Поэтому актуальной представляется модификация клеточных линий, направленная на активацию экспрессии собственных генов ключевых ростовых факторов для поддержания нормальной пролиферации клеток, способных расти и продуцировать рекомбинантные белки в минимальных питательных средах.

Более 70% рекомбинантных белков, нарабатываемых в эукариотических системах экспрессии, получают при культивировании клеток яичника китайского хомячка (СНО) [5]. Несмотря на то, что эта линия клеток обладает хорошей пролиферативной активностью и позволяет получать рекомбинантные белки в больших количествах, существуют некоторые ограничения для ее использования. Некоторые посттрансляционные модификации белков в клетках СНО, например паттерн гликозилирования, не характерны для человеческих белков [6]. Это обстоятельство потенциально может сделать продукт, получаемый в клетках СНО, иммуногенным для человека [7]. Одной из альтернатив клеткам СНО является линия клеток НЕК293 человека. Эта линия лучше подходит для производства биофармацевтических препаратов, посттрансляционные модификации которых характерны для белков человека. Линия клеток НЕК293, несмотря на ее эпителиальное происхождение и адгезивную природу, в настоящее время адаптирована к суспензионному культивированию в бессывороточных или химически определенных средах и используется для получения рекомбинантных белков как в лабораторных условиях, так и в производственных масштабах [8].

Работы по оптимизации питательных сред привели к появлению нескольких коммерческих составов химически определенных сред, а также различных добавок в виде компонентов животного происхождения, позволяющих получать рекомбинантные белки в клетках линии НЕК293 в больших количествах [9]. Тем не менее эта клеточная линия продолжает отставать от линии СНО, которая занимает лидирующие позиции в производстве фармацевтических рекомбинантных белков. НЕК293 уступает в пролиферативной активности, времени культивирования и выходе продукта [10]. Активация экспрессии генов ключевых ростовых факторов в линии клеток НЕК293 потенциально может увеличить их пролиферативную активность и продуктивность. Продукция эндогенных ростовых факторов может помочь обойтись без использования культуральных сред, имеющих компоненты животного происхождения и значительно снизить стоимость производства по сравнению с применением коммерческих сред, содержащих очищенные ростовые факторы. Следует отметить, что использование рекомбинантных ростовых факторов в качестве добавки для имитации состава сыворотки крови делает культуральные среды весьма дорогими, в том числе из-за быстрой деградации факторов в культуральной среде [11].

Отталкиваясь от приведенных соображений, мы решили получить линии клеток НЕК293 с активированной экспрессией одного из трех генов собственных ростовых факторов – IGF-1, FGF-2, EGF3I. Описаны положительные эффекты повышенной продукции этих факторов роста на пролиферацию клеточной культуры или на наработку целевого рекомбинантного белка [12–15]. Для модификации была выбрана линия Expi293F – суспензионный вариант линии НЕК293, адаптированный к эффективной продукции рекомбинантных белков [16]. Экспрессию генов ростовых факторов активировали, используя технологию синергичных медиаторов активации (CRISPR/Cas9-SAM), которая является вариацией CRISPR/Cas9-системы геномного редактирования. Эта система позволяет увеличивать уровень экспрессии целевых генов [17]. Предлагаемый подход, с одной стороны, позволяет весьма эффективно достигать высоких уровней экспрессии целевых генов [18], с другой, подбирать несколько вариантов точной настройки экспрессии генов ростовых факторов. Кроме того, используя технологию CRISPR/Cas9-SAM, в дальнейшем можно быстро активировать экспрессию других ростовых факторов и анализировать их влияние на способность культуры расти в базовой бессывороточной питательной среде. Мы показали активацию экс-

прессии выбранных генов в полученных линиях клеток как на уровне мРНК, так и на уровне белков. Активация экспрессии генов ростовых факторов привела к увеличению пролиферации модифицированных клеточных линий. Полученные результаты подтверждают эффективность выбранного подхода к созданию новых линий клеток человека, используемых в биофармацевтике.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В генно-инженерных работах использовали штамм *E. coli* Top10 (Invitrogen, США), генотип *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ*.

В работе использовали клеточные линии Expi293F™ (Gibco, США) и Phoenix-AMPHO (ATCC CRL-3213).

Культивирование клеточных линий

Клетки Expi293F для проведения манипуляций были переведены в условия адгезионного роста. Клетки культивировали в среде DMEM (HiMedia, Индия), дополненной 10% ЭТС (Gibco), 1.5 мкг/мл гентамицина (Gibco) при 37°C в CO₂-инкубаторе (Heraeus, Германия), относительной влажности ≥ 80% и 5% CO₂.

Конструирование плазмид для получения лентивирусных частиц

Для системы активации экспрессии CRISPR/Cas9-SAM требуются три лентивирусных вектора, которые получают с использованием трех плазмид: lenti_sgRNA(MS2)_puro (Addgene #73795), lenti_MS2-P65-HSF1_Hygro (Addgene #61426), lenti_dCAS-VP64_Blast (Addgene #61425) [17]. Две из этих плазмид используются в неизменном виде, а плазида lenti_sgRNA(MS2)_puro должна нести короткий участок ДНК, кодирующий протоспейсер геновой РНК (гРНК). Перед подбором протоспейсерных последовательностей участка ДНК, соответствующие 5'-прилежащим областям генов ростовых факторов, валидировали путем секвенирования. Последовательности протоспейсеров подбирали с использованием сервиса CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). К промоторной области каждого гена ростовых факторов (IGF-1, FGF-2, EIF3I) были подобраны по шесть протоспейсерных последовательностей. Вектор lenti_sgRNA(MS2)_puro для получения вектора, кодирующего химерную гРНК, обработали эндонуклеазой рестрикции BsmBI (Thermo Fisher Scientific, США),

после чего лигировали с олигонуклеотидным дуплексом, соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей (Приложение 1, Приложение 2). Продукты лигирования клонировали в штамм *E. coli* Top10 и отбирали колонии, несущие целевую конструкцию. В результате сконструировали 18 плазмидных векторов на основе lenti_sgRNA(MS2)_puro, кодирующих гРНК, нацеленные на промоторные области генов ростовых факторов.

Продукция лентивирусов и трансдукция

Для сборки лентивирусов культуральную среду клеток Phoenix-AMPHO заменяли на DMEM с 25 мкМ хлорохиндифосфата (Sigma, США) и инкубировали в течение 5 ч при 37°C и 5% CO₂. Клетки Phoenix-AMPHO трансфицировали одновременно четырьмя плазмидами (lenti_dCAS-VP64_Blast/lenti_MS2-P65-HSF1_Hygro/lenti_sgRNA(MS2)_puro/LeGo_G2 (Addgene# 25917) [19], pMD2.G (Addgene # 12259), pRSV-Rev, pMDL/pRRE [20]) с помощью полиэтиленimina: PEIMAX 40K (1 мг/мл, Polysciences, США) (соотношение ДНК : PEI = 1:3) согласно описанной ранее методике [21]. После инкубации в течение 20 мин при комнатной температуре смесь ДНК-PEI по каплям добавляли к клеткам и инкубировали в течение 6 ч. Затем среду меняли на OptiMEM с 2 мМ бутиратом натрия (Sigma). Через 48 ч среду, содержащую лентивирусы, фильтровали через 0.22-мкм фильтр (TPP, Швейцария), добавляли 100 мкг/мл протамина сульфата («Эллара», Россия) и немедленно наносили на клетки Expi293F для заражения. После инкубации в течение 24 ч среду заменяли свежей полной средой DMEM. Клетки пассировали по меньшей мере 3 раза после лентивирусной трансдукции с соответствующим антибиотиком. В случае лентивирусов lenti_dCAS-VP64-Blast использовали бластицидин в концентрации 7 мкг/мл, lenti_MS2-P65-HSF1-Hygro гиромоцидин в концентрации 300 мкг/мл, lenti_sgRNA(MS2)_puro – пуromoцидин в концентрации 2 мкг/мл. Для определения эффективности трансдукции в клетках после трех пассажей анализировали экспрессию целевого гена.

Количественная ПЦР

Трансдуцированные клетки снимали с использованием 0.05% раствора трипсина с EDTA (Gibco), центрифугировали в течение 5 мин при 500 g, отбирали надосадочную жидкость. Суммарную РНК выделяли из образцов, содержащих примерно 10⁶ клеток, с использованием реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific). Суммарную РНК обрабатывали 2 ед. акт. ДНКазы I (Thermo Fisher Scientific) в присутствии 20 ед. акт. ингибитора рибонуклеаз

(Thermo Fisher Scientific). Синтез кДНК проводили с помощью RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific) с использованием гексамерных праймеров. ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch (BioRad, США) с использованием готовой смеси для ПЦР 5X qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия). Нормализацию данных проводили по уровню референсного гена *gaph* (Приложение 1).

Измерение пролиферативной активности

Для визуализации прироста модифицированных клеток по 2×10^4 клеток высевали на лунку шестилуночного планшета, культивировали в среде DMEM с 10% ЭТС в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в углекислотном инкубаторе, затем переносили в систему многопараметрического анализа для визуализации живых клеток Celena X High Content Imaging System (Logos Biosystems, Республика Корея) и в течение 190 ч культивировали в изолированной камере при температуре 37°C и 5% CO₂. По мере испарения объем лунки восполняли питательной средой. Клетки в канале GFP (470/530 нм) снимали при 10-кратном увеличении каждые 8 ч, по 324 поля зрения на лунку, с лазерной автофокусировкой каждые 10 полей зрения. Обработку изображений выполняли с помощью программы Celena EXPLORER (Logos Biosystems).

Для сравнения роста модифицированных клеток в базовой среде без добавления ЭТС использовали метод измерения электрического сопротивления (импеданса) между электродами, расположенными на дне лунок планшета с помощью биосенсорного клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP (Agilent, США). Изменение импеданса зависит от площади контакта клеток с электродом, на основании этого параметра автоматически вычисляется клеточный индекс, характеризующий состояние клеточной культуры в момент времени. Модифицированные клетки высевали по 10⁴ клеток в лунку 16-луночного планшета E-plate (Agilent). Через 40 ч среду заменяли на свежую среду DMEM, содержащую 1.5 мкг/мл гентамицина, с 10% ЭТС или без сыворотки. Планшеты переносили в клеточный анализатор и в течение 120 ч культивировали клетки при температуре 37°C и 5% CO₂. Измерение электрического сопротивления проводили каждые 30 мин.

Влияние кондиционированной среды на рост немодифицированных клеток сравнивали с помощью колориметрического теста с соединением тетразолия. Клетки Expi293F высевали по 10⁴ в лунку 96-луночного планшета. Через 24 ч в каждую лунку добавляли по 100 мкл кондиционированной

среды от модифицированных клеток. Для получения кондиционированной среды монослой модифицированных клеток промывали PBS и инкубировали со средой Opti-MEM (Gibco) в течение 48 ч. В качестве контроля использовали кондиционированную среду от клеток Expi293F-dCas9-MS2. Среду отбирали, концентрировали в 10 раз с помощью центрифужного концентратора Microcon 3kDa (Millipore, США). Кондиционированную среду смешивали с базовой средой DMEM или Opti-MEM, содержащей 1.5 мкг/мл гентамицина, раствор аминокислот (Himedia), витаминный раствор для RPMI 1640 (Himedia), в отношении 1 : 10 и использовали в экспериментах. Через 96 ч клеткам добавляли раствор МТТ в конечной концентрации 5 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 4 ч в термостате. Добавляли солюбилизирующий раствор и измеряли поглощение при 570/690 нм на микропланшетном фотометре Multiscan Ascent (Thermo Fisher Scientific).

Иммуноблот

Для проведения вестерн-блот-гибридизации разделенные белки в ходе электрофореза переносили на PVDF-мембрану с диаметром пор 0.45 мкм (Amersham Biosciences, США). Перенос проводили в камере Hoefer TE77XP (США) при силе тока 0.8 мА/см² при ограничении напряжения 30 В в течение 1 ч. Для детекции IGF-1 использовали антитела PAA050Hu06 (CloudClone, США) в разведении 1 : 1000; для FGF-2 использовали антитела PAA551Hu01 (CloudClone) в разведении 1 : 400; для EIF3I использовали антитела DF12393 (Affinity Biosciences, Китай) в разведении 1 : 2000.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни с использованием языка программирования Python (версия 3.12) (Python Software Foundation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Получение промежуточной линии клеток Expi293F, несущей общие компоненты системы CRISPR/Cas9-SAM

Для активации экспрессии гена с помощью системы CRISPR/Cas9-SAM необходимы три компонента. В связи с этим в культуре клеток Phoenix-AMPHO были получены лентивирусные частицы, несущие интеграционную кассету, кодирующую ген слитого белка dCas9-VP64, частицы, кодирующие химерный белок MS2-p65-HSF, частицы, кодирующие гРНК. Лентивирусными частицами трансдуцировали клет-

ки Expi293F. В результате трансдукции вектором MS2-P65-HSF1_Hygro была получена линия-предшественник Expi-MS2, несущая конструкцию, кодирующую химерный белок MS2-p65-HSF. После селекции на среде, содержащей гигромицин, и клонирования, с помощью количественной ОТ-ПЦР была отобрана линия с высоким уровнем экспрессии рекомбинантного гена *MS2-P65-HSF1*. Далее линию Expi-MS2 трансдуцировали лентивирусными частицами dCas9-VP64 с целью получения линии-предшественника Expi-dCas9-MS2, кодирующей химерный белок MS2-p65-HSF и дефектную нуклеазу dCas9-VP64. После трансдукции клеток проводили селекцию на среде, содержащей гигромицин и бластицидин. Экспрессию рекомбинантных генов подтверждали количественной ОТ-ПЦР. Таким образом была получена линия-предшественник Expi293F, кодирующая два компонента системы CRISPR/Cas9-SAM, пригодная для трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими специфичную гРНК.

Получение линий клеток с активированной экспрессией генов ростовых факторов

Для целевой активации экспрессии одного из четырех выбранных генов клетки линии Expi-dCas9-MS2 трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими гРНК. Как описано выше, к каждому из выбранных ростовых факторов сконструировали по шесть векторов и получили лентивирусные частицы. Векторам были присвоены названия, соответствующие первой букве названия гена и порядковому номеру протоспейсерной последовательности (Приложение 2). Далее было необходимо выбрать наиболее перспективные гРНК, которые обеспечивают повышение уровня экспрессии генов ростовых факторов IGF-1, FGF-2 и EIF3I. После трансдукции клетки культивировали в течение 72 ч. Транскрипционную активацию генов ростовых факторов определяли с помощью количественной ОТ-ПЦР (рис. 1).

Показано наличие экспрессии гена *IGF-1* при использовании четырех гРНК из шести. Поскольку в клетках эмбриональной почки человека *IGF-1* не экспрессируется, оценить изменение уровня экспрессии невозможно. В дальнейшей работе исследовали линии, полученные с использованием гРНК i2 и i5, при анализе которых с помощью ПЦР-РВ наблюдалось наименьшее значение порогового цикла (табл. 1). Определение уровня экспрессии гена *FGF-2* показало, что экспрессия всех гРНК приводит к увеличению экспрессии *FGF-2* – в 2–5 раз. Для дальнейшей работы были выбраны гРНК f5 и f6 (табл. 1). Показано также, что экспрессия всех шести гРНК приводит к увеличению уровня экс-

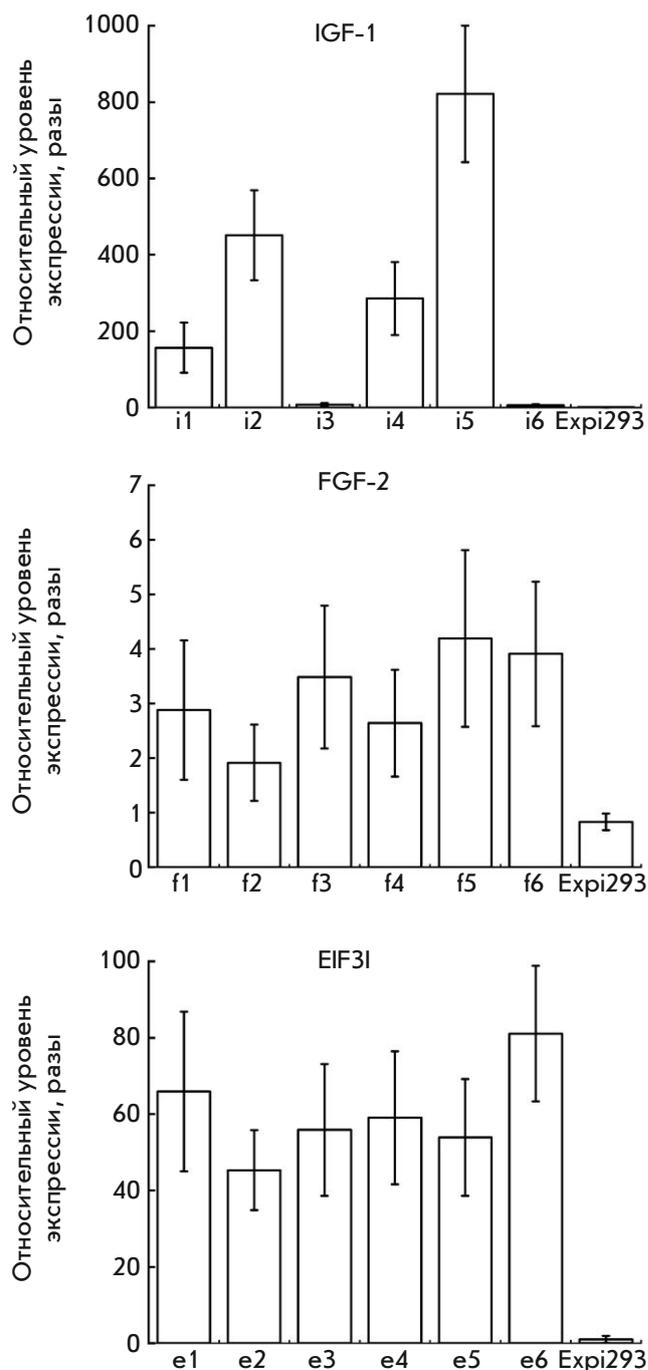


Рис. 1. Анализ уровня экспрессии генов ростовых факторов IGF-1, FGF-2, EIF3I в клеточных линиях Expi-dCas9-MS2, трансдуцированных лентивирусными векторами, кодирующими гидовые РНК, нацеленные на промоторные регионы соответствующих генов. Экспрессию генов *IGF-1*, *FGF-2*, *EIF3I* активировали с использованием лентивирусных векторов, кодирующих гРНК i1–i6, f1–f6, e1–e6 (ось абсцисс) (Приложение 2). Представлены средние значения относительно уровня экспрессии со стандартными отклонениями

Таблица 1. Протоспейсерные последовательности гидовых РНК, обеспечивающих наибольший уровень экспрессии целевых генов

Ген	Протоспейсер	Конструкция
<i>IGF-1</i>	AGGCATACAATGGAAATAGG	i2
<i>IGF-1</i>	GTGTTTTGTAGATAAATGTG	i5
<i>FGF-2</i>	GGCCGAACCGCCGAACCTCAG	f5
<i>FGF-2</i>	CGCGCGACATCAGTCCGGCG	f6
<i>EIF3I</i>	AGGATCCTTCCAGGGCAAAG	e1
<i>EIF3I</i>	GAATGTCTTTTCTTGGAGGG	e6

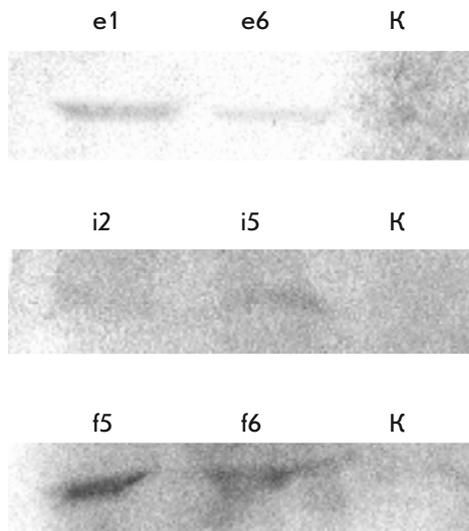


Рис. 2. Иммуноблот образцов культуральной жидкости клеток Expi293F с активированной экспрессией генов ростовых факторов. Образцы e1, e6 – клетки с активированной экспрессией гена *EIF3I*; f5, f6 – клетки с активированной экспрессией гена *FGF-2*; i2, i5 – клетки с активированной экспрессией гена *IGF-1*. К – клетки Expi293F

прессии гена фактора *EIF3I* в 44–81 раз. Далее исследовали линии, полученные с использованием гРНК e1 и e6 (табл. 1).

Обнаружение индуцированного накопления ростовых факторов с помощью иммуноблотинга

Продукты экспрессии активированных генов выявляли методом вестерн-блот-гибридизации с применением антител, специфичных к исследуемым факторам роста. В случае секретируемых факторов роста (*IGF-1*, *FGF-2*) анализировали культуральную среду, для обнаружения внутриклеточного фактора роста (*EIF3I*) анализировали клеточные лизаты (рис. 2).

В ходе анализа факторы *EIF3I*, *IGF-1*, *FGF-2* обнаружены в среде культивирования клеток, транс-

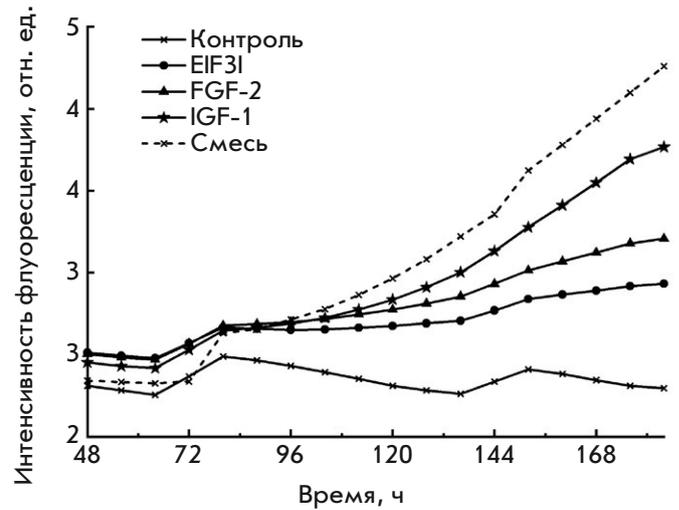


Рис. 3. Анализ пролиферативной активности модифицированных клеточных линий. Клетки Expi293F-dCas9-MS2 (GFP), культивируемые в среде DMEM с 10% ЭТС, были трансдуцированы лентивирусными векторами, кодирующими гРНК, для активации экспрессии генов ростовых факторов. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью системы визуализации Celena X. Суммарное значение флуоресценции в полях зрения получали с помощью программного обеспечения Fiji [22]. Контроль – клетки Expi293F-dCas9-MS2 (GFP), *EIF3I*, *FGF-2*, *IGF-1* – клетки с повышенной экспрессией генов соответствующих ростовых факторов, полученные в ходе трансдукции лентивирусными векторами, кодирующими гРНК e6, f6 и i2 соответственно, смесь – совместное культивирование клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I

дуцированных лентивирусными векторами, кодирующими гРНК e1, e6, i2, i5, f5, f6 (табл. 1).

Пролиферация модифицированных клеточных линий

Пролиферативную активность клеточных линий изучали с использованием системы многопараметрического анализа Celena X High Content Imaging System. С целью облегчения визуализации и последующей обработки данных клетки Expi293F-dCas9-MS2 трансдуцировали лентивирусным вектором, кодирующим зеленый флуоресцентный белок, а затем лентивирусными векторами e1, e6, i2, i5, f5, f6, чтобы активировать экспрессию генов ростовых факторов. Пролиферацию оценивали путем анализа изменения уровня интенсивности флуоресценции клеток за счет накопления в них белка eGFP. Помимо клеточных линий, экспрессирующих лишь один из исследуемых факторов (*IGF-1*, *EIF3I* и *FGF-2*), исследовали и смешанную культуру всех трех линий для оценки возможного синергичного эффекта (рис. 3).

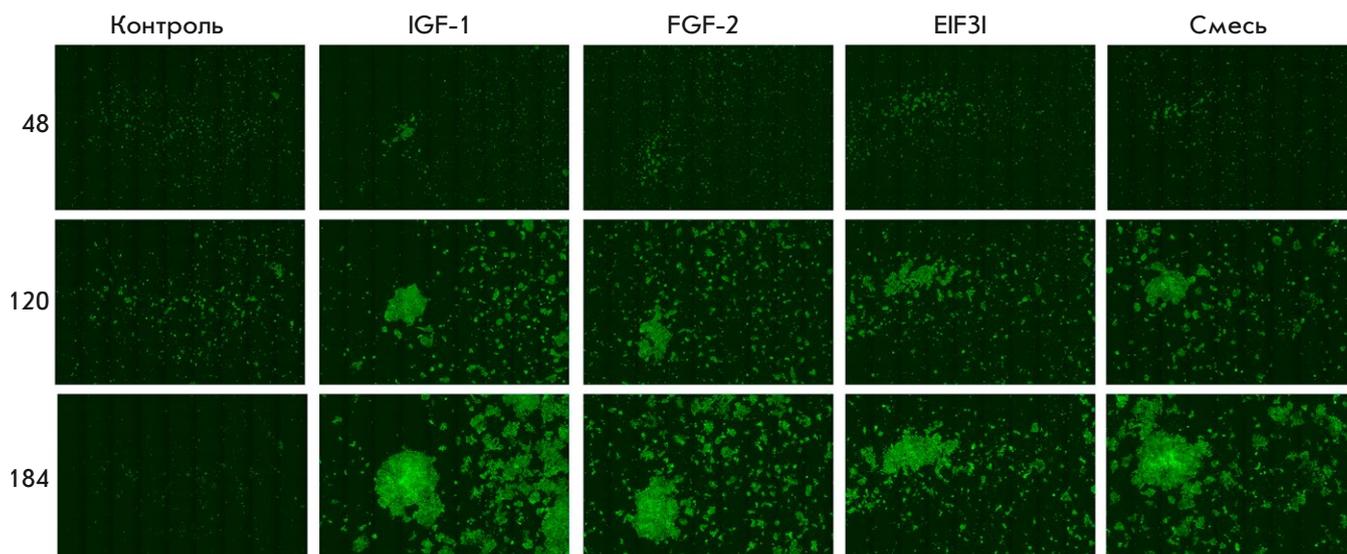


Рис. 4. Сравнение прироста модифицированных клеток, экспрессирующих гены ростовых факторов IGF-1, FGF-2 и EIF3I. Контроль – клетки Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированные лентивирусным вектором LeGo-G2. IGF-1, FGF-2 и EIF3I – клетки Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированные лентивирусным вектором LeGo-G2 и векторами i2, f6 и e6 соответственно. Смесь – совместное культивирование клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I. Изображения получены с помощью системы Celena X High Content Imaging System. Каждое изображение содержит 72 поля зрения

В результате показано увеличение пролиферативной активности как клеток с повышенным уровнем экспрессии факторов IGF-1, EIF3I и FGF-2 по отдельности (*рис. 4*), так и при их совместном культивировании. При этом пролиферативная активность была выше при совместном культивировании.

Пролиферацию клеток в базовой бессывороточной среде изучали с использованием клеточного анализатора xCELLigence RTCA DP, позволяющего оценивать жизнеспособность клеточных культур в режиме реального времени без дополнительных маркеров и меток. Показано, что пролиферативная активность совместно культивируемых клеток, экспрессирующих IGF-1, EIF3I и FGF-2, в среде DMEM без добавления ЭТС была выше, чем у немодифицированных клеток (*рис. 5A*), но ниже, чем у немодифицированных клеток, культивируемых в среде, содержащей 10% ЭТС. При культивировании клеток, продуцирующих один из исследуемых факторов, повышения пролиферативной активности не наблюдали (*рис. 5B–Г*).

Таким образом, совместное культивирование модифицированных клеток, экспрессирующих IGF-1, EIF3I и FGF-2, в среде без ЭТС повышает их пролиферативную активность по сравнению с контрольными клетками.

Влияние секретируемых ростовых факторов на жизнеспособность интактных клеток

Для оценки влияния секретируемых ростовых факторов на жизнеспособность интактных клеток собирали кондиционированную среду, фильтровали и добавляли к клеткам Expi293F. Через 96 ч измеряли жизнеспособность клеток с помощью колориметрического теста (*рис. 6*). Показано, что метаболическая активность клеток, в отличие от контрольных образцов, повышается при добавлении кондиционированной среды от клеток, экспрессирующих отдельные факторы (IGF-1, EIF3I и FGF-2). Смесь кондиционированных сред также положительно влияет на жизнеспособность интактных клеток. Разница в жизнеспособности клеток при использовании среды Opti-MEM (*рис. 6A*) или DMEM (*рис. 6B*) была несущественной.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективного производства рекомбинантных белков в медицинских целях желательно иметь культуры клеток человека, способные к суспензионному культивированию и способные расти в жидких средах как можно более простого состава, не содержащих, в идеале, компонентов животного происхождения. Культура клеток человека способна генерировать белки, процессинг которых

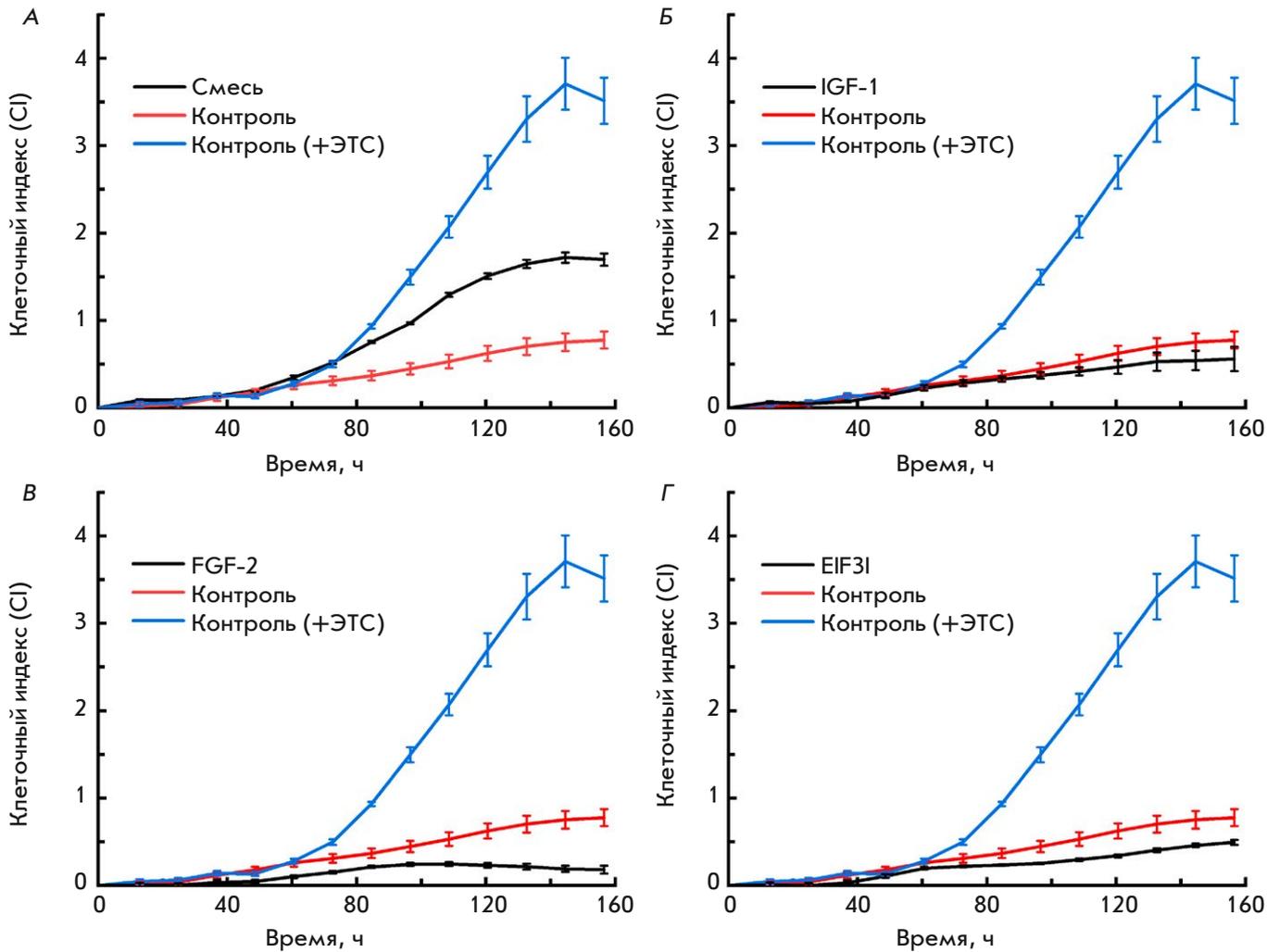


Рис. 5. Анализ пролиферации модифицированных клеток в базовой бессывороточной среде DMEM в режиме реального времени. Клеточный индекс — это вычисляемый параметр, который определяется электрическим сопротивлением между электродами и зависит от площади контакта клеток с электродом, расположенным на дне лунки планшета. Этот параметр характеризует состояние клеточной культуры в определенный момент времени. Контроль — клетки Expi293F-dCas9-MS2, культивируемые в среде DMEM; контроль (+ЭТС) — клетки Expi293F-dCas9-MS2, культивируемые в среде DMEM с 10% ЭТС; А — анализ пролиферативной активности клеток Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I при совместном культивировании; Б — анализ пролиферативной активности клеток Expi-IGF1; В — анализ пролиферативной активности клеток Expi-FGF2; Г — анализ пролиферативной активности клеток Expi-EIF3I. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение для $n = 4$

максимально близок к процессингу в организме человека. Суспензионное культивирование позволяет использовать для роста культуры биореакторы и относительно легко масштабировать производство. Простой состав сред обеспечивает экономическую эффективность, а минимизация использования добавок животного происхождения позволяет избежать загрязнения конечного продукта нежелательными примесями. В этой работе мы опробовали принципиальный подход, который возможно позволит получить подобные клеточные культуры

для биотехнологических целей. Наш подход заключается в избирательной активации экспрессии эндогенных генов, кодирующих белковые факторы, повышающие пролиферацию клеток.

Наиболее часто используемая в биотехнологии линия клеток человека — клетки эмбриональной почки человека HEK293. Мы использовали клеточную линию Expi293F — суспензионный вариант клеточной линии HEK293, оптимизированный для высокоэффективной продукции рекомбинантных белков, а также для культивирования при повышен-

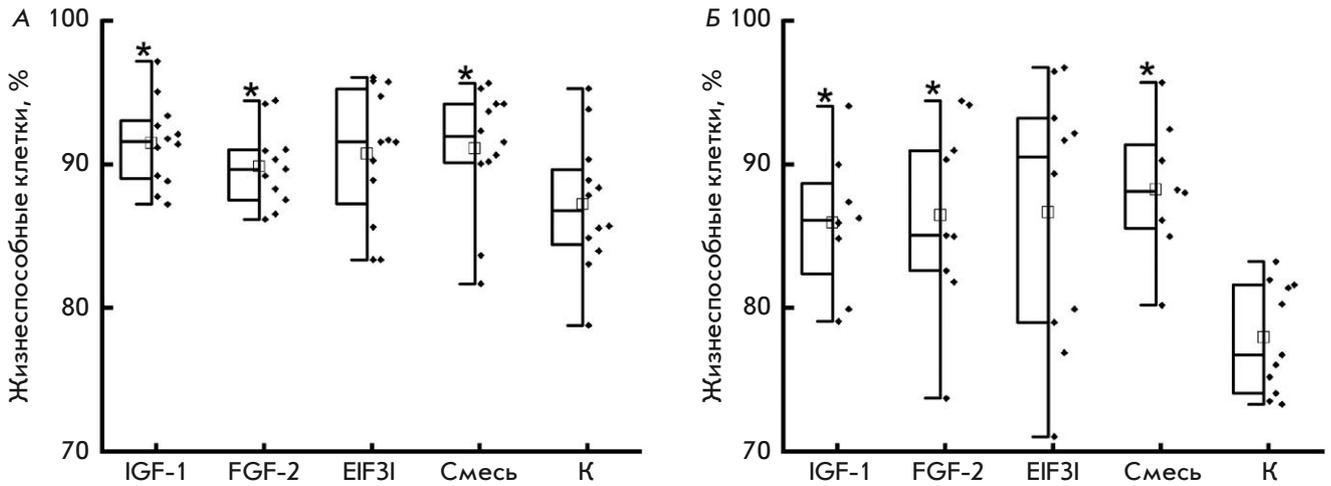


Рис. 6. Оценка жизнеспособности клеток, культивируемых в присутствии кондиционированной среды от модифицированных клеток. IGF-1, FGF-2, EIF3I, смесь, К – кондиционированная среда от соответствующих клеточных линий Expi293F-dCas9-MS2, трансдуцированных лентивирусными векторами i2, f6 и e6 соответственно. В качестве контроля использовали культуральную среду от немодифицированных клеток Expi293F-dCas9-MS2. Данные представлены в виде диаграммы диапазонов, где ящик – 25–75% интервал, усы – интерквартильный размах, черта – медиана, квадрат – среднее значение, статистически значимые отличия от контрольной группы при $p < 0.05$ выделены (*). Точками отмечены значения жизнеспособности в каждом повторе. А – кондиционированная среда, смешанная со средой Orti-MEM, Б – кондиционированная среда, смешанная во средой DMEM, без добавления ЭТС

ной плотности (культура остается жизнеспособной при плотности 5×10^6 клеток/мл) и времени удвоения около 24 ч [16]. Для пролиферации Expi293F требуется ряд ростовых факторов [23]. Наш подход заключается в том, чтобы не добавлять ростовые факторы в питательную среду, а активировать экспрессию соответствующих генов в самих клетках. В настоящее время имеется мощный инструмент избирательной активации генов – технология синергичных медиаторов активации (CRISPR/Cas9-SAM), которая является вариацией CRISPR/Cas9-системы геномного редактирования. В ней используется гРНК, которая комплементарно связывается с выбранным участком промотора активируемого гена. Как и при геномном редактировании, с гРНК связывается белок Cas9. Мы использовали мутантный вариант этого белка, лишенный нуклеазной активности и слитый с тетрамером VP64, что позволяет привлечь транскрипционные факторы и активировать синтез мРНК [24].

В качестве первой цели мы выбрали гены трех факторов – IGF-1, FGF-2, EIF3I. Известно, что инсулин необходим для пролиферации клеток в бессывороточной среде [25] и используется в некоторых модифицированных базовых средах. Наряду с инсулином существует множество инсулиноподобных факторов роста (IGF), которые также стимулируют пролиферацию клеток. IGF-1 и инсулин принадлежат к одному и тому же семейству и имеют

сходные третичные структуры. Кроме того, активация экспрессии гена *IGF-1* путем геномного редактирования оказывает положительный эффект на пролиферацию клеток [26]. Факторы роста фибробластов (FGF-1 и FGF-2) являются важным компонентом среды культивирования клеток, особенно для поддержания их способности к пролиферации [12]. Эти белки получали в клетках *Escherichia coli* и в клетках эукариот. При этом показано, что FGF-1 и FGF-2 склонны к протеолитической деградации и денатурации в клеточной среде, что приводит к относительно короткому периоду полужизни этих факторов, а рекомендуемые концентрации (10–100 нг/мл) затрудняют их использование в качестве добавок к среде [27, 28]. Пролиферацию клеточной культуры регулируют путем замедления или ускорения переходов между различными фазами клеточного цикла. Повышение скорости роста за счет сверхэкспрессии генов, которые способствуют G1/S-переходу, таких, как эукариотический фактор инициации 3 (EIF3), усиливает продукцию рекомбинантного белка. EIF3 является крупным мультидоменным белком, отдельные субъединицы которого также обладают функциональной активностью [13]. EIF3I, как показано ранее, участвует в увеличении пролиферативной активности клеток при повышении уровня экспрессии гена этого фактора, а также в ее снижении при нокауте [29]. Кроме того, описано повышение скорости роста культуры при сверх-

экспрессии таких генов, как *eIF3I*, способствующих G1/S-переходу [30].

На первом этапе мы секвенировали промоторные области выбранных генов. Далее требовалось получить модифицированную линию клеток Expi293F, экспрессирующую белки dCAS-VP64 и MS2-P65-HSF1, необходимые для работы системы CRISPR/Cas9-SAM [17]. Экспрессия введенных генов на уровне РНК подтверждена с помощью количественной ОТ-ПЦР. Затем нужно было модифицировать полученную линию Expi-dCas9-MS2, вводя в ее геном один из рекомбинантных генов, кодирующих гРНК. Однако гРНК, специфичные к разным областям промотора, могут обладать разной эффективностью. Поэтому мы подобрали по шесть последовательностей протоспейсерных участков гРНК к каждой мишени, чтобы сравнить их влияние на активацию экспрессии. Сравнение проводили методом количественной ОТ-ПЦР. Скорее всего, каждый из ростовых факторов имеет свой оптимальный уровень экспрессии, однако определение этого уровня представляет отдельное большое исследование, поэтому для начала мы выбрали по одному варианту гРНК для каждого гена, которые обеспечивали наибольшую активацию транскрипции.

Активация транскрипции по целому ряду причин не всегда ведет к накоплению соответствующего белка. Присутствие в каждой из трех отобранных модифицированных линиях клеток одного из трех белков мы подтверждали методом иммуноблоттинга. Показано наличие целевых белков – факторов EIF3, IGF-1, FGF-2. На данном этапе работы присутствие факторов роста оценивали только качественно.

На первом этапе изучения пролиферации модифицированных клеток мы использовали базовую питательную среду DMEM с добавлением 10% ЭТС, а также систему визуализации Celena X High Content Imaging System. Эта система способна делать микроснимки поверхности культуральных планшетов в реальном времени. В этом исследовании клеточные линии Expi-IGF1, Expi-FGF2, Expi-EIF3I заражали лентивирусными частицами, кодирующими зеленый флуоресцентный белок. Несмотря на то, что система Celena X позволяет анализировать клетки в проходящем свете, использование флуоресцентных белков облегчает визуализацию исследуемых клеток, а величину суммарной флуоресценции можно использовать как количественный показатель. Лентивирусный вектор был выбран потому, что рекомбинантный ген зеленого флуоресцентного белка в его составе интегрируется в геномную ДНК клетки и передается в ходе деления клеток без потерь, которые возникают при транзientной трансфекции плазмидных

ДНК. В результате оказалось, что все три модифицированные линии клеток растут быстрее, чем контрольная линия (рис. 3, 4). Самое большое влияние на пролиферацию оказывает повышение экспрессии гена фактора IGF-1. В то же время при совместном культивировании всех трех модифицированных линий пролиферативный эффект был больше, чем каждой линии в отдельности. Увеличение пролиферативной активности клеток, культивируемых в базовой бессывороточной среде, наблюдалось только при совместном культивировании клеток, продуцирующих все три фактора роста, однако пролиферация этих клеток была ниже, чем при культивировании в среде, содержащей ЭТС (рис. 5). Усиление роста клеток при совместном культивировании вполне ожидаемо, так как для пролиферации клеток в культуре требуется вся совокупность ростовых факторов. Несмотря на это, трех факторов недостаточно, чтобы полностью перейти на использование базовых сред без добавления ЭТС. Кроме того, в отсутствие ЭТС не наблюдается повышения пролиферации при культивировании клеток, продуцирующих один из факторов (рис. 5Б–Г). Однако вклад одиночных факторов заметен в присутствии ЭТС (рис. 3, 4). Стимуляция пролиферации линий клеток, экспрессирующих фактор EIF3I, с помощью ЭТС описана ранее [30].

Нами также проанализировано влияние кондиционированной среды от модифицированных линий, которые инкубировали в течение 48 ч в среде Opti-MEM, на жизнеспособность клеток Expi293F. Данная среда была выбрана для начального культивирования, поскольку она обеспечивает хороший рост культуры и не содержит ЭТС, которая может нивелировать действие исследуемых факторов. Кондиционированная среда от модифицированных клеточных линий повышает метаболическую активность интактных клеток по сравнению с контролем. Наблюдаемый эффект касался как сред от клеточных линий, экспрессирующих один из факторов, так и смеси кондиционированных сред.

Полученные результаты позволяют нам предположить, что путем тщательного подбора активируемых генов и контроля уровня их активации можно создать линию клеток человека, которая будет либо не столь зависима от экзогенных сигнальных белков, либо даже полностью не будет зависеть от них. Получение такой линии позволит существенно удешевить и упростить производство рекомбинантных белков для использования в медицинских целях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием технологии синергичных медиаторов активации CRISPR/Cas9-SAM нами получе-

на линия клеток человека Expi293F с повышенным уровнем экспрессии генов, кодирующих факторы IGF-1, FGF-2, EIF3I. В результате показана активация экспрессии целевых генов как на уровне мРНК, так и на уровне белков. Модифицированные клеточные линии обладают повышенной пролиферативной активностью в стандартных условиях культивирования, а также при совместном культивировании трех линий-продуцентов в базовой среде DMEM без добавления ЭТС. На наш взгляд, полу-

ченные результаты говорят о возможности использования выбранного нами подхода в биотехнологии. Мы считаем, что активация различных эндогенных генов ростовых факторов позволит получить линии клеток с повышенной продуктивностью, растущие на простых и дешевых питательных средах. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда № 23-24-00012,
<https://rscf.ru/project/23-24-00012/>.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minonzio G., Linetsky E. // CellR4. 2014. V. 2. № 6. P. 1–10.
2. Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., et al. // Altern. Lab. Anim. 2005. V. 33. № 3. P. 261–287.
3. Stout A.J., Mirliani A.B., Rittenberg M.L., Shub M., White E.C., Yuen J.S.K., Kaplan D.L. // Comm. Biol. 2022. V. 5. № 1. P. 1–13.
4. Ahmed S., Chauhan V.M., Ghaemmaghami A.M., Aylott J.W. // Biotechnol. Lett. 2018. V. 41. № 1. P. 1–25.
5. Li W., Fan Z., Lin Y., Wang T.Y. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 1–11.
6. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., et al. // J. Biotechnol. 2012. V. 161. № 3. P. 336–348.
7. Jefferis R. // J. Immunol. Res. 2016. V. 2016. P. 1–15.
8. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. P. 1–9.
9. Sun H., Wang S., Lu M., Tinberg C.E., Alba B.M. // PLoS One. 2023. V. 18. № 6. P. 1–25.
10. Kumar N., Gammell P., Clynes M. // Cytotechnology. 2007. V. 53. № 1–3. P. 33.
11. Guan N., Liu Z., Zhao Y., Li Q., Wang Y. // Drug Deliv. 2020. V. 27. № 1. P. 1438.
12. Mossahebi-Mohammadi M., Quan M., Zhang J.S., Li X. // Front. Cell Dev. Biol. 2020. V. 8. P. 1–10.
13. Roobol A., Roobol J., Smith M.E., Carden M.J., Hershey J.W.B., Willis A.E., Smales C.M. // Metab. Eng. 2020. V. 59. P. 98.
14. Voorhamme D., Yandell C.A. // Mol. Biotechnol. 2006. V. 34. № 2. P. 201–204.
15. Mendes J.M.F., Valverde L. de F., Vidal M.T.A., Paredes B.D., Coelho P., Allahdadi K.J., Coletta R. Della, Souza B.S. de F., Rocha C.A.G. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 18. P. 1–20.
16. Fang X.T., Sehlin D., Lannfelt L., Syvänen S., Hultqvist G. // Biol. Proced. Online. 2017. V. 19. № 1. P. 1–9.
17. Joung J., Konermann S., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Platt R.J., Bringham M.D., Sanjana N.E., Zhang F. // Nat. Protocols 2017. V. 12. № 4. P. 828–863.
18. Bobrovsky P.A., Moroz V.D., Lavrenova V.N., Manuvera V.A., Lazarev V.N. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 11. P. 1310–1318.
19. Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. // Mol. Ther. 2008. V. 16. № 4. P. 698–706.
20. Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L. // J. Virol. 1998. V. 72. № 11. P. 8463–8471.
21. Tiscornia G., Singer O., Verma I.M. // Nat. Protocols. 2006. V. 1. № 1. P. 241–245.
22. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al. // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
23. Abaandou L., Quan D., Shiloach J. // Cells. 2021. V. 10. № 7. P. 1–21.
24. Omachi K., Miner J.H. // PLoS One. 2022. V. 17. № 6. P. 1–13.
25. Soos M.A., Field C.E., Siddle K. // Biochem J. 1993. V. 290. № 2. P. 419–426.
26. Roberston M.J., Raghunathan S., Potaman V.N., Zhang F., Stewart M.D., McConnell B.K., Schwartz R.J. // FASEB J. 2020. V. 34. № 1. P. 555.
27. Yang Z., Xiong H.-R. // Biomedical Tissue Culture. 2012. <https://www.intechopen.com/chapters/40247>
28. Sedlář A., Trávníčková M., Matějka R., Pražák Š., Mészáros Z., Bojarová P., Bačáková L., Křen V., Slámová K. // Internat. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 1843.
29. Yuan Y., Zhang Y., Yao S., Shi H., Huang X., Li Y., Wei Y., Lin S. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 41. P. 28310–28323.
30. Ahlemann M., Zeidler R., Lang S., Mack B., Münz M., Gires O. // Mol. Carcinog. 2006. V. 45. № 12. P. 957–967.

Приложение 1

Таблица 1. Список олигонуклеотидов, использованных в работе

Название	Последовательность 5'→3'	Применение
igf1_F	TGGGTTTTACAGCTCGGCAT	Секвенирование
igf1_R	GGAACAGCTGGGGGAACAT	Секвенирование
fgf2_F	AAGCCTGCTCTGACACAGAC	Секвенирование
fgf2_R	GTTACGATGGGTGTCTCC	Секвенирование
eif3i_F	GGGATCCACACTGGTTGAGG	Секвенирование
eif3i_R	TCACTCGTCTGCATTCAGGG	Секвенирование
i1_F	CACCGTGTAGACAGGAAACAGCTGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i1
i1_R	AAACCCAGCTGTTTCCTGTCTACAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i1
i2_F	CACCGAGCATACAATGGAATAGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i2
i2_R	AAACCTATTTCCATTGTATGCCTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i2
i3_F	CACCGTATTTCCAAGTGAGTGAGT	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i3
i3_R	AAACACTCACTCACTTGGAAATACC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i3
i4_F	CACCGCACTAACACACATTCTTTTA	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i4
i4_R	AAACTAAAAGAATGTGTGTTAGTGC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i4
i5_F	CACCGTGTTTTGTAGATAAATGTG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i5
i5_R	AAACCACATTTATCTACAAAACACC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i5
i6_F	CACCGCTAGTTTTTAAAATGCAA	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i6
i6_R	AAACTGCAATTTTAAAACATAGAGCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-i6
f1_F	CACCGATAAGGGCGGTGGAGCCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f1
f1_R	AAACGGGCTCCACCGCCCCTTATCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f1
f2_F	CACCGGCAGGGCTTTGGCATTCCT	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f2
f2_R	AAACGGGAATGCCAAAGCCCTGCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f2
f3_F	CACCGGGCCGGCCTCTGAGTTCGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f3
f3_R	AAACCCGAACCTCAGAGGCCGGCCCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f3
f4_F	CACCGGAATGCCAAAGCCCTGCCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f4
f4_R	AAACCGGCAGGGCTTTGGCATTCCT	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f4
f5_F	CACCGCCGAACCGCCGAATCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f5
f5_R	AAACCTGAGTTCGCGCGTTCGGCCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f5
f6_F	CACCGCGCGACATCAGTCCGGCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f6
f6_R	AAACCGCCGACTGATGTCGCGCGC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-f6
e1_F	CACCGAGGATCCTTCCAGGGCAAAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e1
e1_R	AAACCTTTGCCCTGGAAGGATCCTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e1
e2_F	CACCGACATTTGTGAGCCTTTCCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e2
e2_R	AAACCTGGAAAGGCTCACAAATGTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e2
e3_F	CACCGTGCAGGATGGGAACTAGCAG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e3
e3_R	AAACCTGCTAGTTCCTATCCTGCAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e3
e4_F	CACCGATGAATTCGAGGCGAGGGTC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e4
e4_R	AAACGACCTCGCCTCGAATTCATC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e4
e5_F	CACCGTGGGTTGTAGCAGGGGTCG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e5
e5_R	AAACCGACCCCTGCTACAACCCAC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e5
e6_F	CACCGAATGTCTTTTCCTTGGAGGG	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e6
e6_R	AAACCCCTCCAAGGAAAGACATTCC	Сборка sgRNA(MS2)_puro-e6
q_igf1_F	CTCTCAGTTCGTGTGTGGAGAC	ПЦР-PB
q_igf1_R	CAGCCTCCTTAGATCACAGCTC	ПЦР-PB
q_fgf2_F	AGCGGCTGTACTGCAAAAACGG	ПЦР-PB
q_fgf2_R	CCTTTGATAGACACAATCCTCTC	ПЦР-PB
q_eif3i_F	CAGAACGTCCTGTCAACTCAGC	ПЦР-PB
q_eif3i_R	CTTGCCAATCCTGGTAGGAGGTT	ПЦР-PB
q_cas_F	AACCTATGCCACCTGTTCG	ПЦР-PB
q_cas_R	AGGATTGTCTTGCCGGACTG	ПЦР-PB
q_ms2_F	CTGGGAGAGGGCTCCTACTT	ПЦР-PB
q_ms2_R	TCATGGTTGGGCCAGGATTC	ПЦР-PB
gapdhF	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ПЦР-PB
gapdhR	ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA	ПЦР-PB

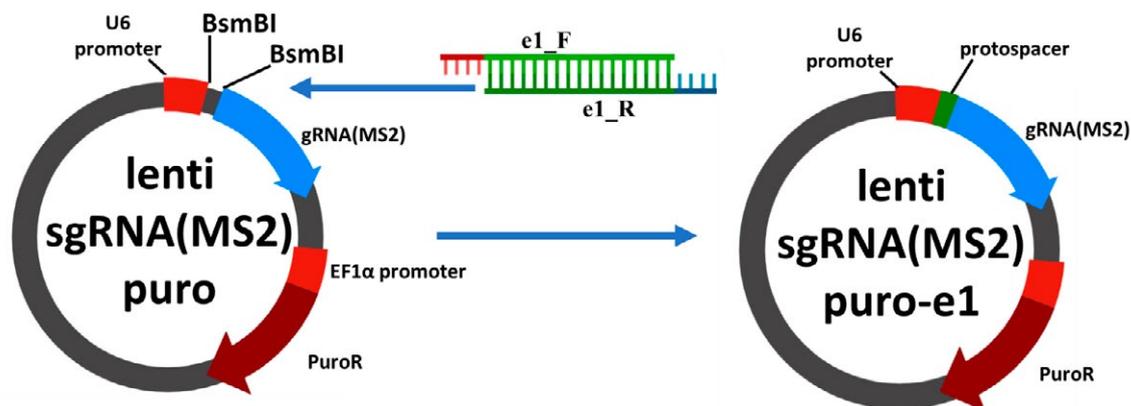


Рис. 1. Схема сборки плазмид серии lenti sgRNA(MS2)_puro. Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti_sgRNA(MS2)_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI, после чего вектор был лигирован с олигонуклеотидным дуплексом, соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей (табл. 1). Продукты лигирования клонировали с использованием штамма *E. coli* Top10. Структуру вставки подтверждали секвенированием

Приложение 2

Таблица 1. Список плазмид с полными и рабочими названиями для специфической активации экспрессии генов ростовых факторов

Полное название плазмиды	Дуплекс	Сокращенное название	Ген
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e1	e1_F/e1_R	e1	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e2	e2_F/e2_R	e2	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e3	e3_F/e3_R	e3	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e4	e4_F/e4_R	e4	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e5	e5_F/e5_R	e5	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-e6	e6_F/e6_R	e6	EIF3I
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f1	f1_F/f1_R	f1	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f2	f2_F/f2_R	f2	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f3	f3_F/f3_R	f3	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f4	f4_F/f4_R	f4	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f5	f5_F/f5_R	f5	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-f6	f6_F/f6_R	f6	FGF-2
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i1	i1_F/i1_R	i1	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i2	i2_F/i2_R	i2	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i3	i3_F/i3_R	i3	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i4	i4_F/i4_R	i4	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i5	i5_F/i5_R	i5	IGF-1
lenti_sgRNA(MS2)_puro-i6	i6_F/i6_R	i6	IGF-1

Плазмиды для специфической активации экспрессии генов ростовых факторов сконструированы на основе вектора lenti_sgRNA(MS2)_puro (Addgene # 73795). Для получения вектора, кодирующего химерную гидовую РНК, вектор lenti_sgRNA(MS2)_puro был обработан эндонуклеазой рестрикции BsmBI, после чего вектор был лигирован с олигонуклеотидным дуплексом (последовательность праймеров указана в Приложении 1), соответствующим одной из протоспейсерных последовательностей.

УДК 577.2:616-06

Корреляционные закономерности коэкспрессии микроРНК с таргетными мРНК – транскриптами при глиоме у пациентов с диким и мутированным типом генов изоцитратдегидрогеназы

А. А. Бондарев¹, А. С. Евпак¹, А. Л. Новоселов¹, А. А. Кудряева¹, А. А. Белогуров^{1,2*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Российский университет медицины Минздрава России, Москва, 127473 Россия

*E-mail: belogurov@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 28.12.2023

Принята к печати 01.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27363

РЕФЕРАТ Глиомы низкой степени злокачественности (ГНСЗ) подразделяют на два основных генетических фенотипа на основе наличия или отсутствия мутаций в генах *IDH*, кодирующих изоцитратдегидрогеназу. Известно, что мутационный фенотип *IDH* (*IDHmut*), в отличие от фенотипа дикого типа (*IDHwt*), характеризуется более положительным ответом на фармакологическое вмешательство и значительно большим временем дожития. В настоящем исследовании проведен анализ дифференциальной коэкспрессии 225000 пар микроРНК–мРНК на уровне корреляционных связей между уровнями микроРНК и их потенциальными мРНК-мишенями в группах *IDHmut* и *IDHwt*. Анализ ассоциативных связей отдельных представителей отобранных пар выявил, что в группе *IDHwt* повышен уровень мРНК генов *ELN*, *ARL4C*, *C9orf64*, *PLAT*, *FKBP9*, что характерно для агрессивного течения глиомы. Вместе с тем, уровень микроРНК-182, микроРНК-455 и микроРНК-891a, ассоциированных с негативным прогнозом при глиоме, в целом повышен в группе *IDHmut*. Обнаружена 21 пара микроРНК–мРНК с достоверными различиями в регуляции в образцах глиомы *IDHwt* и *IDHmut*, большая часть (16/21) которых имеет слабую или средней степени положительную корреляцию в образцах *IDHmut* и отрицательную корреляцию в образцах *IDHwt*. Таким образом, наши данные свидетельствуют, что образцы глиом из группы *IDHmut* с положительным прогнозом потенциально обладают в значительной степени менее выраженной способностью к микроРНК-опосредованной регуляции. Есть все основания предполагать, что подобные нарушения могут приводить к сниженной жизнеспособности опухоли и, как следствие, к повышенной способности организма сопротивляться распространению злокачественной трансформации клеток с этим генетическим фенотипом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глиомы низкой степени злокачественности, микроРНК, дифференциальная экспрессия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГНСЗ – глиомы низкой степени злокачественности; ЗНО – злокачественные новообразования; *IDH* – изоцитратдегидрогеназа.

ВВЕДЕНИЕ

Частота заболеваемости глиомами составляет около 6.6 на 100000 населения и почти у половины пациентов диагностируют глиобластому. Данные по заболеваемости злокачественными новообразованиями (ЗНО) головного мозга в Российской Федерации довольно противоречивы. По разным оценкам частота подобных ЗНО может достигать 23 человек на 100000 населения, при этом заболеваемость глио-

мами составляет 10–13 человек на 100000 населения [1]. С возрастом вероятность возникновения этой патологии резко возрастает: с 0.15 в детском возрасте до 15 на 100000 населения у пожилых людей в возрасте 75–84 лет [2].

Причины увеличения частоты заболеваемости глиомами остаются не до конца выясненными. Возможно, это связано с массовым внедрением высокотехнологичных методов диагностики ЗНО

головного мозга в клиническую практику, таких, как магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная томография [2]. В качестве причины возникновения глиом изучено множество внешних факторов окружающей среды, однако статистически значимое увеличение риска возникновения глиом на текущий момент связывают только с воздействием ионизирующего излучения [3–5].

микроРНК – это небольшие некодирующие молекулы РНК, которые регулируют экспрессию генов путем связывания с мРНК-мишенями, что приводит к их деградации или ингибированию трансляции [6]. Многочисленные исследования выявили значительное изменение экспрессии микроРНК в процессе злокачественной трансформации. С учетом этих результатов микроРНК в настоящее время активно позиционируются в качестве потенциальных диагностических или прогностических биомаркеров. Экспрессия микроРНК нарушается при ЗНО человека через различные механизмы, такие, как амплификация или делеция генов микроРНК, аномальный контроль транскрипции микроРНК, эпигенетические изменения и дефекты в механизмах процессинга микроРНК. микроРНК могут классифицироваться как онкогены или гены-супрессоры опухолей.

Генетические особенности глиом активно используют для классификации опухолей и выбора оптимальной стратегии лечения пациента. Ранее было предпринято несколько попыток характеристики глиом низкой степени злокачественности с генами изоцитратдегидрогеназы (*IDH*) дикого и мутированного типов с помощью сигнатур микроРНК [7–9]. В данном исследовании изучены корреляционные закономерности коэкспрессии микроРНК со своими потенциальными таргетными транскриптами в группах пациентов с глиомами низкой степени злокачественности с диким и мутированным геном *IDH*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Источники данных

В качестве исходных данных для анализа ГНСЗ использовали когорту TCGA-LGG (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-LGG>), содержащую разнообразные данные как по секвенированию геномов отдельных пациентов с ГНСЗ, так и данные по экспрессии генов и микроРНК.

Программное обеспечение

Анализ проводили с использованием стандартных инструментов для работы с транскриптомными данными для языка Python 3.10. Для нормализации и предобработки данных использовали пакеты RANorm 2.1.0 и PyDESeq2 0.4.4. Коэффициенты

корреляции вычисляли пакетом SciPy v1.12.0. Кривые выживаемости построены в пакете Lifelines 0.28.0.

Блок-схема

Блок-схема алгоритма приведена на *рис. 1А*. Последовательность шагов включает фильтрацию по уровню экспрессии генов, фильтрацию по базе данных TargetScan с определенным уровнем достоверности (порог $\text{context++score} < -0.2$), корреляционный анализ и отбор пар по критерию уровня коэффицента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее было показано, что продолжительность жизни пациентов с ГНСЗ коррелирует с наличием/отсутствием мутации в генах *IDH* и наличием/отсутствием делеции в 1p и 19q. На основании полученных данных ГНСЗ предложено разделить на три молекулярных подтипа: *IDHwt* – не мутированные гены *IDH*, *IDHmut-no-codel* – мутация в генах *IDH* и отсутствие делеции в 1p и 19q, *IDHmut-codel* – мутации в генах *IDH* и делеции в 1p и 19q [10]. В данном исследовании мы остановились на двух группах: группа без мутаций в генах *IDH* (*IDHwt*) и группа с мутациями в генах *IDH* (*IDHmut*). Используя данные о продолжительности жизни отдельных пациентов и ранее опубликованные данные о молекулярных подтипах ГНСЗ, мы провели анализ выживания пациентов в когорте. Полученные нами кривые Каплана–Майера хорошо соотносятся с ранее опубликованными данными и показывают, что пациенты без мутаций в гене *IDH* имеют существенно более низкую продолжительность жизни, чем пациенты с мутацией генов *IDH* (*рис. 1Б*).

Для изучения биологической роли микроРНК традиционно используют анализ дифференциальной экспрессии, выделяя те микроРНК, средние уровни экспрессии которых значительно различаются в группах. Однако эти методы не обнаруживают изменений в случае, если средние уровни экспрессии регуляторных и таргетных РНК не изменяются. В этом случае применим анализ дифференциальной коэкспрессии, который выявляет пары или кластеры, взаимная экспрессия которых изменяется между группами [11]. Такие изменения могут указывать на потерю регуляции между микроРНК и ее мРНК-мишенью из-за мутаций, например, в области связывания. Для численной оценки уровня коэкспрессии используются такие показатели, как параметрическая корреляция Пирсона или ранговая корреляция Спирмена. Сравнивая значения этих показателей в разных группах, можно сделать вывод, что коэкспрессия

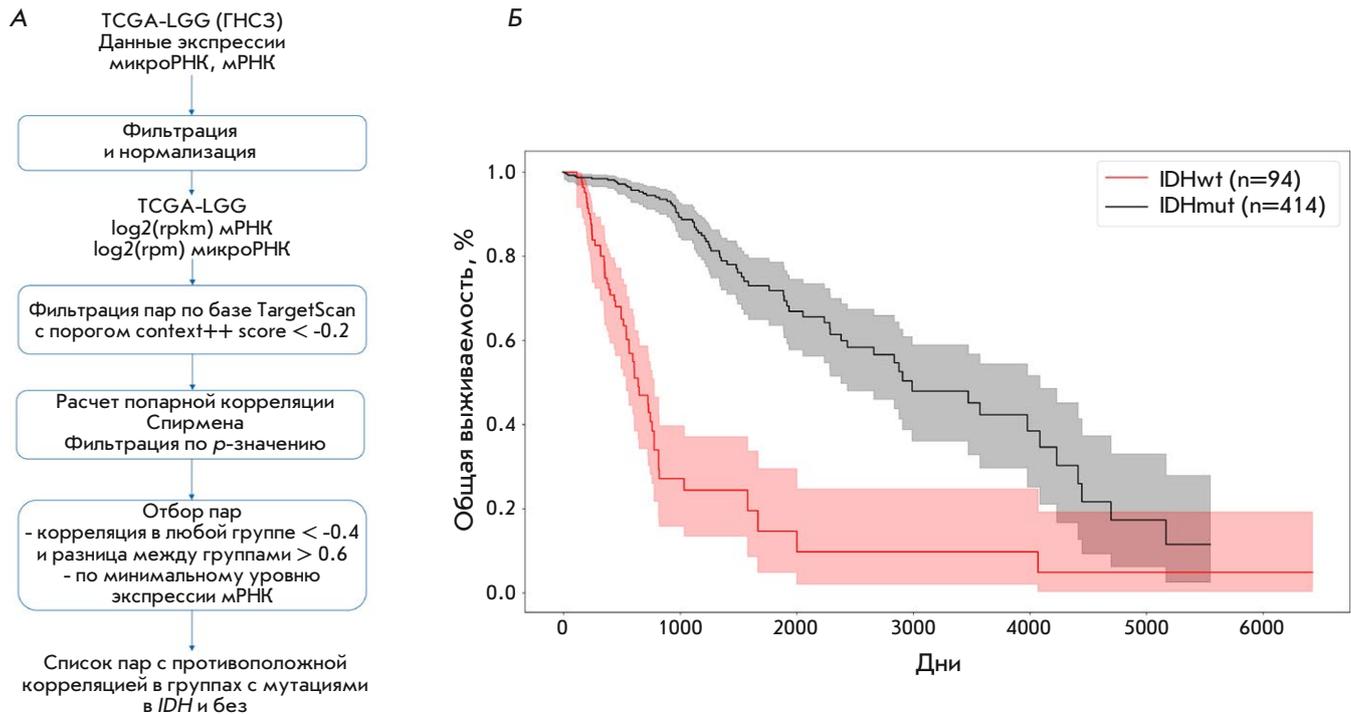


Рис. 1. А – блок-схема использованного биоинформатического алгоритма. Б – кривая выживаемости пациентов TCGA-LGG, разделенных на два молекулярных подтипа: IDHwt (группа без мутаций в генах *IDH*) и IDHmut (группа с мутациями в генах *IDH*)

конкретной пары значительно изменилась. Нами проведен поиск характеристических микроРНК, регуляторная функция которых значимо отличается в группах IDHwt и IDHmut. Разница в регуляции уровня экспрессии генов со стороны потенциально взаимодействующих с их транскриптами микроРНК в зависимости от отсутствия/наличия мутации в генах *IDH* выявлена с помощью анализа дифференциальной коэкспрессии.

Клинические исследования GHC3 ведутся очень интенсивно, однако комплексный анализ больших когорт с секвенированием ДНК опухоли и пациента, анализом экспрессии генов и метилирования ДНК практически отсутствуют. На данный момент в Атлас Опухолевых Геномов (TCGA) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) депонировано всего одно подобное исследование образцов GHC3 от 530 пациентов. Предварительно мы провели фильтрацию всевозможных пар по существующим базам данных по взаимодействию микроРНК и мРНК, полученных как экспериментальным путем, так и *in silico*. В качестве основной базы данных мы использовали TargetScanHuman 8.0 (<https://www.targetscan.org>) для определения мРНК-мишеней, с которыми связываются микроРНК. На втором этапе был проведен расчет корреляции экспрессии между белково-

дирующими мРНК и всеми микроРНК. Значимыми считали все пары, у которых коэффициент корреляции Спирмена был ниже -0.4 в любой из групп IDHwt или IDHmut, что соответствует сильной негативной корреляции, а именно значимому влиянию данной микроРНК на экспрессию гена. При этом абсолютная разница в коэффициентах корреляции между группами должна быть не менее 0.6.

В результате проведенного анализа получили 169 пар (156 различных мРНК).

На финальном этапе пары отфильтровали по достоверности коэффициента корреляции в каждой группе ($p < 0.05$), по уровню экспрессии мРНК (≥ 2 в шкале $\log_2(\text{RPKM})$) и по разнице в коэффициентах корреляции (≥ 0.6). На рис. 2 показаны данные зависимости для 21 пары микроРНК–мРНК-мишень, прошедших через все этапы фильтрации. Приведены значения уровней экспрессии каждой пары микроРНК–мРНК-мишень в каждом образце в виде точки цветом, соответствующим группам IDHwt и IDHmut. Для иллюстрации приведены прямые линейной регрессии для групп IDHwt и IDHmut, где виден разнонаправленный характер их регуляции. В названиях микроРНК и мРНК использовали цветовую кодировку: красным цветом отмечены РНК, ассоциированные с негативным про-

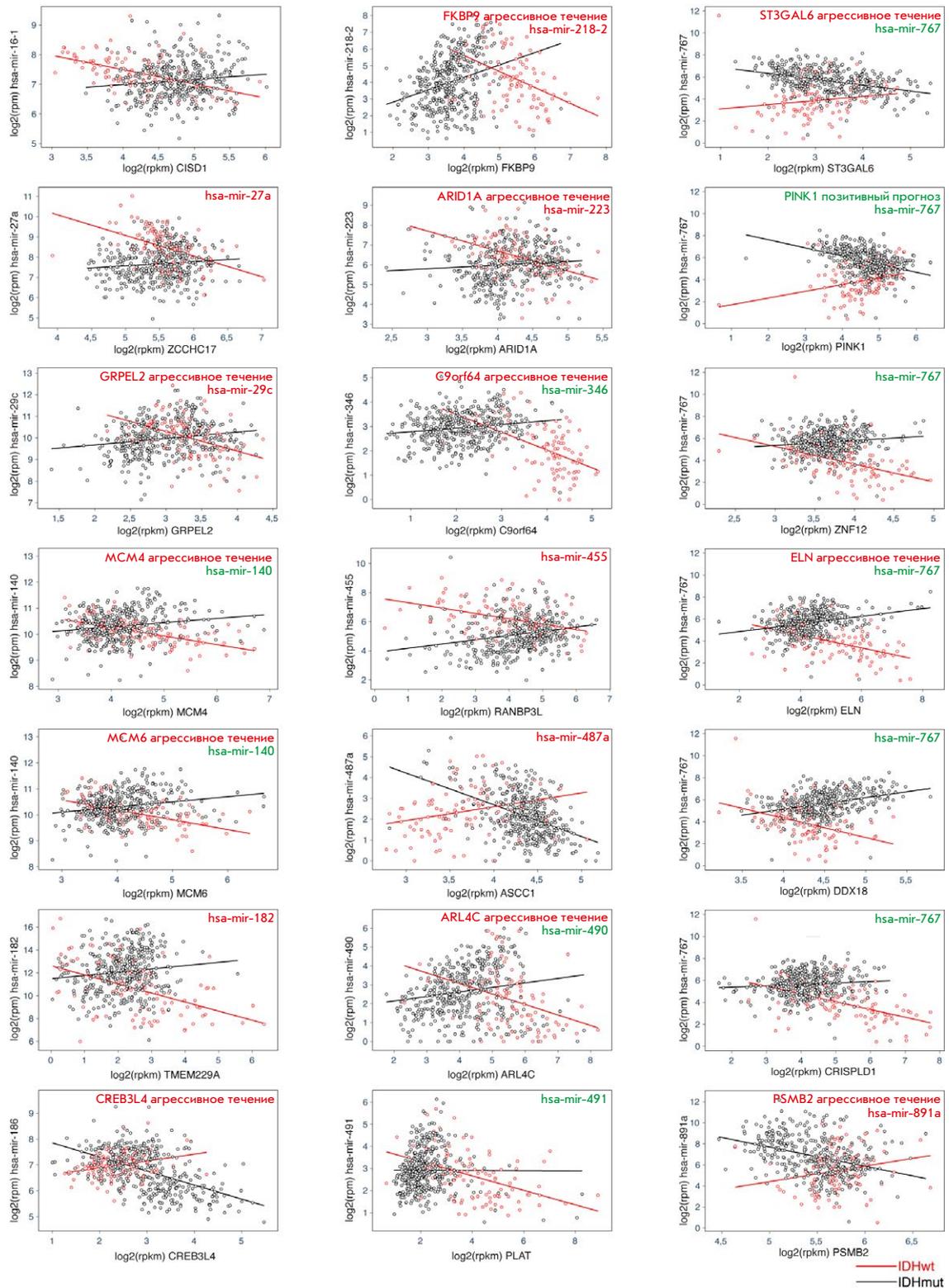
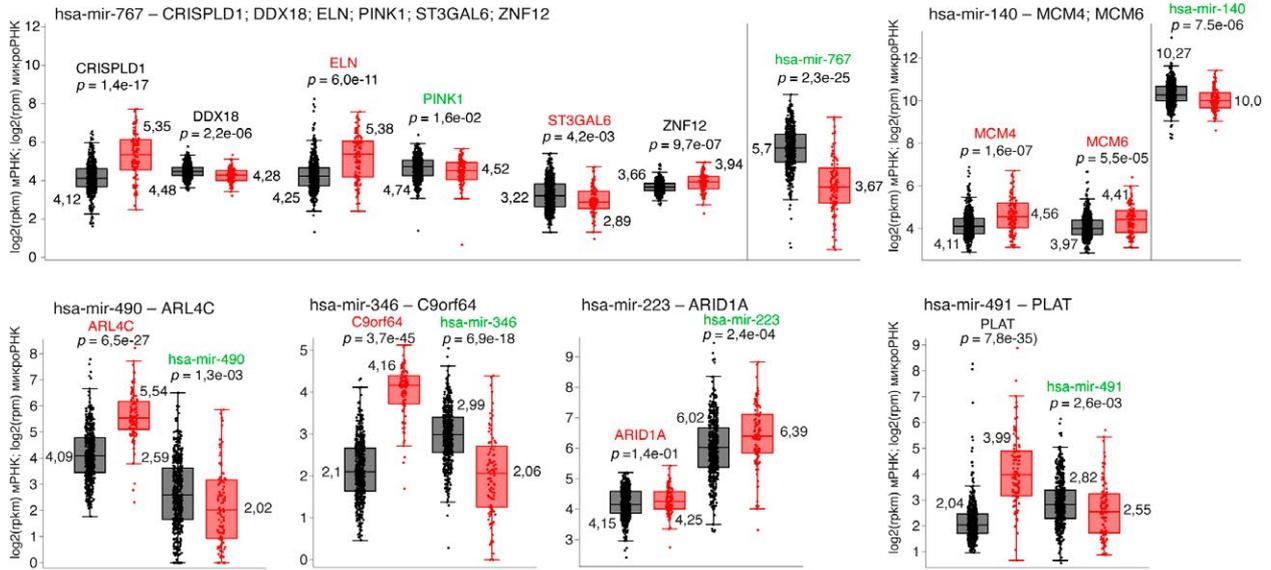
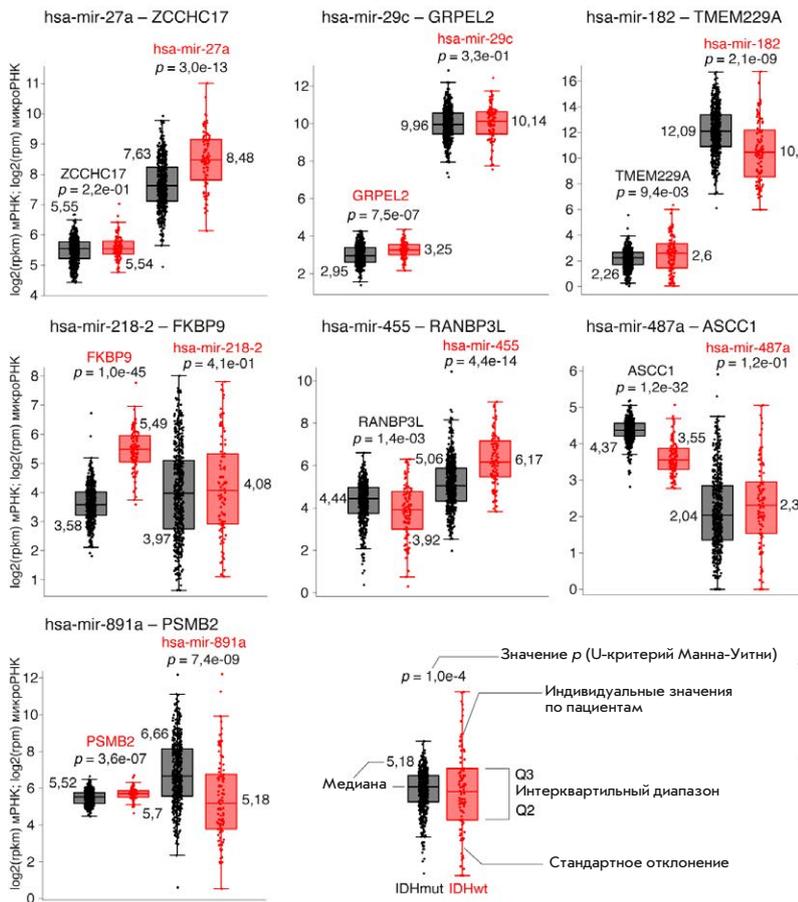


Рис. 2. Графики корреляций для 21 пары микроРНК–мРНК. Черный цвет – группа IDHmut, красный – группа IDHwt. Показаны уровни экспрессии в образцах каждого пациента и прямая линейной регрессии для каждой группы. Красным цветом отмечены мРНК и микроРНК, ассоциированные с негативным прогнозом ГНСЗ, зеленым – протективные. RPM (Reads per million mapped reads) – риды на миллион прокартированных ридов, RPKM (Reads per kilobase per million mapped reads) – риды на килобазу экзона на миллион прокартированных ридов

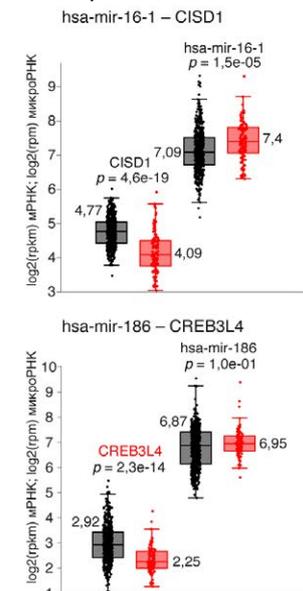
А микроРНК позитивный прогноз



Б микроРНК негативный прогноз



В микроРНК неоднозначный прогноз



Значение p (U-критерий Манна-Уитни)

Индивидуальные значения по пациентам

Медиана

Q3

Интерквартильный диапазон

Q2

Стандартное отклонение

микроРНК

hsa-mir-000 негативный прогноз ГНС3

hsa-mir-000 позитивный прогноз ГНС3

мРНК

ABCD негативный прогноз ГНС3

ABCD позитивный прогноз ГНС3

IDHmut IDHwt

Рис. 3. Уровни экспрессии 21 пары микроРНК–мРНК, сгруппированные по данным позитивного (А) и негативного (Б) влияния микроРНК на протекание заболевания. Красным отмечены мРНК и микроРНК, ассоциированные с негативным прогнозом ГНС3, зеленым – протективные. Черные диаграммы – группа IDHmut, красные диаграммы – группа IDHwt

Таблица 1. Список пар микроРНК–мРНК, отсортированных по разнице в коэффициентах корреляции

мРНК	микроРНК	Корреляция (IDHmut)	Корреляция (IDHwt)	Разница в коэффициентах корреляции	TargetScan context++ score
DDX18	hsa-mir-767	0.365	-0.432	0.797	-0.325
PINK1	hsa-mir-767	-0.453	0.316	0.769	-0.239
ELN	hsa-mir-767	0.322	-0.442	0.764	-0.222
FKBP9	hsa-mir-218-2	0.319	-0.441	0.76	-0.243
CREB3L4	hsa-mir-186	-0.507	0.247	0.754	-0.25
ASCC1	hsa-mir-487a	-0.402	0.338	0.74	-0.217
ST3GAL6	hsa-mir-767	-0.406	0.308	0.714	-0.247
MCM6	hsa-mir-140	0.199	-0.508	0.707	-0.319
RANBP3L	hsa-mir-455	0.298	-0.405	0.703	-0.361
PSMB2	hsa-mir-891a	-0.405	0.297	0.702	-0.319
MCM4	hsa-mir-140	0.176	-0.512	0.688	-0.311
GRPEL2	hsa-mir-29c	0.208	-0.478	0.686	-0.306
ZNF12	hsa-mir-767	0.144	-0.521	0.665	-0.215
ARL4C	hsa-mir-490	0.237	-0.42	0.657	-0.241
ZCCHC17	hsa-mir-27a	0.111	-0.532	0.643	-0.221
PLAT	hsa-mir-491	0.195	-0.439	0.634	-0.252
CRISPLD1	hsa-mir-767	0.12	-0.51	0.63	-0.314
CISD1	hsa-mir-16-1	0.114	-0.51	0.624	-0.451
ARID1A	hsa-mir-223	0.147	-0.469	0.616	-0.232
C9orf64	hsa-mir-346	0.178	-0.438	0.616	-0.231
TMEM229A	hsa-mir-182	0.129	-0.474	0.603	-0.264

гнозом ГНСЗ, зеленым – протективные. Данные получены из опубликованных источников и более подробно описаны в разделе «Обсуждение».

На рис. 3 приведены уровни экспрессии в этих парах. Пары микроРНК–мРНК сгруппированы в три группы по прогнозу их влияния на протекание заболевания (согласно опубликованным данным), цветовая кодировка названий аналогична использованной на рис. 2. Приведены уровни экспрессии каждой пары в образцах каждого пациента с указанием их медианного значения в группах, а также уровень значимости дифференциальной экспрессии между группами IDHwt и IDHmut, посчитанный по критерию Манна–Уитни. Детальный анализ роли уровней экспрессии в парах приведен в разделе «Обсуждение».

Интересно, что в подавляющем большинстве случаев наблюдается картина сильной отрицательной корреляции между белоккодирующими мРНК и микроРНК в группе без мутаций в генах IDH, при этом либо отсутствие корреляции, либо позитивная корреляция в группе с мутацией в генах IDH, что по-

тенциально указывает на потерю функциональной связи микроРНК и мРНК-мишеней.

Численные данные для полученных пар приведены в табл. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ

микроРНК – небольшие одноцепочечные некодирующие РНК (20–23 нуклеотида), которые путем регуляции большого количества транскриптов вовлечены в процессы онкогенеза, а также прогрессирования и метастазирования различных опухолей [12]. Экспрессия множества микроРНК изменена во многих опухолях головного мозга, включая как глиомы низкой степени злокачественности, так и самые распространенные и злокачественные подтипы глиобластомы [13]. микроРНК ассоциированы с ключевыми процессами в глиомах, такими, как пролиферация клеток, апоптоз и инвазия [14].

Мутации в генах IDH служат основным генетическим маркером, который характеризует агрессивность глиом. Пациенты с IDH дикого типа имеют негативный прогноз, в то время как мутации в ге-

нах *IDH* ассоциированы с повышенной выживаемостью [15–17]. В настоящем исследовании оценивали потенциальную дисрегуляцию физиологической функции микроРНК в группах *IDHwt* и *IDHmut*. Большая часть из 21 обнаруженной пары (микроРНК–мРНК) с дифференциальной коэкспрессией (16/21) имеет слабую или средней степени положительную корреляцию между белоккодирующими мРНК и микроРНК в образцах *IDHmut* и отрицательную корреляцию в образцах с *IDHwt*.

Экспрессия протективной при глиоме микроРНК-767 в глиомах высокой степени злокачественности значительно ниже, чем в глиомах низкой степени злокачественности и здоровых тканях [18, 19]. По нашим данным, уровень микроРНК-767 понижен в группе *IDHwt* в сравнении с *IDHmut* и отрицательно коррелирует с транскриптами генов *DDX18* (РНК-хеликаза), *ELN* (белок соединительной ткани, отвечающий за эластичность), *ZNF12* (репрессор транскрипции) и *CRISPLD1* (белок внеклеточных везикул) и положительную с мРНК генов *PINK1* (киназа, участвующая в фосфорилировании митохондриальных белков) и *ST3GAL6* (сиаловая трансфераза) в образцах с *IDH1* дикого типа. Важно отметить, что повышенная экспрессия генов *ELN* [20] и *ST3GAL6* [21] ассоциирована с более агрессивным типом глиом и, соответственно, более низкой выживаемостью. В то же время глиомы с пониженной экспрессией проективного гена *PINK1* коррелируют с низкой выживаемостью пациентов, получавших химио- и лучевую терапию [22]. Информация о роли генов *DDX18*, *ZNF12* и *CRISPLD1* при глиомах и при глиомах низкой степени злокачественности, в частности, на настоящий момент отсутствует.

Согласно опубликованным данным, экспрессия микроРНК-218-2 [23], 487a [24], 891a [25], 29c [26], 27a [27], 182 [28], 455 [29] повышена в агрессивных подтипах глиом и ассоциирована с отрицательным прогнозом, в то время как микроРНК-140 [30], 490 [31], 346 [32], 223 [33] способствуют ингибированию пролиферации опухолей. Данные об экспрессии микроРНК-16-1 весьма противоречивы: ее количество снижено в глиомах с мутированным *IDH1* по сравнению с тканями с *IDH1* дикого типа, но в то же время сниженная экспрессия данной микроРНК способствует пролиферации опухоли [34, 35]. О роли микроРНК-186 при глиомах достоверной информации найти не удалось. Статистически значимое различие в исследованных группах *IDHwt* и *IDHmut* в терми-

нах экспрессии вышеуказанных микроРНК мы наблюдали в случае микроРНК-182, микроРНК-455 и микроРНК-891a, уровень которых был достоверно снижен в образцах глиомы группы *IDHwt*. Уровень микроРНК-455, наоборот, был увеличен в группе *IDHwt* в сравнении с образцами глиомы *IDHmut*.

В более агрессивных типах глиом наблюдается сверхэкспрессия генов, транскрипты которых потенциально служат мишенью для дисрегулированных микроРНК в группах *IDHmut* и *IDHwt*, *FKBP9* [36] – *CREB3L4* [37], *MCM4*, *MCM6* [38], *PSMB2* [39], *ARID1A* [40], *ARL4C* [41], *GRPEL2* [42], *C9orf64* [43]. Не найдено информации об участии генов *ASCC1*, *ZCCHC17* (участвует в биогенезе рибосомной ДНК), *PLAT*, *CISD1*, *TMEM229a* и *RANBP3L* в развитии и распространении любых типов глиом. Проведенный анализ выявил достоверное повышение уровня мРНК, кодирующих белки *ELN*, *ARL4C*, *C9orf64*, *PLAT*, *FKBP9* в образцах *IDHwt* в сравнении с группой *IDHmut*.

ВЫВОДЫ

Наши исследования показали, что анализ дифференциальной коэкспрессии может быть успешно применен к поиску физиологически значимых пар микроРНК–мРНК в группах пациентов с ГНСЗ различного мутационного фенотипа *IDH*. Выявленные закономерности свидетельствуют, что в группе *IDHwt* повышен уровень мРНК, что характерно для агрессивного течения глиомы. Вместе с тем, уровень микроРНК, ассоциированных с негативным прогнозом при глиоме, в целом повышен в группе *IDHmut*, которая характеризуется значительно большей выживаемостью, что в очередной раз свидетельствует о сложности формирования регуляторных транскрипционных сетей. Тем не менее на уровне корреляционных связей между микроРНК и их потенциальными мРНК-мишенями образцы глиом из группы *IDHmut* с положительным прогнозом обладают в значительной степени менее выраженной способностью к регуляции. Подобные физиологические нарушения могут приводить к сниженной жизнеспособности опухоли и, как следствие, к повышенной способности организма сопротивляться распространению злокачественной трансформации. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии Минобрнауки России проект № 13.2251.21.0111 (075-15-2021-1033).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлова Г.В., Баклаушев В.П., Иванова М.А., Горяинов С.А., Рыбалкина Е.Ю., Копылов А.М., Чехонин В.П., Потапов А.А., Коновалов А.Н. // Вопросы нейрохирур-

гии. 2014. Т. 78. № 6. С. 85–100. <https://doi.org/10.17116/neiro201478685-100>.

2. Weller M., Stupp R., Hegi M.E., van den Bent M., Tonn J.C., Sanson M., Wick W., Reifenberger G. // *Neuro Oncol.* 2012. V.

14. № 4. P. Iv100–108. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nos206>.
3. Bondy M.L., Scheurer M.E., Malmer B., Barnholtz-Sloan J.S., Davis F.G., Il'yasova D., Kruchko C., McCarthy B.J., Rajoraman P., Schwartzbaum J.A., et al. // *Cancer*. 2008. V. 113. № 7. P. 1953–1968. <https://doi.org/10.1002/cncr.23741>.
4. Connelly J.M., Malkin M.G. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2007. V. 7. № 3. P. 208–214. <https://doi.org/10.1007/s11910-007-0032-4>.
5. Ostrom Q.T., Barnholtz-Sloan J.S. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2011. V. 11. № 3. P. 329–335. <https://doi.org/10.1007/s11910-011-0189-8>.
6. Kim V.N., Han J., Siomi M.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2009. V. 10. № 2. P. 126–139. <https://doi.org/10.1038/nrm2632>.
7. Zhang J.H., Hou R., Pan Y., Gao Y., Yang Y., Tian W., Zhu Y.B. // *J. Cell. Mol. Med.* 2020. V. 24. № 13. P. 7504–7514. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15377>.
8. Cheng W., Ren X., Zhang C., Han S., Wu A. // *J. Neurooncol.* 2017. V. 132. № 2. P. 207–218. <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2368-6>.
9. Qian Z., Li Y., Fan X., Zhang C., Wang Y., Jiang T., Liu X. // *J. Neurooncol.* 2018. V. 137. № 1. P. 127–137. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2704-5>.
10. Cancer Genome Atlas Research Network, Brat D.J., Verhaak R.G., Aldape K.D., Yung W.K., Salama S.R., Cooper L.A., Rheinbay E., Miller C.R., Vitucci M., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2015. V. 372. № 26. P. 2481–2498. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1402121>.
11. Zhiyanov A., Engibaryan N., Nersisyan S., Shkurnikov M., Tonevitsky A. // *Bioinformatics*. 2023. V. 39. № 2. btad051. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad051>.
12. Bartel D.P. // *Cell*. 2009. V. 136. № 2. P. 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
13. Møller H.G., Rasmussen A.P., Andersen H.H., Johnsen K.B., Henriksen M., Duroux M. // *Mol. Neurobiol.* 2013. V. 47. № 1. P. 131–144. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8349-7>.
14. Zhou Q., Liu J., Quan J., Liu W., Tan H., Li W. // *Cancer Sci.* 2018. V. 109. № 9. P. 2651–2659. <https://doi.org/10.1111/cas.13714>.
15. Jiao Y., Killela P.J., Reitman Z.J., Rasheed A.B., Heaphy C.M., de Wilde R.F., Rodriguez F.J., Rosemberg S., Oba-Shinjo S.M., Nagahashi Marie S.K., et al. // *Oncotarget*. 2021. V. 3. № 7. P. 709–722. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.588>.
16. Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.M., Gallia G.L., et al. // *Science*. 2008. V. 321. № 5897. P. 1807–1812. <https://doi.org/10.1126/science.1164382>.
17. Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360. № 8. P. 765–773. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0808710>.
18. Zhang J., Xu S., Xu J., Li Y., Zhang J., Zhang J., Lu X. // *Oncol. Rep.* 2019. V. 42. № 1. P. 55–66. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7156>.
19. Piwecka M., Rolle K., Belter A., Barciszewska A.M., Żywicki M., Michalak M., Nowak S., Naskręt-Barciszewska M.Z., Barciszewski J. // *Mol. Oncol.* 2015. V. 9. № 7. P. 1324–1340. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.03.007>.
20. Kocatürk B. // *Cancer Med.* 2023. V. 12. № 3. P. 3830–3844. <https://doi.org/10.1002/cam4.5169>.
21. Schildhauer P., Selke P., Staeger M.S., Harder A., Scheller C., Strauss C., Horstkorte R., Scheer M., Leisz S. // *Cells*. 2023. V. 12. № 23. P. 2758. <https://doi.org/10.3390/cells12232758>.
22. Agnihotri S., Golbourn B., Huang X., Remke M., Younger S., Cairns R.A., Chalil A., Smith C.A., Krumholtz S.L., Mackenzie D., et al. // *Cancer Res.* 2022. V. 82. № 24. P. 4695. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-22-3445>.
23. Liu Y., Yan W., Zhang W., Chen L., You G., Bao Z., Wang Y., Wang H., Kang C., Jiang T. // *Oncol. Rep.* 2012. V. 28. № 3. P. 1013–1021. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1902>.
24. Kumar A., Nayak S., Pathak P., Purkait S., Malgularwar P.B., Sharma M.C., Suri V., Mukhopadhyay A., Suri A., Sarkar C. // *J. Neurooncol.* 2018. V. 139. № 1. P. 23–31. <https://doi.org/10.1007/s11060-018-2840-6>.
25. Zakrzewska M., Gruszka R., Stawiski K., Fendler W., Kordacka J., Grajkowska W., Daszkiewicz P., Liberski P.P., Zakrzewski K. // *BMC cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 544. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5739-5>.
26. Wu J., Li L., Jiang C. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 3. P. 1540–1546. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8937-9>.
27. Ge Y.F., Sun J., Jin C.J., Cao B.Q., Jiang Z.F., Shao J.F. // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2013. V. 14. № 2. P. 963–968. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.2.963>.
28. Jiang L., Mao P., Song L., Wu J., Huang J., Lin C., Yuan J., Qu L., Cheng S.Y., Li J. // *Am. J. Pathol.* 2010. V. 177. № 1. P. 29–38. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090812>.
29. Wang W., Mu S., Zhao Q., Xue L., Wang S. // *Oncol. Lett.* 2019. V. 18. № 6. P. 6150–6156. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10927>.
30. Yang H.L., Gao Y.M., Zhao J.A. // *Mol. Med. Rep.* 2017. V. 16. № 3. P. 3634–3640. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6951>.
31. Zhao L., Tang X., Luo R., Duan J., Wang Y., Yang B. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2018. V. 15. № 3. P. 246–255. <https://doi.org/10.2174/15672026156666180813130143>.
32. Li Y., Xu J., Zhang J., Zhang J., Zhang J., Lu X. // *Cancer Cell Int.* 2019. V. 19. P. 294. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-1017-5>.
33. Ding Q., Shen L., Nie X., Lu B., Pan X., Su Z., Yan A., Yan R., Zhou Y., Li L., Xu J. // *Pathol. Res. Pract.* 2018. V. 214. № 9. P. 1330–1339. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.05.012>.
34. Krell A., Wolter M., Stojcheva N., Hertler C., Liesenberg F., Zapatka M., Weller M., Malzkorn B., Reifenberger G. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2019. V. 45. № 5. P. 441–458. <https://doi.org/10.1111/nan.12532>.
35. Hong L., Qing O., Ji Z., Chengqu Z., Ying C., Hao C., Minhui X., Lunshan X. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 13470. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14035-2>.
36. Xu H., Liu P., Yan Y., Fang K., Liang D., Hou X., Zhang X., Wu S., Ma J., Wang R., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020. V. 39. № 1. P. 44. <https://doi.org/10.1186/s13046-020-1541-0>.
37. Hu Y., Chu L., Liu J., Yu L., Song S. B., Yang H., Han F. // *Aging (Albany NY)*. 2019. V. 11. № 19. P. 8156–8168. <https://doi.org/10.18632/aging.102310>.
38. Cai H. Q., Cheng Z.J., Zhang H.P., Wang P.F., Zhang Y., Hao J.J., Wang M.R., Wan J.H. // *Hum. Pathol.* 2018. V. 78. P. 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.04.024>.
39. He W., Zhang Z., Tan Z., Liu X., Wang Z., Xiong B., Shen X., Zhu X. // *Res. Sq.* 2023. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2751848/v1>.
40. Lin W.W., Ou G.Y., Zhao W.J. // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. V. 25. № 21. P. 10111–10125. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16947>.
41. Chen Q., Fu W.J., Tang X.P., Wang L., Niu Q., Wang S., Lin Y., Cao M.F., Hu R., Wen H.Y., et al. // *J. Cancer*. 2021. V. 12. № 3. P. 818–826. <https://doi.org/10.7150/jca.45052>.
42. Tang C.T., Li Y.F., Chou C.H., Huang L.C., Huang S.M., Hueng D.Y., Tsai C.K., Chen Y.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 23. P. 12705. <https://doi.org/10.3390/ijms222312705>.
43. Xu W., Han L., Zhu P., Cheng Y., Chen X. // *Aging*. 2023. V. 15. № 24. P. 15578–15598. <https://doi.org/10.18632/aging.205422>.

УДК 577.29

Реконструкция реакции модификации лантибиотика андалусицина лантионинсинтетазой AncKC в гетерологической системе *Escherichia coli*

Н. З. Мирзоева¹, С. О. Пипия¹, Ю. А. Мокрушина^{1,2}, М. В. Серебрякова³, А. А. Григорьева^{4,5}, С. А. Дубилей^{4,5}, С. С. Терехов¹, И. В. Смирнов^{1,2*}

¹Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

⁵Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 11.12.2023

Принята к печати 13.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27347

РЕФЕРАТ Возрастающая устойчивость микроорганизмов к антибиотикам требует поиска новых антимикробных средств. Пептиды, благодаря своей генетически кодируемой природе, являются перспективными кандидатами на роль новых антимикробных препаратов. Лантипептид андалусицин обладает выраженной антимикробной активностью против грамположительных бактерий, поэтому он может рассматриваться как перспективная матрица для создания ДНК-кодируемых библиотек лантибиотиков. Проведена реконструкция реакции модификации андалусицина лантионинсинтетазой III класса AncKC в гетерологической системе *Escherichia coli*. Полученные результаты открывают возможности создания новых антимикробных агентов пептидной природы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА лантипептиды, посттрансляционные модификации, антимикробные пептиды.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых антимикробных препаратов является одной из наиболее актуальных проблем, стоящих перед исследователями в 21 веке. Стремительное распространение бактериальных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью сопряжено с рисками для общественного здоровья и требует особого внимания. Пептиды являются привлекательными кандидатами на роль новых антибиотиков благодаря своей генетически кодируемой природе, которая позволяет создавать искусственное разнообразие потенциальных антимикробных средств [1, 2].

Лантипептиды – это группа пептидов грамположительных бактерий, которые синтезируются на рибосомах и подвергаются посттрансляционным модификациям. К посттрансляционным модификациям лантипептидов относится дегидрата-

ция остатков Ser и Thr до дегидроаланина (Dha) и дегидробутирина (Dhb) с последующей циклизацией путем образования внутримолекулярных тиоэфирных связей через остаток Cys, вследствие чего образуются неканонические аминокислоты лантионин (Lan) и метил-лантионин (MeLan) [3]. Лантипептиды синтезируются в виде препептида, состоящего из С-концевой последовательности, которая подвергается посттрансляционным модификациям, и N-концевого лидерного пептида, который распознается ферментами модификации и затем удаляется путем протеолиза [4]. Наибольший интерес вызывают лантипептиды, обладающие антимикробной активностью, которые принято называть лантибиотиками [5]. Классификация лантипептидов основана на различиях в строении и механизмах работы ферментов, осуществляющих посттрансля-

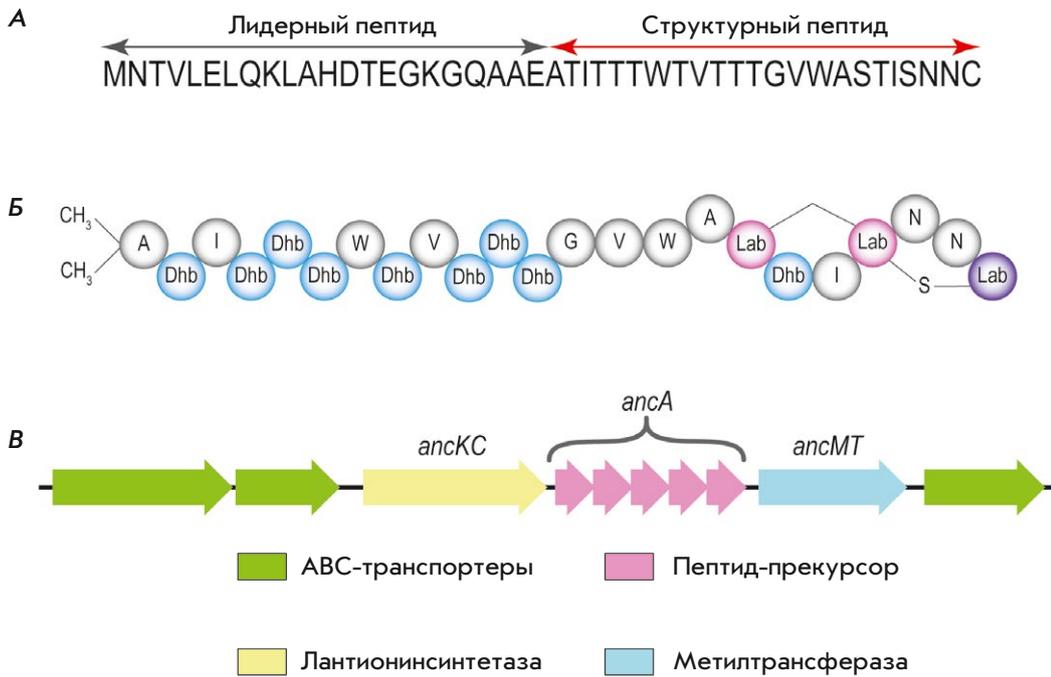


Рис. 1. Структура лантипептида андалусицин: А – первичная структура андалусицина; Б – структура зрелого андалусицина; В – схематичное изображение кластера биосинтеза андалусицина

ционную модификацию лантипептидов. До недавнего времени выделяли IV класса лантипептидов, однако последние открытия позволяют выделить новый V класс [6].

Лантипептид андалусицин был выделен из бактерии *Bacillus thuringiensis SV andalusiensis* B23193 (рис. 1) [7]. Кластер биосинтеза андалусицина содержит гены лантионинсинтетазы III класса AncKC, осуществляющей посттрансляционную модификацию лантипептидов; метилтрансферазы, осуществляющей метилирование; и ABC-транспортеров, осуществляющих экспорт лантипептидов во внеклеточную среду. Зрелый диметилированный андалусицин обладает выраженной антимикробной активностью в отношении многочисленных видов бактерий рода *Bacillus*, включая *B. cereus*, вызывающие выраженные токсикоинфекции у человека. Наличие в структуре лабионинового кольца, характерного

только для лантипептидов III класса, делает андалусицин особенно интересным объектом для создания искусственного разнообразия антимикробных пептидов и пептидных молекул с улучшенными свойствами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование плазмиды и трансформация бактериальных клеток

Гены *ancKC* и *ancA* были получены путем химического синтеза и обработаны эндонуклеазами рестрикции, а затем лигированы в вектор pIvI-HisTEV (рис. 2).

В качестве штамма-продуцента были выбраны клетки *E. coli* BL21 (DE3). Полученную генетическую конструкцию использовали для химической трансформации бактерий. Экспрессия генов, со-

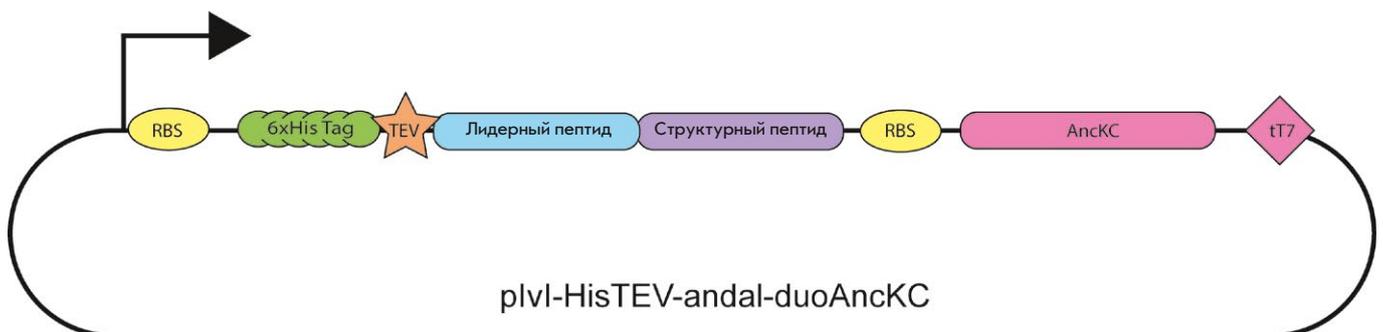


Рис. 2. Схематичное изображение генетической конструкции, содержащей транскрипционную единицу биосинтеза андалусицина

держатся в конструкции, приводила к совместной продукции препептида и лантионинсинтетазы AncKC, что обеспечивало внесение посттрансляционных модификаций *in vivo*. Трансформированные клоны отбирали на чашках Петри с агаризованной средой 2xYT (16 г/л Триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl) с добавлением ампициллина до концентрации 100 мкг/мл.

Наработка модифицированного андалусицина

Единичная колония штамма-продуцента была выбрана для наращивания в 10 мл жидкой среды 2xYT при 37°C в течение ночи. Для инокуляции 100 мл жидкой среды 2xYT использовали 1 мл ночной культуры. Клетки культивировали при 37°C при перемешивании до достижения $OD_{600} = 0.4-0.6$, после чего добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали клетки при 18°C в течение 18 ч и постоянном перемешивании. По окончании экспрессии клеточную массу осаждали центрифугированием.

Очистка рекомбинантного модифицированного андалусицина

Клеточную массу дезинтегрировали ультразвуком, а затем центрифугировали на скорости 12000 об/мин в течение 20 мин. Использовали лизирующий буфер: 20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl. Андалусин очищали методом металл-хелатной хроматографии с использованием сорбента Ni-NTA (Qiagen, Германия). Для хроматографической очистки пептида использовали буфер нанесения (20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола) и элюирующий буфер (20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 500 мМ NaCl, 300 мМ имидазола). Пробы после хроматографической очистки анализировали с помощью денатурирующего трицинового электрофореза в полиакриламидном геле [8].

Масс-спектрометрический анализ

Для масс-спектрометрического анализа образцы обрабатывали йодацетамидом и подвергали трипсинолизу (Promega, США). Затем 0.5 мкл образца смешивали с 0.5 мкл раствора 2,5-дигидроксибензойной кислоты (40 мг/мл в 30% ацетонитриле, 0.5% ТФУ, Sigma Aldrich) на мишени и высушивали.

Масс-спектры получали на MALDI-время-пролетном масс-спектрометре UltrafleXtreme BrukerDaltonics (Германия) в режиме положительных ионов. Для получения спектров протеолитических пептидов использовали рефлектрон; точность моноизотопных масс однозарядных протонированных ионов была в пределах 0.005% (50 ppm). Спектры фрагментации снимали в tandemном ре-

жиме с точностью измерения фрагментных ионов не ниже 1 Да. Идентификацию пептидов проводили по объединенным данным пептидного фингерпринта и спектров фрагментации отдельных пептидов с помощью программ FlexAnalysis 3.3 и Biotoools 3.3 (Bruker Daltonics). При помощи программы Mascot 2.3.02 проводили поиск в домашней базе данных, куда предварительно вносили последовательности предполагаемых белков с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха, возможной модификации остатков Cys йодацетамидом либо β -меркаптоэтанолом, возможного дегидрирования остатков Ser и Thr, возможного фосфорилирования остатков Ser и Thr. Кандидатные белки, имеющие $score > 56$, считали определенными достоверно ($p < 0.05$). Дополнительно спектры размечали вручную.

Анализ уровня антимикробной активности

Уровень антимикробной активности анализировали, используя метод диффузии в агаре на чашках Петри с агаризованной средой 2xYT без добавления антибиотика. Колонию *B. cereus* ATCC 4342 наращивали в 10 мл жидкой среды 2xYT при 37°C в течение ночи. После чего с помощью ватного тампона, смоченного в ночной культуре тестовой бактерии, получали бактериальный газон на поверхности агаризованной среды.

Образец модифицированного прекурсора андалусицина обрабатывали протеазой Glu-C (NEB, США) для удаления лидерной последовательности. Полученную реакционную смесь наносили каплями на подготовленные чашки Петри, предварительно поделенные на равные сегменты таким образом, чтобы капли содержали 8, 4, 2, 1 и 0.5 мкг структурного пептида модифицированного андалусицина. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение ночи, после чего выявляли зоны ингибирования роста бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Андалусин – лантипептид III класса – состоит из 23 аминокислотных остатков и содержит в своем составе лабиониновое кольцо, которое образуется в результате посттрансляционной модификации пептида-прекурсора лантионинсинтетазой AncKC. Андалусин проявляет выраженную антимикробную активность против *B. cereus* ATCC 4342, что делает его интересным объектом для дальнейшего изучения.

В ходе исследования получена генетическая конструкция, объединяющая в единой рамке считывания гены препептида андалусицина и лантионинсинтетазы AncKC. В результате химической

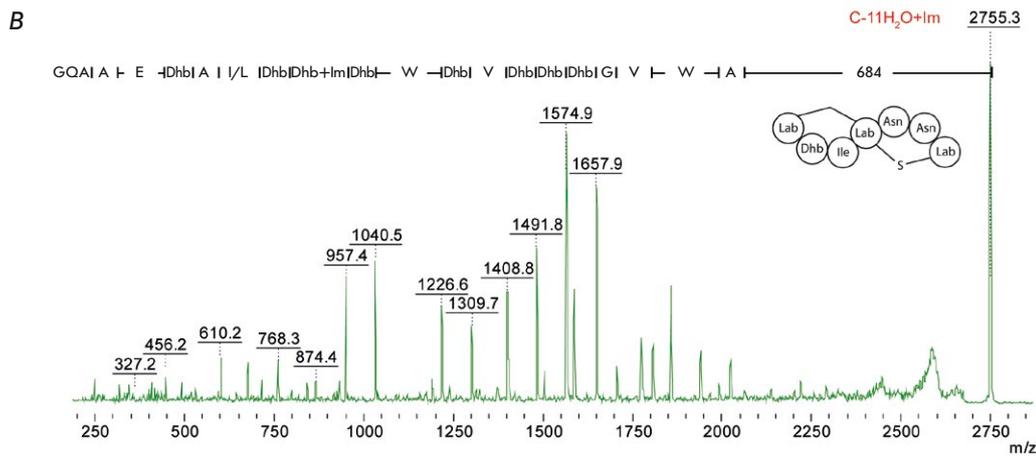
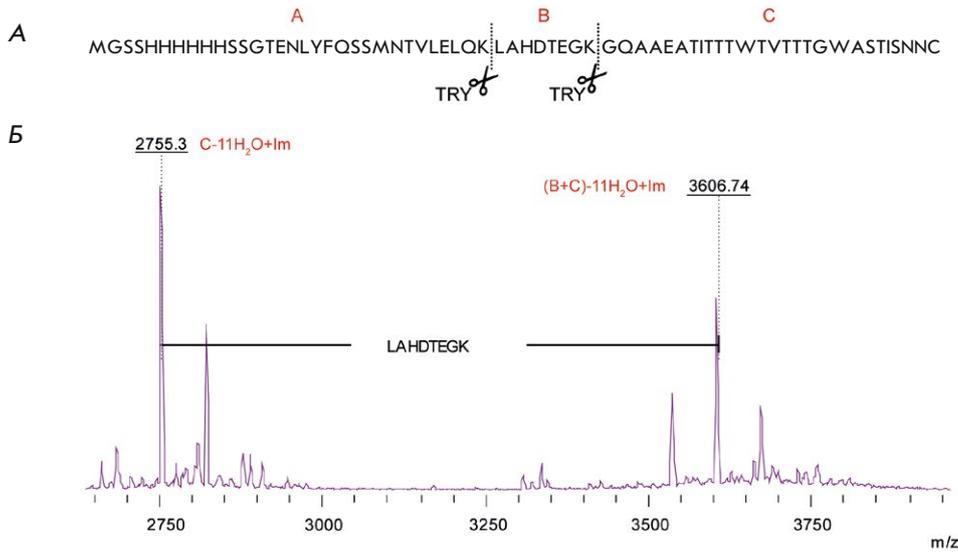


Рис. 3. Масс-спектрометрический анализ рекомбинантного препептида андалусицина: **A** – структура препептида андалусицина с указанием сайтов протеолиза; **Б** – масс-спектр препептида андалусицина после обработки трипсином; **В** – спектр фрагментации иона 2755.3 Да

трансформации клеток *E. coli* BL21 (DE3) получен штамм-продуцент модифицированного препептида андалусицина.

Для подтверждения успешной реконструкции реакции модификации анализировали профиль модификаций наработанного препептида андалусицина. Наиболее чистые фракции продукта использовали для проведения масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ показал наличие молекулярных ионов с массой 3606.74 и 2755.28 Да (рис. 3Б). Ион с массой 3606.74 Да соответствует модифицированному полипептиду, расщепленному трипсином по Lys31 (фрагмент В+С), а ион с массой 2755.28 Да – по Lys39 (фрагмент С). Для дальнейшего исследования структуры андалусицина использовали фрагментацию иона фрагмента С (рис. 3В).

Анализ спектра фрагментации данного молекулярного иона позволил установить аминокислотную последовательность модифицированного пептида

и идентифицировать 11 остатков дегидроаминокислот. Наличие $\Delta m/z$ 683.84 Да на спектре фрагментации между молекулярным ионом и первым фрагментным ионом соответствует лабиониновому кольцу на С-конце андалусицина. Отсутствие фрагментации в этой части спектра свидетельствует о конформационной жесткости структуры.

Уровень антимикробной активности аналога андалусицина анализировали методом диффузии. В качестве модельного организма использовали штамм *B. cereus* ATCC 4342. Полученные результаты указывают на антимикробную активность в 20 ± 10 раз меньше, чем у зрелого природного андалусицина, что, вероятно, обусловлено отсутствием двух метильных групп на N-конце структурного пептида у полученного аналога (рис. 4).

Таким образом, показано, что AnсКC вносит в предшественник андалусицина посттрансляционные модификации, соответствующие

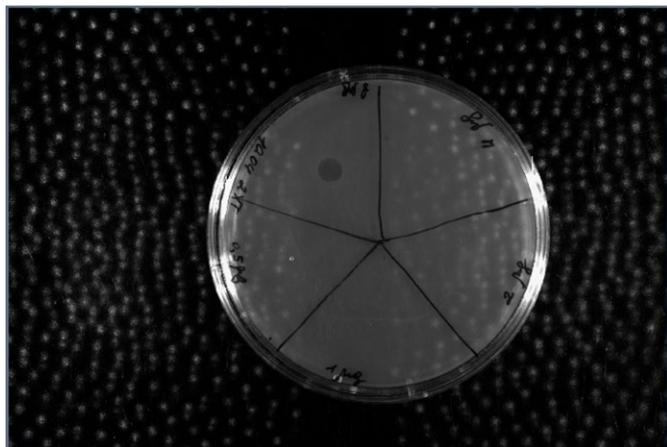


Рис. 4. Определение активности аналога андалусицина с использованием метода диффузии в агаре. В качестве модельного организма использовали *B. cereus* ATCC 4342

аналогичным модификациям природного пептида, что обусловлено успешной реконструкцией этой реакции в гетерологической системе *E. coli*. Наличие минимальной антимикробной активности также указывает на успешную модификацию аналога андалусицина. Присутствие в структуре дегидроаминокислот в совокупности с лабиониновым кольцом на С-конце лантипептида обеспечивает связывание с одним из ключевых компонентов биосинтеза бактериальной клеточной стенки – липидом II.

Результаты данного исследования расширяют наше представление о лантипептидах III класса и открывают новые возможности для направленной модификации рекомбинантных антимикробных пептидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка новых антимикробных препаратов – одна из ключевых задач современности. Пептиды являются перспективными кандидатами на роль новых антибиотиков. В частности, некоторые представители лантипептидов демонстрируют выраженную антимикробную активность, что, вместе с уникальными посттрансляционными модификациями, делает их интересными объектами для исследований. Нами получена генетическая конструкция, объединяющая гены лантионинсинтетазы III класса АнсКС и лантипептида андалусицина, позволяющая осуществлять совместную наработку и модификацию пептида в гетерологическом продуценте *E. coli* BL21 (DE3). Масс-спектрометрический анализ рекомбинантного препептида андалусицина подтвердил внесение посттрансляционных модификаций, соответствующих модификациям в природном андалусицине. Полученные результаты расширяют пространство возможностей для использования лантипептидов в области поиска и создания новых антибиотиков. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-14-00331.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hudson G.A., Mitchell D.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 45. P. 61–69.
- Wang L., Wang N., Zhang W., Cheng X., Yan Z., Shao G., Wang X., Wang R., Fu C. // *Signal Transduct. Target Ther.* 2022. V. 7. № 1. P. 48.
- Repka L.M., Chekan J.R., Nair S.K., van der Donk W.A. // *Chem. Rev.* 2017. V. 117. № 8. P. 5457–5520.
- Zhang Q., Yang X., Wang H., van der Donk W.A. // *ACS Chem Biol.* 2014. V. 9. № 11. P. 2686–2694.
- Schnell N., Entian K.D., Schneider U., Götz F., Zähler H., Kellner R., Jung G. // *Nature.* 1988. V. 333. № 6170. P. 276–278.
- Ortiz-López F.J., Carretero-Molina D., Sánchez-Hidalgo M., Martín J., González I., Román-Hurtado F., de la Cruz M., García-Fernández S., Reyes F., Deisinger J.P., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020. V. 59. № 31. P. 12654–12658.
- Grigoreva A., Andreeva J., Bikmetov D., Rusanova A., Serebryakova M., Garcia A.H., Slonova D., Nair S.K., Lippens G., Severinov K., et al. // *iScience.* 2021. V. 24. № 5. P. 102480.
- Schägger H. // *Nat. Protoc.* 2006. V. 1. № 1. P. 16–22.

УДК 57.017, 57.043

Имплантация канюли снижает выраженность эффекта бета-амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона в мозге мышей BALB/c

К. А. Мухина¹, В. А. Митькевич¹, И. Ю. Попова^{1,2*}¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия²Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290 Россия

*E-mail: I-Yu-Popova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.2024

Принята к печати 06.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27439

РЕФЕРАТ Болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием. Отсутствие эффективной терапии указывает на то, что механизмы развития этой патологии недостаточно изучены. Для исследования спорадической формы болезни Альцгеймера используется введение бета-амилоида (Аβ) в желудочки мозга животных с помощью шприца Гамильтона либо во время стереотаксической операции, либо через предварительно имплантированную канюлю. В данной работе исследовали влияние хронической имплантации канюли на выраженность эффектов Аβ на поведенческом, гистологическом и биохимическом уровнях. Показано, что локальное повреждение нервной ткани в результате канюлизации не влияет на поведение животных и параметры микроглии унилатерального гиппокампа через 2 недели после введения Аβ. Однако имплантация канюли значительно модифицирует некоторые биохимические маркеры окислительного стресса, возникающего в тканях мозга в ответ на введение Аβ. Так, наличие канюли уменьшает выраженность эффекта Аβ на уровень перекисных липидов и глутатиона – в 2 и 10 раз соответственно. Важно, что обнаруженные изменения носят хронический и системный характер, поскольку анализировали гомогенат всего контралатерального (по отношению к месту имплантации канюли) полушария и этот анализ проводили через 2 недели после имплантации. При этом канюлизация не влияет на текущую скорость продукции активных форм кислорода. Полученные данные указывают на то, что хроническая имплантация канюли в мозг экспериментальных животных значительно искажает некоторые параметры окислительного стресса в нервной ткани, широко используемые для оценки развития экспериментальной патологии альцгеймеровского типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА амилоидная токсичность, иммуногистохимия, микроглия, активные формы кислорода, глутатион, перекисные липиды.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Аβ – β-амилоид; DG – зубчатая фасция; АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; сБА – спорадическая болезнь Альцгеймера; группа К – группа контроль; группа К-К – группа контроль с канюлей; группа БА – группа с моделью болезни Альцгеймера; группа БА-К – группа с моделью болезни Альцгеймера и канюлей.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной нейробиологии является разработка эффективной терапии спорадической (не наследственной) формы болезни Альцгеймера (сБА). В настоящее время сБА, которая составляет до 95% от всех диагностированных случаев болезни Альцгеймера, является третьей по значимости причиной смерти, уступая только сердечно-сосудистым заболеваниям и раку [1]. Согласно прогнозам, число людей с диагнозом

БА будет удваиваться каждые 20 лет, достигнув 66 и 115 млн человек к 2030 и 2050 годам соответственно [2]. Однако эти прогнозы не учитывали последствия пандемии COVID-19, результатом которой может стать существенное увеличение числа пациентов с БА [3, 4]. Считается, что причиной сБА является сочетание генетических факторов и факторов риска окружающей среды без документально подтвержденного семейного анамнеза БА [5]. Существует множество гипотез, объясняющих эти-

ологию сБА. Развитие заболевания связывают с отложением β -амилоида (А β) [6], гиперфосфорилированием тау-белка [7], окислительным стрессом [8, 9], гипометаболизмом глюкозы [10], нейровоспалением [11], дегенерацией холинергических нейронов [12], нарушением микробиоты кишечника [13, 14], нарушением липидного обмена [15], дисфункцией аутофагии [16], состоянием резистентности к инсулину [17, 18], дисфункцией синапсов [8, 19] и т.д. Однако отсутствие эффективных методов лечения свидетельствует о недостаточном понимании механизмов развития сБА.

Одним из распространенных подходов исследования механизмов развития сБА является однократное введение бета-амилоида в мозг животных, служащих моделью сБА [20–22]. Бета-амилоид вводят в мозг, как правило, унилатерально в боковой желудочек с помощью шприца Гамильтона во время стереотаксической операции или через предварительно имплантированную направляющую канюлю. Канюльный имплант позволяет длительное время вводить напрямую в мозг различные вещества, в том числе потенциальные терапевтические препараты, но вместе с тем приводит к дополнительному повреждению тканей, вызывая локальный воспалительный ответ [23]. Этот первоначальный воспалительный ответ возникает главным образом в результате активации микроглии с высвобождением интерлейкина-1 β [24, 25]. На контрольных животных было показано, что длительность острого воспалительного ответа составляет менее 1 недели [26], а через 2 недели наблюдается «выравнивание» глии вдоль имплантированного объекта [23]. Вместе с тем известно, что А β является прямым активатором микроглии [27, 28]. Таким образом, хроническая канюлизация и А β действуют однонаправленно. В результате тканевый ответ на имплантацию канюли может усиливать или, напротив, маскировать эффект бета-амилоида. Однако информация о таких экспериментальных данных отсутствует. Вместе с тем очевидно, что искажение эффектов А β при исследовании механизмов развития сБА или тестировании потенциальных терапевтических препаратов может приводить к ложным выводам.

Целью настоящей работы было изучение влияния повреждения нервной ткани в результате имплантации канюли на развитие амилоидной токсичности при интрацеребровентрикулярном введении А β мышам линии BALB/c. Наличие и выраженность синергизма этих воздействий оценивали на системном уровне с помощью поведенческих тестов, на клеточном и субклеточном уровнях с помощью иммуногистохимических и биохимических методов через 2 недели после введения А β .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты выполнены на мышах BALB/c (25–33 г, самцы), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая» (<https://www.pitst.ru/>, Московская область, Чеховский район, пос. Столбовая). Животных содержали в индивидуальных клетках при 12-часовом цикле свет/темнота в помещении с контролируемой температурой (22°C) с доступом к пище и воде *ad libitum*. Все исследования проводили в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 года, а также одобрено Комиссией по биологической безопасности и биоэтике ИТЭБ РАН (Пушино), протокол № 40/2023 от 15 февраля 2023 года.

Схема проведения эксперимента представлена на *рис. 1А*. Были проведены две серии экспериментов. Животным первой серии проводили нейрохирургическую операцию, во время которой в левый боковой желудочек головного мозга при помощи шприца Гамильтона вводили либо 1 мкл искусственной спинномозговой жидкости (ACSF) (группа К), либо 1 мкл А β_{1-42} для моделирования спорадической формы болезни Альцгеймера (группа БА).

Животным второй серии с помощью нейрохирургической операции имплантировали направляющую канюлю, через которую при помощи шприца Гамильтона начинали вводить препараты через 1 сут после операции. Поскольку имплантацию канюли производят с целью неоднократного введения препаратов, а вводимые препараты зачастую растворяют в DMSO, в данной серии экспериментов раствор ACSF был заменен на указанный растворитель. В первый день введения часть животных получала 1 мкл DMSO (группа К-К), а вторая часть – 1 мкл А β_{1-42} +DMSO (группа БА-К). Далее в течение 3 дней всем животным вводили DMSO.

Через 14 дней после введения А β_{1-42} проводили поведенческий тест «Открытое поле». Затем мышей анестезировали изофлураном, мозг извлекали, половину мозга фиксировали в параформальдегиде для иммуногистохимического анализа, а вторую половину анализировали биохимическими методами.

Стереотаксические операции проводили под общим газовым наркозом с использованием изофлурана (1–4%, парциальное давление кислорода 0.8). Координаты для введения шприца Гамильтона (G29) были одинаковы во всех группах животных: AP = -0.7; L = 1.4; h = 2.2 [29]. Направляющую канюлю (нержавеющая сталь, G21 размер) для микроинъекций устанавливали над левым боковым желудочком по координатам AP = -0.7; L = 1.4; h = 1.5 [29] (*рис. 1Б*).

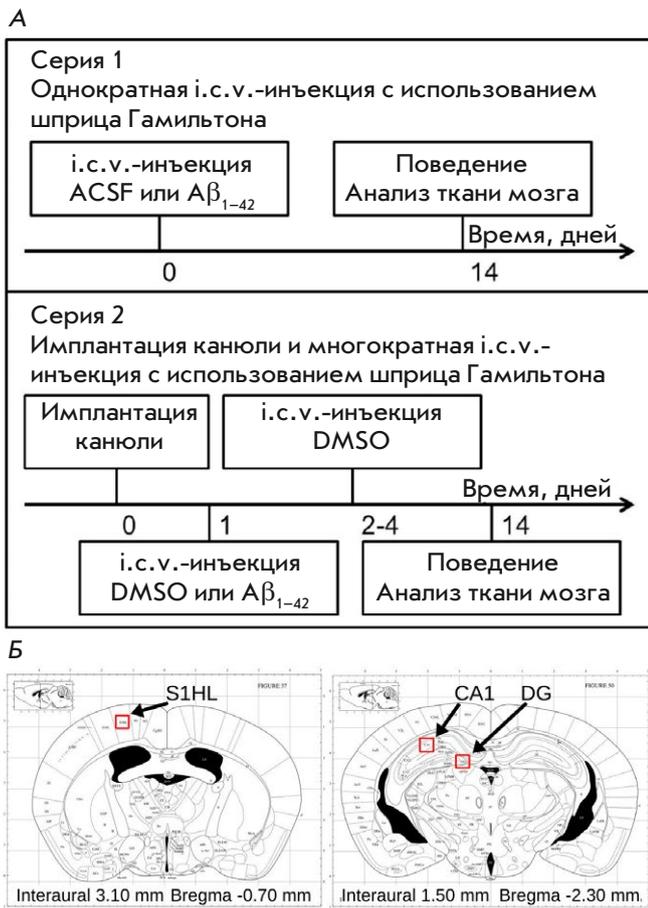


Рис. 1. А — схема эксперимента. Б — изображение фронтального среза мозга мыши из атласа [29] с обозначением места введения направляющей канюли (слева) и областей CA1 и зубчатой фасции для подсчета клеток микроглии (справа)

Микроинъекции препаратов

Контрольным группам животных вводили ACSF (NaCl 0.9% + PBS + 5 мМ глюкозы) или DMSO (Sigma-Aldrich, США), группам БА вводили $A\beta_{1-42}$ (Sigma-Aldrich). Олигомерный $A\beta_{1-42}$ (1 мг, Sigma-Aldrich) растворяли в 1 мл 1.0% NH_4OH в физиологическом растворе и обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин. Аликвоты хранили при температуре $-80^\circ C$. Перед экспериментами раствор $A\beta_{1-42}$ фибриллизировали в течение 24 ч при температуре $36^\circ C$ и обрабатывали ультразвуком еще раз в течение 1 мин. Растворы вводили со скоростью 1 мкл/мин в объеме 1 мкл.

Поведение

Общее состояние животных оценивали с помощью теста «Открытое поле», которое представляет собой ярко освещенную черную круглую открытую арену

диаметром 60 см и высотой стенок 50 см. Поведение каждого животного (индивидуально) регистрировали с помощью видеокamеры в течение 3 мин. Для видеорегистрации и последующего анализа использовали программу EthoVision (Noldus Information Technology, Нидерланды). Поведение анализировали в двух зонах: в центре ($d = 20$ см) и вдоль стенок; рассчитывали время нахождения в каждой зоне, соотношение движение/неподвижность в каждой зоне, частоту забегания в центральную зону, латентное время до первого забегания в зону вдоль стенок, а также общую пройденную дистанцию и среднюю скорость движения. После каждого животного установку «Открытое поле» обрабатывали 10% раствором спирта.

Гистология

Левое полушарие мозга помещали в холодный параформальдегид для фиксации и хранения. Срезы изготавливали на вибраторе Leica VT 1200 S (Leica, Германия). Делали фронтальные срезы толщиной 35 мкм и окрашивали микроглию первичными кроличьими антителами анти-Iba-1 (1 : 1000; Wako, Япония) в соответствии с протоколом производителя. Далее использовали вторичные антитела козы против антител кролика (1:1000; Alexa Fluor 488, ThermoFisher, США). После завершения окраски срезы монтировали на предметные стекла и анализировали флуоресценцию микроглии с помощью микроскопа Nikon E200 при увеличении $\times 40$. Рассчитывали количество и общую площадь клеток Iba-1+ в квадратах 300×300 мкм. Анализ проводили в области CA1 и зубчатой фасции гиппокампа (рис. 1Б) с помощью программного обеспечения ImageJ (НИН, США), анализировали по шесть срезов каждого мозга. Также в гиппокампе оценивали изменение количества микроглиальных клеток по мере удаления от имплантированной канюли (1200 мкм в каудальном направлении).

Биохимия

Правое полушарие сразу же после быстрого извлечения из черепа (20–40 с) помещали в ледяной буфер, содержащий 220 мМ маннитола, 70 мМ сахарозы, 10 мМ Hepes, 1 мМ EGTA (pH 7.35). Мозговую ткань разрезали на мелкие кусочки и помещали в гомогенизатор (Duran, Wheaton) с 4 мл буфера и гомогенизировали вручную в течение полутора минут. Гомогенат мозга фракционировали при помощи центрифугирования на разных скоростях. Гомогенат центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин при $4^\circ C$. Осадок ресуспендировали в 3 мл калий-фосфатного буфера, содержащего 125 мМ KCl, 8 мМ KH_2PO_4 (pH 7.4) для получения обогащенной

мембранами фракции 1, а надосадочную жидкость центрифугировали при 12000 *g* в течение 15 мин при 4°C. Обогащенный цитозолем супернатант составлял фракцию 2. Полученный осадок ресуспендировали в 0.5 мл среды выделения без EGTA с получением обогащенной митохондриями фракции 3. Все фракции хранили на льду в течение эксперимента. В полученных трех фракциях, условно называемых в дальнейшем мембранной, цитоплазматической и митохондриальной, определяли маркеры окислительного стресса. Измерения проводили в течение получаса с использованием многофункционального анализатора планшетного формата CLARIOstar (BMGlabtech, Германия).

Динамику образования активных форм кислорода (АФК) определяли флуориметрированием с использованием красителя Amplex Red (30 мкМ, Thermo Fisher Scientific). Концентрацию восстановленных сульфгидрильных групп определяли фотометрированием по методу Эллмана с 1.3 мМ 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (DTNB, ThermoFisher, США). Измерения оптической плотности проводили на длине волны 415 нм с использованием калибровочной кривой по цистеину. Перекисно окисленные липиды определяли флуориметрированием продуктов реакции с 7.5 мМ тиобарбитуровой кислотой (анализ TBARS, Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию измеряли с использованием длины волны 530 нм для возбуждения и 554 нм для поглощения и калибровочной кривой по 1,1,3,3-тетраэтоксипропану (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). Содержание белка во фракциях для нормирования биохимических показателей определяли по методу Бредфорда с Coomassie Brilliant Blue R-250. Оптическую плотность измеряли на длине волны 595 нм с использованием калибровочной кривой по бычьему сывороточному альбумину. Поскольку в цитоплазматической фракции содержание белка было выше, чем в мембранной и митохондриальной, нормированные значения в ней были ниже.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни и однофакторного метода ANOVA. Данные представлены как среднее \pm SD, $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эксперименты были проведены на четырех группах животных: 1 – контрольная с однократным введением ACSF во время нейрохирургической операции с помощью шприца Гамильтона (группа К, $n = 6$); 2 – с однократным введением $A\beta_{1-42}$ во время нейрохирургической операции с помощью

шприца Гамильтона (группа БА, $n = 6$); 3 – контрольная с введением DMSO в течение 3 дней через имплантированную канюлю (группа К-К, $n = 6$); 4 – с однократным введением $A\beta_{1-42}$ и последующим введением DMSO в течение 3 дней через имплантированную канюлю (группа БА-К, $n = 7$).

Поведенческий тест «Открытое поле»

Для оценки общего состояния мышей, их двигательной активности и уровня тревожности в новой обстановке был проведен тест «Открытое поле». Анализ трех показателей (пройденного расстояния, скорости движения и времени нахождения в центральном квадрате) не выявил достоверных различий между четырьмя исследуемыми группами (рис. 2А,Б,В). Оценка относительных изменений между двумя группами без канюлей (К и БА) и двумя группами с канюлями (К-К и БА-К) показала, что наличие имплантированной канюли меняет направленность поведенческих реакций у животного (рис. 2А,Б,В).

Гиппокампальная микроглия

Поскольку любые интервенции в мозг приводят к некоторому повреждению ткани и, как следствие, к активации микроглии, первой задачей было оценить область повреждения вокруг имплантированной направляющей канюли, анализируя микроглию. Через 2 недели после нейрохирургической операции проводили последовательный анализ срезов по мере удаления от канюли. Показано, что активация микроглии, вызванная имплантацией канюли, наблюдается на расстоянии ~600 мкм от канюли (рис. 3А). Канюля увеличивает общую площадь микроглиальных клеток на 423.7 ± 74.1 мкм² у контрольных животных и на 449.9 ± 85.5 мкм² у БА животных, а их количество на 13.5 ± 4.6 и 10.5 ± 3.8 соответственно.

Иммуногистохимический анализ микроглии в поле СА1 и в хилусе зубчатой фасции гиппокампа выявил увеличение площади клеток (на 63.3 ± 28.4 и 143 ± 42.4 мкм² у животных без канюли (БА-К) и на 143.1 ± 37.9 и 167.2 ± 29.6 мкм² у животных с канюлей (БА-К – К-К) соответственно) у мышей с моделью болезни Альцгеймера относительно контрольной группы, при этом количество клеток было увеличено только в области DG (рис. 3Б).

Сравнительный попарный анализ групп с канюлями и без не выявил достоверной разницы между группами ни по площади, ни по числу клеток (рис. 3Б). Полученные данные указывают на то, что имплантация не оказывает негативного влияния на параметры (число и площадь) микроглиальных клеток на расстоянии более 600 мкм от канюли.

Биохимия

В работе проведен биохимический анализ маркеров окислительного стресса в правом полушарии мозга (контралатеральном по отношению к месту имплантации канюли) у экспериментальных животных.

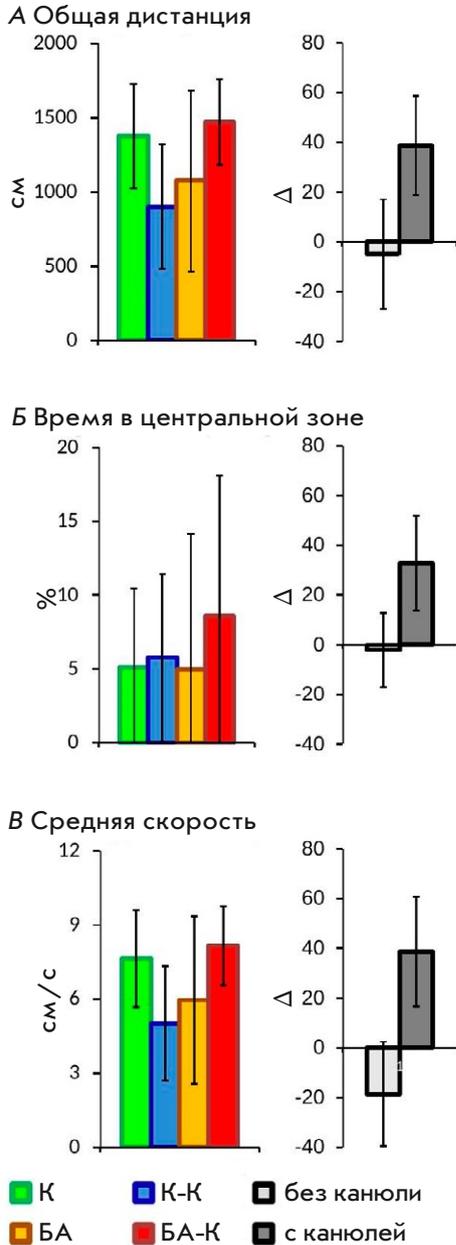


Рис. 2. Анализ поведения экспериментальных животных в тесте «Открытое поле». А — общая пройденная дистанция. Б — общее время, проведенное в центральной зоне. В — средняя скорость движения. Слева представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, справа — попарное сравнение контрольных групп и групп с введением $A\beta_{1-42}$ (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение

Перекисно окисленные липиды

Анализ уровня перекисных липидов в гомогенате мозга экспериментальных животных показал, что вживление канюли приводит к более чем двукратному повышению их уровня в первой фракции, которая содержит преимущественно клеточные мембраны (сравнение групп К и К-К, $p < 0.01$, рис. 4А, табл. 1). Тот факт, что имплантация канюли была на левой половине мозга, а биохимические параметры анализировали в гомогенате правой половины мозга, указывает на существенное влияние поврежденной ткани на общий уровень перекисных липидов в мозге.

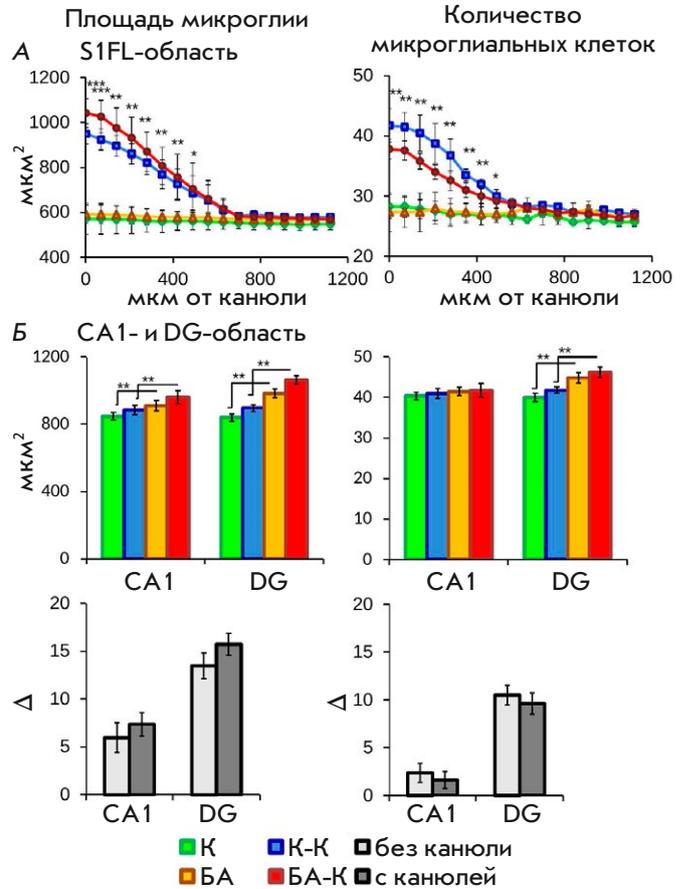


Рис. 3. Иммуногистохимический анализ микроглиальных клеток. А — изменение количества и площади микроглиальных клеток по мере удаления от места имплантации канюли к затылочной части мозга. Б — влияние канюлизации и введения $A\beta_{1-42}$ на микроглию в поле CA1 и DG гиппокампа. Вверху представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, внизу — попарное сравнение контрольных групп и групп с введением $A\beta_{1-42}$ (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение. Достоверность: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***)

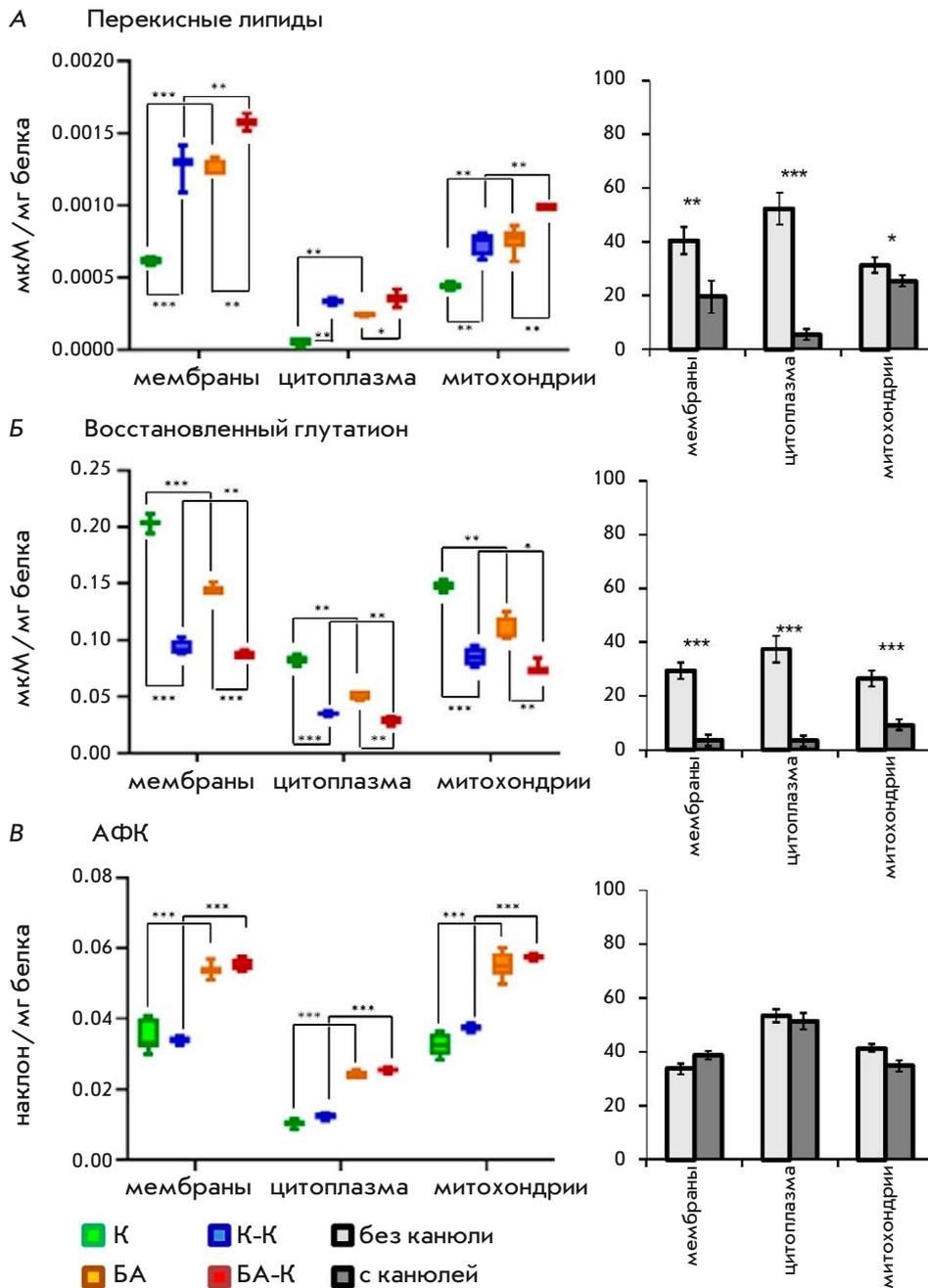


Рис. 4. Биохимический анализ маркеров окислительного стресса. А – уровень перекисных липидов. Б – уровень восстановленного глутатиона. В – уровень АФК. Слева представлены данные по каждой группе экспериментальных животных, справа – попарное сравнение контрольных групп и групп с введением Аβ₁₋₄₂ (К/БА и К-К/БА-К). Данные представлены как средние значения и стандартное отклонение. Достоверность: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***)

У животных без канюли введение амилоида приводило к существенному увеличению количества перекисных липидов. Так, в первой фракции гомогената мозга уровень перекисно окисленных липидов составлял $6 \times 10^4 \pm 0.2 \times 10^4$ и $13 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ мкМ/мг белка в группах К и БА соответственно. Введение амилоида через канюлю (группа БА-К) приводило к дополнительному повышению уровня перекисных липидов до $16 \times 10^4 \pm 0.9 \times 10^4$ мкМ/мг белка. Эта зависимость наблюдалась во всех трех фракциях (рис. 4А). При этом уровень перекисных липидов

в группе К-К был сопоставим с уровнем в группе БА (в первой фракции $13 \times 10^4 \pm 2 \times 10^4$ и $12.6 \times 10^4 \pm 0.5 \times 10^4$ мкМ/мг белка соответственно), что свидетельствует о хроническом повышении свободнорадикального окисления в контралатеральном относительно места имплантации полушария мозга экспериментальных животных.

Попарное сравнение между группами с канюлями и без (рис. 4А) показало, что при введении амилоида уровень окисленных липидов в первой фракции повышается в два раза сильнее у животных без канюли (сравнение групп К и БА) по сравнению с жи-

Таблица 1. Уровень маркеров окислительного стресса во фракциях гомогената мозга экспериментальных животных. Значения указаны в % относительно мембранной фракции К-группы и стандартные отклонения

Маркер окислительного стресса	Фракция	К	К-К	БА	БА-К
Перекисные липиды	Мембранная	100 ± 4	204 ± 27	202 ± 9	253 ± 14
	Цитоплазматическая	9 ± 5	54 ± 4	39 ± 2	57 ± 14
	Митохондриальная	71 ± 4	119 ± 13	121 ± 14	159 ± 1
Глутатион	Мембранная	100 ± 3	46 ± 3	70 ± 2	45 ± 1
	Цитоплазматическая	41 ± 2	17 ± 1	25 ± 2	16 ± 1
	Митохондриальная	73 ± 2	42 ± 4	54 ± 5	35 ± 1
АФК	Мембранная	100 ± 12	97 ± 3	154 ± 5	159 ± 5
	Цитоплазматическая	30 ± 3	36 ± 3	69 ± 3	73 ± 2
	Митохондриальная	91 ± 9	108 ± 3	159 ± 11	165 ± 3

вотными с имплантированными канюлями (сравнение групп К-К и БА-К).

Глутатион

Глутатион, определяющий фактор Red/Ox потенциала в клетке, в основном содержится в цитозоле. Анализ уровня глутатиона в гомогенате мозга экспериментальных животных показал, что вживление канюли приводит к понижению уровня глутатиона в 2.4 раза во второй фракции, содержащей преимущественно цитозоль (сравнение групп К и К-К, $p < 0.01$, рис. 4Б, табл. 1). Эта зависимость прослеживалась во всех трех фракциях. Этот факт указывает на существенное влияние имплантированной канюли на общий уровень глутатиона в мозге.

Введение амилоида приводило к понижению уровня глутатиона во всех экспериментах, однако изменения у животных без канюли были на 75% более выраженными, чем у животных с канюлей (группы БА/К – 40% и группы БА-К/К-К – 5%, рис. 4Б).

Интересно, что уровень глутатиона в группе К-К был ниже, чем в группе БА (во второй фракции 0.035 ± 0.002 и 0.052 ± 0.004 мкМ/мг белка соответственно), что свидетельствует о хроническом снижении восстановительной способности нервной ткани в результате имплантации канюли в мозг экспериментальных животных.

Активные формы кислорода

Имплантация канюли не влияла на скорость продукции АФК: в группах К и К-К значения достоверно не различались (рис. 4В, табл. 1).

Введение амилоида приводило к схожему повышению примерно на 75% скорости продукции АФК во всех трех фракциях гомогената независимо от наличия имплантированной канюли (рис. 4В, табл. 1). Попарное сравнение групп с канюлями и без не выявило достоверных отличий между ними (рис. 4В).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе изучено влияние направляющей канюли на состояние нервной ткани мозга при моделировании спорадической БА на мышах. На системном уровне оценивали поведение животных; на клеточном и субклеточном уровне проводили иммуногистохимический анализ микроглии и биохимический анализ маркеров окислительного стресса мозга. Анализ проводили через 2 недели после проведения нейрохирургической операции и введения $A\beta_{1-42}$, поскольку к этому времени заканчиваются острые реакции на повреждение и изменения параметров можно рассматривать как признаки начального этапа развития хронической патологии.

Поведенческие исследования на животных с моделью БА, особенно на ранних стадиях развития патологии, представляют интерес, поскольку с их помощью можно выявить психоневрологические нарушения, например, гипервозбудимость и тревожность. Ранее было показано, что психоневрологическая симптоматика является ранним проявлением когнитивных нарушений у человека [30]. Однако в связи с тем, что установить момент запуска патологии у человека не представляется возможным, неизвестно на каком конкретно этапе развития нейродегенерации начинаются психоневрологические нарушения. В связи с этим особый интерес представляют поведенческие тесты на животных на разных стадиях моделирования БА. В настоящем исследовании экспериментальные животные были протестированы с помощью теста «Открытое поле». Показали, что через 2 недели после введения $A\beta_{1-42}$ тест «Открытое поле» не выявляет достоверных отличий между экспериментальными группами. Хотя попарное сравнение животных без и с канюлей показало, что имплантированная канюля меняет направленность поведенческих реакций. Если у мышей без канюли наблюдалась тенденция к уменьшению двигательной активности, то у мы-

шей с канюлей – к ее увеличению. Этот факт может указывать на необходимость разработки новых поведенческих тестов, выявляющих ранние психоневрологические нарушения у животных с экспериментальной моделью БА.

Поскольку при имплантации направляющей канюли происходит механическое повреждение тканей мозга, необходимо отделять влияние этого повреждения от влияния хронически вводимых через канюлю препаратов. Для этого необходимо определить зону механического повреждения вокруг канюли. Одним из наиболее часто используемых биомаркеров повреждения нервной ткани являются активированные микроглиальные клетки – резидентные «макрофаги» мозга [31]. В нашем исследовании сравнительный анализ параметров микроглиальных клеток и нервной ткани вокруг канюли с введением тонким шприцем Гамильтона показал, что вокруг канюли количество клеток активированной микроглии увеличивалось в среднем на 30%, а их общая площадь на 40%. Количество активированной микроглии градуально снижалось по мере удаления от канюли и достигало контрольного уровня на расстоянии 560 мкм. Поэтому влияние амилоида на гиппокампальную микроглию у животных с имплантированными канюлями анализировали на расстоянии более 600 мкм от места имплантации. В отличие от канюли, разовое введение шприца Гамильтона толщиной 0.33 мм не приводило к увеличению количества и площади микроглиальных клеток через 2 недели после стереотаксической операции.

Введение $A\beta_{1-42}$ как животным с канюлей, так и без нее вызывало активацию гиппокампальной микроглии, что выражалось в увеличении площади клеток. Интересно, что в зубчатой фасции увеличение площади клеток сопровождалось увеличением их количества, тогда как в поле СА1 число микроглиальных клеток не менялось. Сравнительный попарный анализ гиппокампальной микроглии у животных без канюли и с канюлей показал, что хотя уровень активации микроглии у животных с канюлей был незначительно выше, принципиально наличие канюли не влияло на эффект $A\beta_{1-42}$. Таким образом, полученные данные показали, что локальное повреждение нервной ткани, вызванное имплантацией канюли, не меняет эффект действия бета-амилоида на ткани гиппокампа, находящиеся на достаточном удалении (600 мкм) от канюли.

Поскольку многочисленные исследования показали, что олигомерный $A\beta$ индуцирует окислительный стресс в нервной ткани [32, 33], мы проанализировали маркеры окислительного стресса в правом полушарии мозга (контралатеральном по отношению

к месту имплантации канюли) у экспериментальных животных. Сравнительный анализ двух контрольных групп (К и К-К) показал, что имплантация канюли приводит к существенному повышению уровня перекисных липидов и резкому снижению уровня глутатиона во всех трех фракциях (см. табл. 1), указывая на возникновение хронического окислительного стресса в результате имплантации канюли. При этом уровень АФК в этих группах не различался.

Опубликованы данные, указывающие на то, что снижение уровня глутатиона после имплантации канюли может быть связано с повышенной экспрессией глутамата и эксайтотоксичностью, при которых усиливается окислительный стресс, активируется микроглия и высвобождается цинк, что приводит к гибели нейронов. Это проявляется уже на второй день после механической травмы нервной ткани [34]. Кроме того, при травме происходит реактивная активация астроцитов, которые служат основным источником восстановленного глутатиона в мозге, что также приводит к снижению глутатиона [35].

Введение амилоида контрольным животным (группа БА) вызывало повышение уровня перекисных липидов (на 100% в мембранной фракции) до значений в группе К-К. Снижение уровня глутатиона при этом было существенным (изменение на 40% в цитоплазматической фракции при сравнении групп К и БА), но менее выраженным, чем вызванное имплантацией канюли (изменение на 60% в цитоплазматической фракции при сравнении групп К и К-К). Общий уровень АФК при этом изменялся на одинаковую величину в группах с канюлей и без таковой.

Попарное сравнение групп с канюлями (К-К и БА-К) и без (К и БА) показало, что имплантация канюли, вызывая окислительный стресс из-за механического повреждения тканей, принципиально снижает выраженность эффекта амилоида на уровень перекисных липидов и глутатиона (в 2 и 10 раз соответственно), но не влияет на скорость продукции АФК. Эти данные показали, что общий уровень АФК является адекватным и достоверным маркером развития патологии. В то же время имплантация канюли принципиально искажает эффект амилоида на уровень глутатиона в нервной ткани, что может привести к ложным выводам при интерпретации экспериментальных данных при исследовании механизмов развития сБА или тестировании потенциальных терапевтических препаратов.

Полученные данные указывают на то, что при анализе биохимических параметров окислительного стресса, которые широко используются

для оценки степени развития экспериментальной патологии альцгеймеровского типа, необходимо учитывать влияние механического повреждения ткани, вызванного имплантированной канюлей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование развития амилоидной патологии при интрацеребральном введении бета-амилоида мышам линии BALB/c показало, что повреждение нервной ткани в результате имплантации канюли не влияет на проявление эффектов бета-амилоида на поведенческом и гистологическом уровнях. Однако имплантация канюли принципиальным образом искажала (маскировала) выраженность эффекта амилоида на уровень перекисных липидов

и глутатиона в нервной ткани. При этом текущая скорость продукции АФК не зависела от наличия канюли, подтверждая, что этот параметр является адекватным и достоверным маркером развития патологии. Эти факты указывают на то, что имплантация канюли не одинаковым образом влияет на биохимические маркеры окислительного стресса, возникающего в ответ на инъекцию амилоида, что особенно важно учитывать в исследованиях редокс-статуса нервной ткани у животных. ●

Работа выполнена в рамках госзадания № 075-01025-23-01 и при поддержке гранта РФФ № 19-74-30007.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takizawa C., Thompson P.L., van Walsem A., Faure C., Maier W.C. // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43. № 4. P. 1271–1284.
2. Batsch N.L., Mittelman M.S. // *World Alzheimer Report.* 2012. P. 1–80.
3. Gonzalez-Fernandez E., Huang J. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2023. V. 23. № 9. P. 531–538.
4. Li W., Sun L., Yue L., Xiao S. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1120495.
5. Mattsson N., Zetterberg H. // *Expert. Rev. Neurother.* 2014. V. 14. № 6. P. 621–630.
6. Paroni G., Bisceglia P., Seripa D. // *J. Alzheimers Dis.* 2019. V. 68. № 2. P. 493–510.
7. Wu X.L., Pina-Crespo J., Zhang Y.W., Chen X.C., Xu H.X. // *Chin. Med. J.* 2017. V. 130. № 24. P. 2978–2990.
8. Tönnies E., Trushina E. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 57(4). P. 1105–1121.
9. Wang X., Wang W., Li L., Perry G., Lee H.G., Zhu X. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 8. P. 1240–1247.
10. Zilberter Y., Zilberter M. // *J. Neurosci. Res.* 2017. V. 95. № 11. P. 2217–2235.
11. Kaur D., Sharma V., Deshmukh R. // *Inflammopharmacology.* 2019. V. 27. № 4. P. 663–677.
12. Ferreira-Vieira T.H., Guimaraes I.M., Silva F.R., Ribeiro F.M. // *Curr. Neuropharmacol.* 2016. V. 14. № 1. P. 101–115.
13. Kowalski K., Mulak A. // *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2019. V. 25. № 1. P. 48–60.
14. Junges V.M., Closs V.E., Nogueira G.M., Gottlieb M.G.V. // *Curr. Alzheimer Res.* 2018. V. 15. № 13. P. 1179–1190.
15. Zarrouk A., Debbabi M., Bezine M., Karym E.M., Badreddine A., Rouaud O., Moreau T., Cherkaoui-Malki M., El Ayeub M., Nasser B., et al. // *Curr. Alzheimer Res.* 2018. V. 15. № 4. P. 303–312.
16. Li Q., Liu Y., Sun M. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2017. V. 37. № 3. P. 377–388.
17. Rhea E.M., Leclerc M., Yassine H.N., Capuano A.W., Tong H., Petyuk V.A., Macauley S.L., Fioramonti X., Carmichael O., Calon F., Arvanitakis Z. // *Aging Dis.* 2024. V. 15. № 4. P. 1688–1725.
18. Alves S.S., Servilha-Menezes G., Rossi L., da Silva Junior R.M.P., Garcia-Cairasco N. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2023. V. 152. P. 105326.
19. Chen Y., Fu A.K.Y., Ip N.Y. // *Pharmacol. Ther.* 2019. V. 195. P. 186–198.
20. Balducci C., Forloni G. // *Curr. Pharm. Des.* 2014. V. 20. № 15. P. 2491–2505.
21. Puzzo D., Gulisano W., Palmeri A., Arancio O. // *Expert. Opin. Drug Discov.* 2015. V. 10. № 7. P. 703–711.
22. Zhang L., Chen C., Mak M.S., Lu J., Wu Z., Chen Q., Han Y., Li Y., Pi R. // *Med. Res. Rev.* 2020. V. 40. № 1. P. 431–458.
23. Holguin A., Frank M.G., Biedenkapp J.C., Nelson K., Lippert D., Watkins L.R., Rudy J.W., Maier S.F. // *J. Neurosci. Methods.* 2007. V. 161. № 2. P. 265–272.
24. Schultz R.L., Willey T.J. // *J. Neurocytol.* 1976. V. 5. № 6. P. 621–642.
25. Vincent V.A., van Dam A.M., Persoons J.H., Schotanus K., Steinbusch H.W., Schoffemeer A.N., Berkenbosch F. // *Glia.* 1996. V. 17. № 2. P. 94–102.
26. Turner J.N., Shain W., Szarowski D.H., Andersen M., Martins S., Isaacson M., Craighead H. // *Exp. Neurol.* 1999. V. 156. № 1. P. 33–49.
27. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2015. V. 16. № 6. P. 358–372.
28. Manocha G.D., Floden A.M., Rausch K., Kulas J.A., McGregor B.A., Rojanathammanee L., Puig K.R., Puig K.L., Karki S., Nichols M.R., et al. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 32. P. 8471–8486.
29. Paxinos G., Franklin K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* 2nd Edition. San Diego: Acad. Press, 2001. 133 c.
30. Deardorff W.J., Grossberg G.T. // *Handb. Clin. Neurol.* 2019. V. 165. P. 5–32.
31. Morganti-Kossmann M.C., Rancan M., Otto V.I., Stahel P.F., Kossmann T. // *Shock.* 2001. V. 16. № 3. P. 165–177.
32. Butterfield D.A., Halliwell B. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2019. V. 20. P. 148–160.
33. Cheignon C., Tomas M., Bonnefont-Rousselot D., Faller P., Hureau C., Collin F. // *Redox Biol.* 2018. V. 14. P. 450–464.
34. Hinzman J.M., Thomas T.C., Quintero J.E., Gerhardt G.A., Lifshitz J. // *J. Neurotrauma.* 2012. V. 29. № 6. P. 1197–1208.
35. Dringen R., Hirrlinger J. // *Biol. Chem.* 2003. V. 384. № 4. P. 505–516.

УДК 615.017

Перепрофилирование 5'-нораристеромицина: ингибитор S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы в качестве потенциального антилейкозного препарата

О. Н. Новикова¹, Е. С. Матюгина², А. В. Горшенин¹, Ю. И. Великородная¹, М. Д. Кренгауз^{2,3},
В. О. Ведерникова^{2,3}, П. В. Спиринов^{2,4}, В. С. Прасолов^{2,4}, С. Н. Кочетков², А. Л. Хандажинская²

¹Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии Федерального медико-биологического агентства, Волгоград, 400048 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

³Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 141701 Россия

⁴Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

E-mail: khandazhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 03.06.2024

Принята к печати 15.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27443

РЕФЕРАТ Установлено, что 5'-нораристеромицин в виде рацемической смеси энантиомеров оказывает выраженный цитотоксический эффект на клетки лейкозов. IC_{50} 5'-нораристеромицина составила: для клеток линий Jurkat – 7.3, K562 – 1.7, ТНР-1 – 3.7 мкМ соответственно. Изучение общей токсичности 5'-нораристеромицина проведено в опытах на белых мышах при однократном внутрижелудочном поступлении в организм, установлены токсикометрические параметры, изучена клиническая и патоморфологическая картина острой интоксикации. Показано, что ЛД₅₀ вещества составляет 63.2 (52.7÷75.8), ЛД₁₆ – 44.7, ЛД₈₄ – 89.4 мг/кг; введение соединения в изученном диапазоне доз сопровождается системным поражением внутренних органов и тканей подопытных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 5'-нораристеромицин, лейкоз, противоопухолевая активность, острая токсичность, параметры токсикометрии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДМСО – диметилсульфоксид; ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄ – доза, вызывающая гибель 16, 50 и 84% экспериментальных животных при внутрижелудочном поступлении на 14 сутки наблюдения, мг/кг соответственно; IC_{50} – полумаксимальная ингибирующая концентрация; PBS – натрий-фосфатный буфер.

ВВЕДЕНИЕ

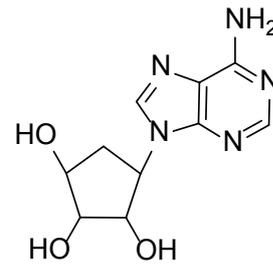
Перепрофилирование лекарственных средств для использования в онкологии подразумевает поиск соединений с противоопухолевой активностью среди веществ, применяемых в терапии других заболеваний. Такой подход позволяет существенно снизить затраты на создание новых препаратов, поскольку соединения уже хорошо изучены, а технологии их получения разработаны.

S-Аденозил-L-гомоцистеингидролаза (SAH-гидролаза) катализирует гидролиз SAH до аденозина и L-гомоцистеина, что приводит к накоплению в клетке SAH – природного ингибитора

S-аденозилметионинзависимых метилтрансфераз. Ингибиторы SAH-гидролаз обладают выраженной противовирусной активностью, которая описывается, в основном, в терминах торможения процессов созревания мРНК вирусов (образование 5'-кепа) [1]. Ген SAH-гидролазы часто амплифицирован в злокачественных опухолях человека, в том числе таких, как рак шейки матки и толстой кишки [2, 3], что указывает на возможность использования SAH-гидролазы в качестве терапевтической мишени. Оказалось, что накопление SAH в клетках эукариот, обработанных ингибиторами SAH-гидролазы, приводящее к изменению соотношения SAM/SAH, имеет

множественные последствия. Во-первых, нарушается метилирование ДНК, которое является одним из факторов, определяющих эпигенетическую регуляцию экспрессии генов эукариот. Нарушение метилирования ДНК выявляется при онкологических заболеваниях – при общем гипометилировании генома наблюдается локальное гиперметилирование промоторных участков генов-супрессоров опухолей [4]. Во-вторых, происходит нарушение функции PRC2 (Polycomb repressive complex 2) – консервативного белкового комплекса, необходимого для поддержания репрессии генов. Каталитическая субъединица PRC2 – белок EZH2 – обеспечивает моно-, ди- и триметилирование Lys27 гистона H3. Показано, что в ряде опухолей человека сверхэкспрессируются субъединицы PRC2, а также присутствуют мутации, усиливающие каталитическую активность EZH2.

Противоопухолевая активность ряда ингибиторов SAH-гидролазы, например, непланоцина А, 3-деазанепланоцина, 3-дезааденозина, аристеромицина и т.д., показана на разных линиях опухолевых клеток и даже *in vivo* [5–9]. Аристеромицин был впервые выделен из культуры *Streptomyces citricolor* в 1967 году [10], а в 1992 году описан синтез его производного, 5'-нораристеромицина, из 5-амино-4,6-дихлорпиримидина [11]. В экспериментах *in vitro* это соединение продемонстрировало выраженную противовирусную активность в отношении вирусов коревой оспы, осповакцины, везикулярного стоматита, парагриппа-3, реовируса-1, цитомегаловируса человека, гепатита В, кори и гриппа В [12–14]. В основе противовирусных свойств вещества лежит процесс ингибирования активности S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы [12, 14]. Установлено, что помимо S-аденозил-L-гомоцистеингидролазы данное вещество с высокой селективностью подавляет активность α -субъединицы киназного комплекса ингибитора сигнального пути ядерного фактора NF- κ B [15]. В этом же исследовании определены фармакокинетические показатели 5'-нораристеромицина при пероральном введении в дозе 10 мг/кг, на модели ревматоидного артрита выявлено его профилактическое и терапевтическое действие, связанное с ингибированием фактора некроза опухолей α в дозе 1 мг/кг. По результатам компьютерного моделирования Singh D.B. и соавт. [16] выдвинули гипотезу, согласно которой данное соединение может быть токсичным для печени. Первые данные о цитостатических свойствах 5'-нораристеромицина появились 30 лет назад [12]; на культурах клеток лейкоза мышей L1210/0, лимфоцитов человека Molt4 и SEM/0 показано ингибирование пролиферации в концентрации 0.39–0.50 мкг/мл. Однако комплекс-



Структура 5'-нораристеромицина

ного исследования цитотоксичности не проводилось и публикации о степени острой токсичности данного соединения для животных нами не обнаружены.

Цель данной работы состояла в оценке противоопухолевой активности 5'-нораристеромицина на культурах клеток с последующим изучением особенностей его токсического действия на организм теплокровных животных с определением основных токсикометрических параметров.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

5'-Нораристеромицин в виде рацемической смеси энантиомеров синтезировали согласно [13].

Клеточные линии

Клетки линий Jurkat, K562 и ТНР-1 культивировали с использованием среды RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 100 мкг/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пирувата натрия и 2 мМ L-глутамин. Клеточные культуры инкубировали при 37°C и 5% CO₂.

Цитотоксичность 5'-нораристеромицина в отношении клеток лейкозов линий Jurkat, K562 и ТНР-1

Для определения цитотоксического действия 5'-нораристеромицина на клетки лейкозов линий ТНР-1, Jurkat и K562 высаживали в количестве 2500, 2000 и 2500 на лунку 96-луночного планшета соответственно. Далее клетки обрабатывали препаратом в широком диапазоне концентраций (0.86–50 мкМ). В качестве контроля использовали ДМСО в концентрации 0.25% в лунке, что соответствует проценту ДМСО при внесении наибольшей концентрации препарата. Суммарный объем лунки составлял 100 мкл. Клетки инкубировали в течение 72 ч. Resazurin Cytotoxicity Assay Kit (CEL-04-4-30 ML) (ООО «Абисенс», Россия) использовали для оценки выживаемости клеток. Resazurin добавляли в соотношении 1 : 100 в PBS в объеме 100 мкл и инкубировали

в течение 4 ч при +37°C и 5% CO₂. Далее измеряли абсорбцию (570 нм абсорбция и 620 нм референс) с использованием Multiskan FC (ThermoScientific, США). От значения, полученного для каждой лунки, вычитали среднее значение сигнала для лунок, содержащих только среду. После чего данные, полученные для каждой из концентраций, нормировали на контроль и методом нелинейной регрессии рассчитывали IC₅₀ (полумаксимальная ингибирующая концентрация). Минимальное количество повторов для каждой концентрации – три. Для расчета IC₅₀ и построения графиков зависимости процента живых клеток от концентрации препарата использовали The GraphPad Prism software v.8.4.3 (GraphPad Software, San Diego, США).

Токсичность 5'-нораристеромицина для белых беспородных мышей

Токсическое действие соединения изучали в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [17].

В качестве биомоделей использовали белых беспородных мышей обоего пола массой 25–30 г. Животных получили из питомника ФГУП «НИИ ГТП» ФМБА России.

Опытные и контрольная группы состояли из четырех животных с равным количеством самцов и самок. Мышей распределяли по группам случайным образом, учитывали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность по массе тела ($\pm 10\%$).

Испытаны дозы в интервале от 40 до 1000 мг/кг. Вещество вводили внутривенно с помощью металлического зонда из расчета 0.05 мл на 10 г массы тела. Контрольные животные аналогичным путем в том же количестве получали растворитель – 99% ДМСО (фармакопейный препарат «ОАО Татхимфармпрепараты», Россия).

После введения вещества животных наблюдали в течение 14 суток, фиксируя клинические проявления интоксикации и факт гибели. Смертельные дозы соединения рассчитывали методом пробит-анализа по D.J. Finney в программе Microsoft Excel 2013 на 14 сутки с момента введения [18].

Павших животных вскрывали в максимально короткие сроки после гибели, отмечая макроскопические проявления воздействия исследуемых веществ. Выделяли внутренние органы (сердце, легкие, печень, селезенку, поджелудочную железу, почки, желудок, тонкий и толстый кишечник) [19, 20] с их последующим гистологическим исследованием. Биоматериал фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 4 суток. Затем образцы обезвоживали в батарее спиртов восходящей крепо-

сти и просветляли в хлороформе в гистопроцессоре Cytadel 2000 (Shendon) и заключали в парафиновую среду Histomix («Биовитрум», Россия). Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм получали с помощью ротационного микротомы (Microm HM340E) и монтировали на предметные стекла. Для обзорного исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином по общепринятой методике [20].

Микропрепараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованного цифровой камерой высокого разрешения AxioCam MRc5. Полученные фотографии обрабатывали с помощью программы ZENpro 2012 (Carl Zeiss).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Цитотоксическое действие 5'-нораристеромицина оценивали на перевиваемых клетках лейкозов человека линий Jurkat, ТНР-1, К562. Показано, что данный препарат оказывает выраженный цитотоксический эффект на клетки всех трех клеточных линий. При этом значительное цитотоксическое действие 5'-нораристеромицин проявлял в концентрации менее 1 мкМ. Рассчитанные методом нелинейной регрессии значения полумаксимальных ингибирующих концентраций (IC₅₀) данного препарата составили: для клеток линии Jurkat ~7.3, К562 ~1.7, ТНР-1 ~3.7 мкМ (рис. 1). Подобные значения предполагают возможную эффективность данного препарата и на моделях лабораторных животных и указывают на то, что он представляет интерес для дальнейшего изучения механизмов его действия в отношении злокачественных клеток лейкозов.

Наблюдение за развитием клинической картины интоксикации при воздействии 5'-нораристеромицина показало, что через 5 мин после поступления препарата в дозах 200 и 1000 мг/кг у мышей наблюдалось резкое возбуждение, нарушение функции задних конечностей. Гибель животных наступала в течение первых суток с момента введения. В первый час после введения 5'-нораристеромицина в дозах 50 и 80 мг/кг клинические проявления отсутствовали, затем развивалась малоподвижность, заторможенность. Введение вещества в дозе 40 мг/кг не сопровождалось клиническими симптомами интоксикации и гибелью животных.

В табл. 1 представлены результаты определения смертельных доз 5'-нораристеромицина после однократного внутривенного введения вещества.

Макроскопическая оценка органов павших животных показала, что основные изменения в них связаны с органами желудочно-кишечного тракта. В дозе от 80 до 1000 мг/кг препарат вызывал кровоизлияния в слизистую желудка и начального от-

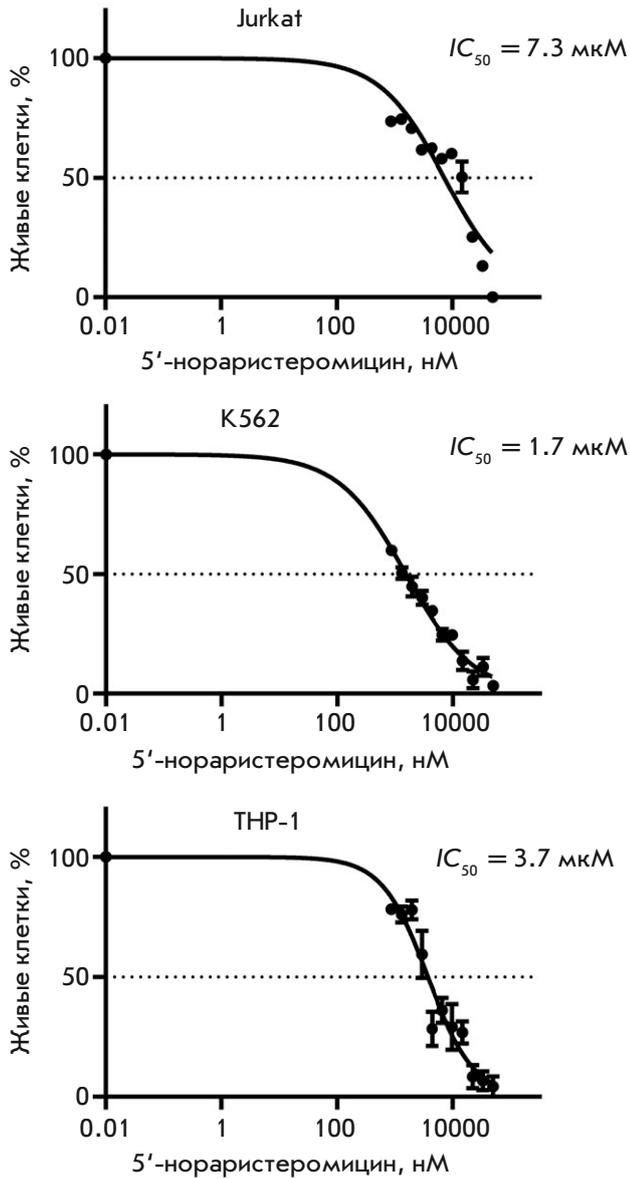


Рис. 1. Выживаемость клеток лейкозов после обработки 5'-нораристеромицином. Приведены кривые, отражающие содержание (%) живых клеток Jurkat, K562, THP-1 в лунках, обработанных препаратом в концентрации (0.86–50 μ М). Значения IC_{50} рассчитаны методом нелинейной регрессии и представлены справа от графиков для каждой из трех клеточных линий

Таблица 1. Дозы 5'-нораристеромицина, однократное внутривентрикулярное введение которых смертельно для нелинейных мышей

Доза, мг/кг	Число животных в группе/число павших	Расчетные значения смертельных доз, мг/кг		
		LD_{16}	LD_{50} с доверительными интервалами	LD_{84}
40	4/0	44.7	63.2 (52.7...75.8)	89.4
50	4/1			
80	4/3			
200	4/4			
1000	4/4			

дела тонкого кишечника с истончением их стенок, дряблостью, наличием в просвете тонкого кишечника слизистого содержимого желто-бурого цвета. После введения дозы 50 мг/кг у единственного павшего животного отмечали только дряблость тонкого кишечника с участками вздутия и слизеобразное содержимое желто-бурого цвета в просвете кишечника.

Введение животным 5'-нораристеромицина в дозе 80 мг/кг, близкой к среднесмертельной, приводило к выраженным изменениям гистоархитектоники исследуемых органов и тканей. Так, микроскопическое исследование стенки желудка выявило активацию главных и добавочных (слизистых) клеток, что сопровождалось дилатацией желез с накоплением в них слизистого содержимого (рис. 2А). При исследовании фрагмента тонкого кишечника выявляли гибель и слущивание многочисленных эпителиоцитов слизистой оболочки в просвет кишки. Сохранившиеся ворсинки приобретали более уплотненную форму, а на их апикальной поверхности отсутствовала каемка из микроворсинок. Также отмечали истончение подслизистого слоя и частичную редукцию мышечной и серозной оболочек (рис. 2Б).

В ткани печени отмечали тотальную дисконнексию печеночных балок, выраженный перипортальный стеатоз в сочетании с центрлобулярными участками гибели гепатоцитов (рис. 3А). При этом, согласно морфологическому исследованию, в гибели части печеночных клеток были признаки апоптоза, а другая часть клеток подвергалась некротическим изменениям (рис. 3Б). В относительно сохранных гепатоцитах отмечали или пикноз ядер, или перераспределение хроматина в подмембранное пространство ядра.

В селезенке подопытных животных регистрировали многочисленную гибель лимфоидных клеток по периферии фолликулов белой пульпы (рис. 4).

В почках подопытной мыши отмечали стазирование и сладжирование эритроцитов в капиллярной системе клубочков и межтубулярного пространства. Просвет многочисленных извитых канальцев был сужен вследствие гипертрофии выстилающих их

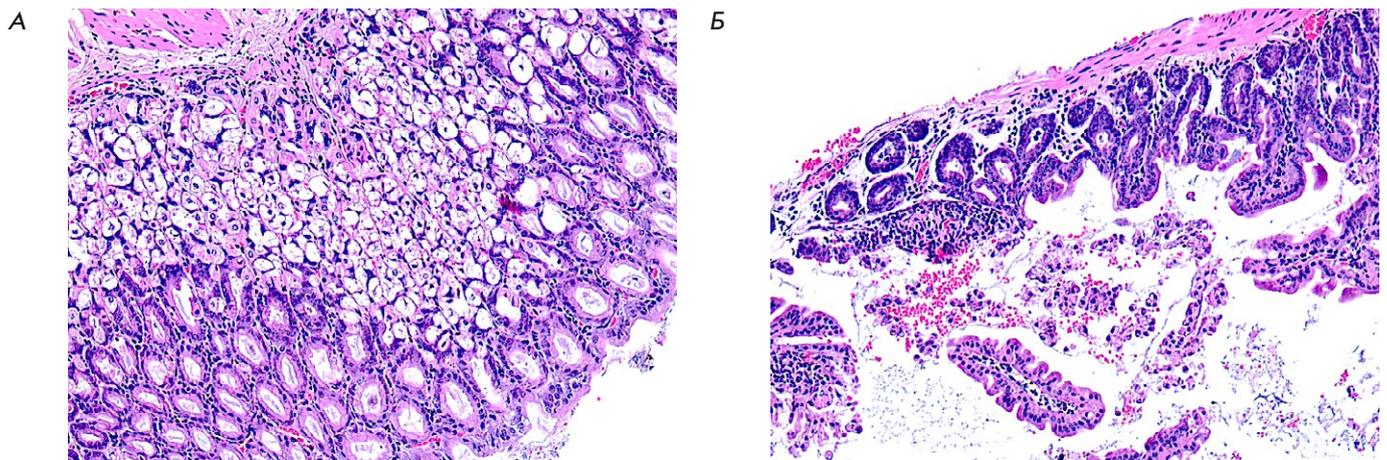


Рис. 2. Фрагмент слизистой оболочки стенки желудка (А) и тонкого кишечника (Б) подопытной мыши после введения 5'-нораристеромицина в дозе 80 мг/кг. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 200

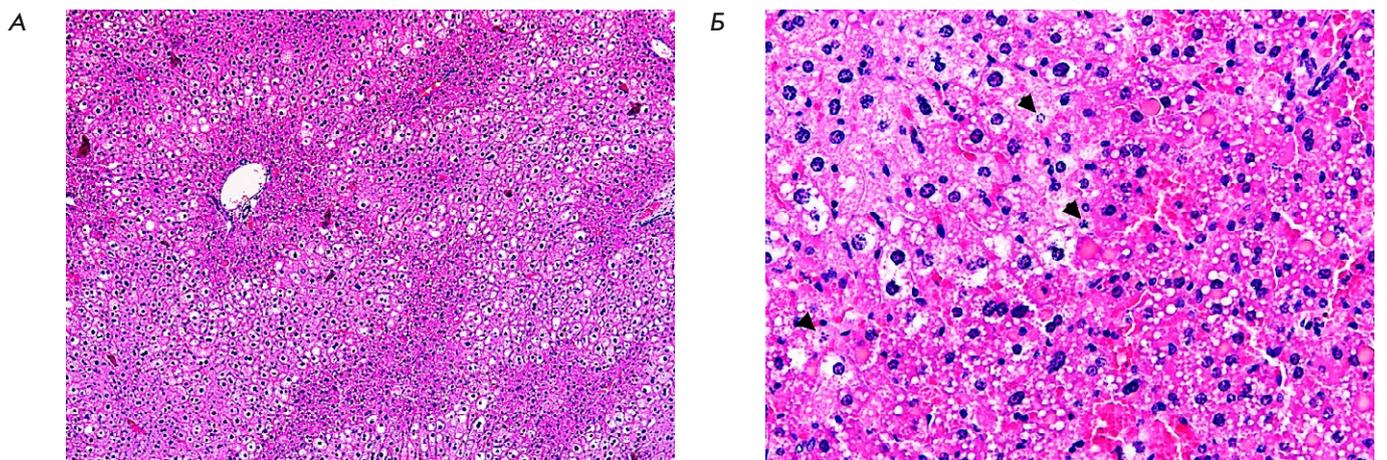


Рис. 3. Фрагмент ткани печени подопытной мыши после введения 5'-нораристеромицина в дозе 80 мг/кг. Гепатоциты с фрагментированным ядром – апоптотические клетки (показаны стрелкой), округлые клетки с гомогенной цитоплазмой – некротические клетки. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 100 (А); 400 (Б)

эпителиоцитов, а в цитоплазме клеток присутствовали многочисленные вакуоли (рис. 5А). В легочной ткани подопытной мыши отмечалась инфильтрация полиморфноядерными нейтрофилами межуточной ткани легкого. Также регистрировали утолщение и отек альвеолярных перегородок, явления диapedеза эритроцитов в межальвеолярные перегородки (рис. 5Б).

Таким образом, изучение токсических свойств 5'-нораристеромицина позволило установить его среднесмертельную дозу при пероральном введении для нелинейных мышей на уровне 63.2 мг/кг. Основными симптомами интоксикации в первые минуты были неврологические отклонения (резкое возбуждение и нарушение функции задних конечностей), а в более позднее время (в период от 2 ч до момента гибели) – выраженная гиподинамия.

Согласно клиническим проявлениям и результатам патоморфологического исследования введение 5'-нораристеромицина в дозах 50 мг/кг и выше вызывало у подопытных животных системное поражение внутренних органов и тканей. В первую очередь прямой негативный эффект проявлялся в органах желудочно-кишечного тракта (желудок, тонкий кишечник, печень) и иммунной системы (селезенка).

Внутрижелудочное введение 5'-нораристеромицина в дозе 40 мг/кг не вызывало у подопытных животных клинических признаков интоксикации и летальных исходов в течение всего срока наблюдения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный анализ результатов исследования показал высокую степень цитостатической активности вновь синтезированного химического вещества

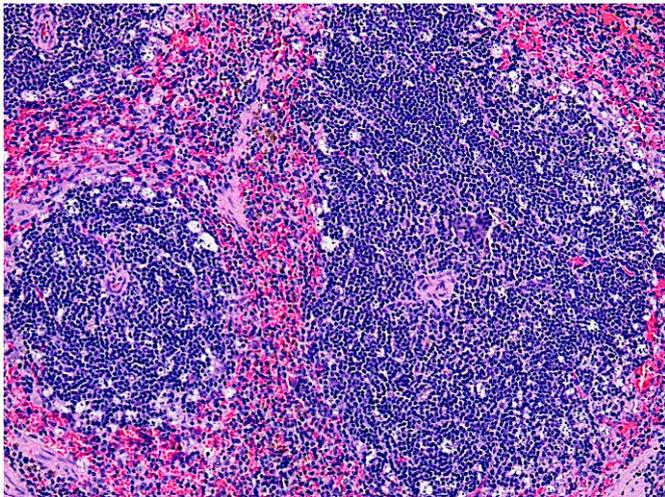


Рис. 4. Фрагмент селезенки подопытной мыши после введения 5'-нораристеромицина в дозе 80 мг/кг. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 200

5'-нораристеромицина в отношении культур клеток лейкозов линий Jurkat, K562 и ТНР-1 *in vitro*. Цитотоксическое действие соединения на клетки лейкозов проявляется уже в диапазоне концентраций от 1 до 10 мкМ. При этом не выявлено токсического действия данного вещества на животных при введении внутривенно в дозе менее 50 мг/кг. Необходимо отметить, что похожими токсическими параметрами обладают некоторые препараты, широко применяемые в терапии злокачественных заболеваний кроветворной системы. В качестве примера можно привести препарат этопозид, диапазон полумаксимальных действующих концентраций которого при добавлении к перевиваемым клеткам лейкоза составляет, согласно различным данным,

около 10–100 мкМ [21, 22]. При этом нелетальные дозы, применяемые в исследованиях на мышиных моделях, составляют около 50 мг/кг [23, 24].

В экспериментах на лабораторных животных в диапазоне летальных доз выявлен ряд особенностей общетоксического действия соединения. В дальнейшем в целях возможной разработки нового лекарственного препарата 5'-нораристеромицин будет нуждаться в доклиническом изучении с оценкой специфической противоопухолевой активности на моделях *in vivo*.

Полученные в ходе предварительных испытаний сведения о цитотоксическом потенциале исследуемого вещества в отношении клеток лейкоза, а также результаты исследования общетоксического действия на лабораторных животных позволяют отнести 5'-нораристеромицин к числу перспективных противоопухолевых агентов. Исследования механизма его цитотоксического действия в отношении злокачественных клеток и возможностей его применения в качестве одного из компонентов комбинированной терапии совместно с широко применяемыми химиотерапевтическими препаратами заслуживают дальнейшего более тщательного изучения. ●

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-64-10018, <https://rscf.ru/project/23-64-10018/>).

Определение полумаксимальных действующих концентраций в отношении клеток лейкозов выполнено при поддержке гранта 075-15-2019-1660 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

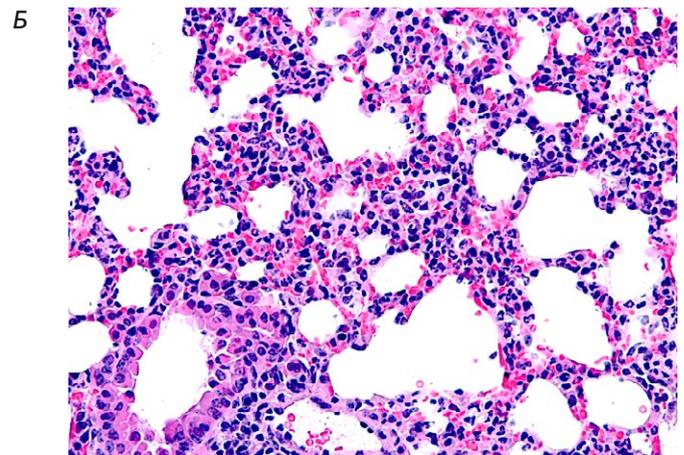
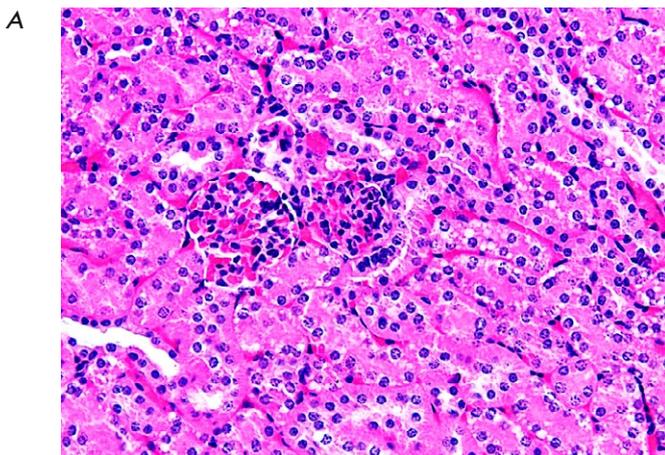


Рис. 5. Фрагмент ткани почки (А) и легкого (Б) подопытной мыши после введения 5'-нораристеромицина в дозе 80 мг/кг. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 400

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Clercq E. // *Med. Res. Rev.* 2009. V. 29. P. 611–645.
2. Scotto L., Narayan G., Nandula S.V., Arias-Pulido H., Subramaniyam S., Schneider A., Kaufmann A.M., Wright J.D., Pothuri B., Mansukhani M., et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. 2008. V. 47. P. 755–765.
3. Loo L.W., Tiirikainen M., Cheng I., Lum-Jones A., Seifried A., Church J.M., Gryfe R., Weisenberger D.J., Lindor N.M., Gallinger S., et al. // *Genes Chromosomes Cancer*. 2013. V. 52. P. 450–466.
4. Gros C., Fahy J., Halby L., Dufau I., Erdmann A., Gregoire J.M., Ausseil F., Vispe S., Arimondo P.B. // *Biochimie*. 2012. V. 94. P. 2280–2296.
5. Aury-Landas J., Girard N., Lhuissier E., Adouane D., Delepepe R., Boumediene K., Bauge C. // *Cell Physiol. Biochem*. 2019. V. 53. P. 731–745.
6. Hayden A., Johnson P.W., Packham G., Crabb S.J. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 127. P. 109–119.
7. Uchiyama N., Dougan D.R., Lawson J.D., Kimura H., Matsumoto S.I., Tanaka Y., Kawamoto T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 491. P. 1–7.
8. Uchiyama N., Tanaka Y., Kawamoto T. // *Eur. J. Pharmacol.* 2017. V. 812. P. 138–146.
9. Wu G., Wang N., Luo Y., Zhang Y., Wang P., Zhu Z., Gao Y., Du Z., Yang B. // *Tumour Biol.* 2017. V. 39. P. 1010428317699117.
10. Kusaka A., Yamamoto H., Shibata M., Muroi M., Kishi T., Mizuno K. // *J. Antibiotics*. 1968. V. 21. Is. 4. P. 255–263.
11. Patil S.D., Schneller S.W., Hosoya M., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. № 18. P. 3372–3377.
12. Siddiqi S.M., Chen X., Schneller S.W., Ikeda S., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., De Clercq E. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. P. 551–554.
13. Khandazhinskaya A.A., Shirokova E.A., Shipitsin A.V., Karpenko I.L., Belanov E.F., Kukhanova M.K., Yasko M.V. // *Coll. Czechoslovak Chem. Commun.* 2006. V. 71. P. 1107–1121.
14. De Clercq E. // *Nucleosides, Nucleotides. Nucl. Acids*. 1998. V. 17. № 1. P. 625–634.
15. Ito M., Hamano T., Komatsu T., Asamitsu K., Yamakawa T., Okamoto T. // *Modern Rheumatol.* 2014. V. 24. № 5. P. 775–780.
16. Singh D.B., Gupta M.K., Singh D.V., Singh S.K., Misra K. // *Interdisciplinary Sci.-Comput. Life Sci.* 2013. V. 5. № 1. P. 1–12.
17. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
18. Finney D.J. *Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve.* Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1947. 272 p.
19. Меркулов Г.А. *Курс патологистологической техники.* 5-е изд., испр. и доп. Л.: Медицина, Ленингр. отделение, 1969. 423 с.
20. *Микроскопическая техника: руководство / ред. Д.С. Саркисов, Ю.Л. Перов.* М.: Медицина, 1996. 544 с.
21. Husaini R., Ahmad M., Zakaria Z. // *Exp. Ther. Med.* 2017. V. 13. № 6. P. 3209–3216.
22. Zhou Z., Zwelling L.A., Ganapathi R., Kleinerman E.S. // *Br. J. Cancer.* 2001. V. 85. № 5. P. 747–751.
23. Slater L.M., Stupecky M., Sweet P., Osann K., Eklof A., Arquilla E.R. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2001. V. 48. № 4. P. 327–332.
24. Kluska M., Woźniak K. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 12. P. 6602.

УДК 577.2

Представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток в злокачественных эпителиальных опухолях человека

Е. А. Петров¹, Д. М. Малабуйок¹, Х. Чженг², Ю. А. Мокрушина^{1,3}, В. А. Абрикосова¹, Ю. Б. Кузьмин⁴, П. В. Царапаев⁴, С. О. Кочкина⁴, И. В. Ельцов⁴, В. Д. Кнорре¹, И. В. Смирнов^{1,3,5*}, С. С. Терехов¹, З. З. Мамедли⁴, Н. Е. Кушлинский⁴, Д. В. Рогожин⁴, В. Б. Матвеев⁴, П. В. Кононец⁴, И. С. Стилиди⁴, Х. Чжанг², А. Г. Габибов^{1,3}

¹ Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology and College of Life Sciences, Nankai University, 94 Weijin Road, Tianjin, 300071 China

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115522 Россия

⁵НМИЦ эндокринологии Минздрава России, Москва, 117292 Россия

*E-mail: ivansmr@inbox.ru

Поступила в редакцию 13.12.2023

Принята к печати 28.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27353

РЕФЕРАТ Онкологические заболевания остаются актуальной проблемой глобального здравоохранения. В число ключевых факторов, влияющих на течение заболевания, входят тип злокачественного новообразования и развитие иммунного ответа пациента на опухоль. Важную роль в формировании противоопухолевого ответа играет степень инфильтрации опухоли лимфоцитами, которая коррелирует с благоприятным прогнозом терапии определенных нозологических форм рака. Мы проанализировали представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток (ТІВ) в солидных опухолях различной нозологии. Показана повышенная представленность ТІВ в образцах рака ободочной и сигмовидной кишки по сравнению с образцами рака слепой и прямой кишки, а также рака почки. Медианные значения и интерквартильные интервалы доли ТІВ составляли соответственно 11.5%, 4–20% при раке ободочной кишки, 6%, 3–11% – раке сигмовидной кишки, 2.7%, 0.7–3.7% – раке слепой кишки, 2.5%, 0.9–3.6% – раке прямой кишки, 1.4%, 1.0–2.3% – раке почки и 3.0%, 1.8–12% – раке легкого. В то же время не выявлено достоверных отличий в представленности ТІВ в образцах рака разной стадии. Полученные результаты представляют особый интерес, указывая на высокий потенциал исследования рака ободочной кишки для поиска потенциальных онкомаркеров, а также изучения противоопухолевого ответа к обнаруженным онкомаркерам. Таким образом, дальнейшее изучение разнообразия ТІВ в злокачественных опухолях ободочной кишки позволит расширить наши знания о патогенезе и клиническом течении заболевания и будет способствовать идентификации новых молекулярных мишеней для направленной противоопухолевой терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА опухоль-инфильтрирующие В-клетки, колоректальный рак, солидные опухоли.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ КРР – колоректальный рак; НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; ПЖР – светлоклеточный почечноклеточный рак; ТІВ – tumor infiltrated В-cells (опухоль-инфильтрирующие В-клетки).

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные новообразования представляют одну из важнейших медико-социальных проблем. По данным ВОЗ, показатель заболеваемости раком продолжает неуклонно расти. Наиболее распространенными онкозаболеваниями являются рак молочной железы, рак легкого, рак толстой кишки и рак предстательной железы. Несмотря на улучшение

качества лечения и новые методы терапии, уровень смертности при некоторых видах опухолей, например, при раке легкого, толстой кишки и печени, остается на очень высоком уровне [1].

Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки играют ключевую роль в развитии иммунного ответа организма на опухоль, они способны проявлять как проопухолевое, так и противоопухолевое

действие. Опухоль-инфильтрирующие иммунные клетки представляют собой гетерогенную популяцию, включающую Т-клетки, В-клетки, естественные киллерные (НК) клетки, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки. Субпопуляционный состав и процентное соотношение иммунных клеток, инфильтрирующих опухоль, могут варьировать в зависимости от вида и стадии рака, а также от пациента к пациенту [2]. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ТИЛ) включают Т- и В-клетки, которые вышли из кровотока и мигрировали к опухоли. Присутствие ТИЛ в опухоли может быть прогностическим маркером благоприятного течения заболевания и эффективности терапии [3].

Исследования адаптивного иммунитета в онкоиммунологии в большей степени сосредоточены на CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитах (CTL). CTL признаются основными эффекторами противоопухолевого иммунного ответа, они обеспечивают прямое уничтожение трансформированных клеток. Высокий уровень инфильтрации опухоли CTL коррелирует с благоприятным прогнозом течения заболевания и увеличением общей выживаемости пациентов с многими видами рака [4]. CD4+ Т-клетки являются неотъемлемой частью адаптивного иммунитета, но роль, которую они играют в формировании иммунного ответа на опухоль, остается предметом споров [5]. Подобно CD8+ Т-клеткам, существуют опухолеспецифичные CD4+ Т-хелперные клетки (Th), способные распознавать опухолевые антигены и эффективно замедлять рост опухоли в модельных животных в отсутствие CTL [6]. Однако основное противоопухолевое действие CD4+ Th-клеток заключается в Th-опосредованной активации CTL для распознавания и уничтожения опухолевых клеток или активации других иммунных клеток, включая В-клеточное звено иммунного ответа [7]. В то же время известно, что субпопуляция CD4+ Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) напротив оказывает иммуносупрессивное действие в основном за счет продукции цитокинов (IL-10 и TGF β) и может подавлять противоопухолевую функцию эффекторных клеток микроокружения опухоли, способствуя злокачественному росту и неблагоприятному исходу [8].

Меньше известно о проникающих в опухоль В-клетках, которые часто колокализуются с Т-клетками, иногда образуя организованные лимфоидные структуры [9]. Опухоль-инфильтрирующие В-клетки (ТИВ) воздействуют на злокачественные новообразования посредством двух противоположных механизмов и могут как способствовать развитию опухоли, так и подавлять ее рост [10]. Противоопухолевое действие В-клеток реализуется различными способами. При развитии гумораль-

ного ответа на опухолевые неоантигены В-клетки дифференцируются в плазматические клетки и секретируют опухолеспецифичные антитела, которые опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Помимо продукции антител, В-клетки могут секретировать различные цитокины, влияя на функцию других иммунных клеток в микроокружении опухоли, причем действие может быть разнонаправленным. Так, секреция В-клетками IL-12 опосредует пролиферацию и противоопухолевое действие Т- и НК-клеток, а секреция IL-10 регуляторными В-клетками (Breg), направленная на подавление аутоиммунного ответа, может оказывать проопухолевое действие [11]. Кроме того, В-клетки способны выступать в качестве антигенпрезентирующих клеток (APC), при активации Th2-клеток CD40-лигандом они экспрессируют хемокины и костимулирующие факторы и индуцируют развитие Т-клеточного противоопухолевого иммунного ответа [12]. Таким образом, ТИВ обладают широким потенциалом для уничтожения опухолевых клеток и оказывают значительное влияние на баланс активации или супрессии других иммунных клеток в микроокружении опухоли.

Наиболее широко ТИВ изучали при раке молочной железы, где они найдены в 25% случаев и составляют до 40% популяции лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль. От представленности ТИВ при раке молочной железы зависят прогноз выживаемости пациентов и выбор терапии [13]. На данный момент известна положительная корреляция представленности ТИВ с благоприятным клиническим исходом меланомы [14], рака яичников, немелкоклеточного рака легкого [15], плоскоклеточного рака шейки матки [16, 17].

Цель настоящего исследования состояла в оценке представленности В-лимфоцитов в различных нозологических формах онкологических заболеваний и в анализе ассоциации содержания В-лимфоцитов с клинико-морфологическими характеристиками заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование было включено 50 пациентов, проходивших хирургическое лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Злокачественную природу опухоли у всех пациентов клинически верифицировали в рамках планового патоморфологического исследования. В исследование вошли доноры, не получавшие химиотерапию перед проведением оперативного вмешательства. Все пациенты дали информированное согласие на участие в исследовании, работа проведена с соблюдением действующих правовых и этических норм.

Выделение клеток из опухоли

Фрагмент опухоли размером ~ 0.5–2 см³ помещали в 50-мл пробирку с фосфатно-солевым буфером (PBS) сразу после проведения резекции опухоли, дальнейшую работу с материалом начинали в течение 1.5–3 ч после операции. Биологический материал транспортировали в лабораторию при комнатной температуре. Образец осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин (100 g, 24°C). Супернатант декантировали и добавляли 5 мл рабочей среды (смесь сред DMEM F12 и RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1, 10% бычьей фетальной сыворотки NuClone (Cytiva, США), с добавлением раствора антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, США) до 1%). Фрагмент опухоли переносили в 60-мм чашку Петри (SPL, Южная Корея) и механически измельчали с использованием медицинского скальпеля № 10 (Arxmed, Индия) на кусочки размером ~ 1–3 мм³. Полученную суспензию переносили в 15-мл пробирку и осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 5 мин (100 g, 24°C). Супернатант декантировали и добавляли 2 мл теплой рабочей среды, содержащей смесь ферментов: 0.5 мг ДНКазы I (Sigma, США), по 1 мг коллагеназы I и IV типов (Merck, США) и 2 мг гиалуронидазы (Microgen, Россия). Пробирку с фрагментами ткани помещали на вращающуюся платформу (Biosan, Латвия) и инкубировали в течение 40 мин при 7 об/мин в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C и 8% CO₂. По окончании инкубации раствор с клетками аккуратно перемешивали 25–50 раз с использованием серологической пипетки для разрушения агрегатов до получения однородной суспензии. Клеточную суспензию последовательно фильтровали через клеточные сита с размером пор 100, 70 и 40 мкм, каждый раз дополнительно промывая использованное сито 2 мл рабочей среды. Клетки осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 15 мин (300 g, 24°C). Клеточный осадок обрабатывали 1 мл АСК-буфера (150 мМ хлорид аммония; 10 мМ бикарбонат калия; 0.1 мМ EDTA-Na₂) в течение 1 мин для лизиса эритроцитов в случае необходимости, реакцию останавливали 2 мл рабочей среды. Клетки осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 7 мин (300 g, 24°C). Супернатант декантировали, клеточный осадок ресуспендировали в 2 мл культуральной среды (DMEM advanced 90% (Thermo Fisher Scientific), бычья фетальная сыворотка NuClone 10% (Cytiva, США), L-аланил-L-глутамин (Yeasen, США) до 2 мМ, антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher Scientific) до 1%) и оценивали число жизнеспособных клеток методом исключения красителя трипановый синий с использованием автоматического счетчика клеток

CellDrop FL (DeNovix, США). Часть полученных клеток окрашивали с последующим цитометрическим анализом, оставшуюся часть клеток подвергали криоконсервации в среде КриоМед-М («ПанЭко») согласно инструкции производителя.

Оценка количества В-лимфоцитов с использованием проточной цитофлуориметрии

Диссоциированные клетки опухоли (2 млн) осаждали в настольной центрифуге (Eppendorf) в течение 5 мин (350 g, 4°C). Среду декантировали, клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 0.5% БСА и 2 мМ EDTA. Окрашивание проводили с использованием моноклонального антитела мыши (клон 2D1) против общего лейкоцитарного антигена CD45 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой APC-Cy7 (Sony, США), в разведении 1 : 300 и моноклонального антитела мыши (клон H1B19) против В-лимфоцитарного антигена CD19 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой PE-Cy7 (BioLegend, США), в разведении 1 : 1000. Инкубацию с антителами проводили в течение 30 мин в темноте при температуре 4°C. Для идентификации мертвых клеток добавляли краситель SYTOX Green (BioLegend, США) в разведении 1 : 3000 и инкубировали дополнительно в течение 15 мин в темноте при 4°C. Далее образец трехкратно отмывали 500 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 2 мМ EDTA и ресуспендировали в 100 мкл для анализа окрашивания с помощью проточного цитофлуориметра ACEA Novocyte (ACEA Biosciences, США). Статистическую обработку данных проводили с использованием инструментов Python (seaborn, pandas). Оценивали значения медианы в каждой исследуемой группе, решение о достоверности различий, наблюдаемых между рассматриваемыми выборками, принимали на основании непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование включено 50 больных злокачественными новообразованиями различных нозологий: КРР ($n = 31$), НМРЛ ($n = 13$) и ПКР ($n = 6$). Выделение клеток из опухолевого материала проводили по протоколу [18] с некоторыми модификациями. Финальная схема получения гомогенной суспензии клеток включала механическое измельчение образца, диссоциацию фрагментов ткани с использованием смеси ферментов и три последовательных этапа фильтрации через клеточные сита с размером пор 100, 70 и 40 мкм (рис. 1).

Механическая диссоциация включает измельчение фрагмента опухоли с помощью медицинского скальпеля на небольшие кусочки для увеличения

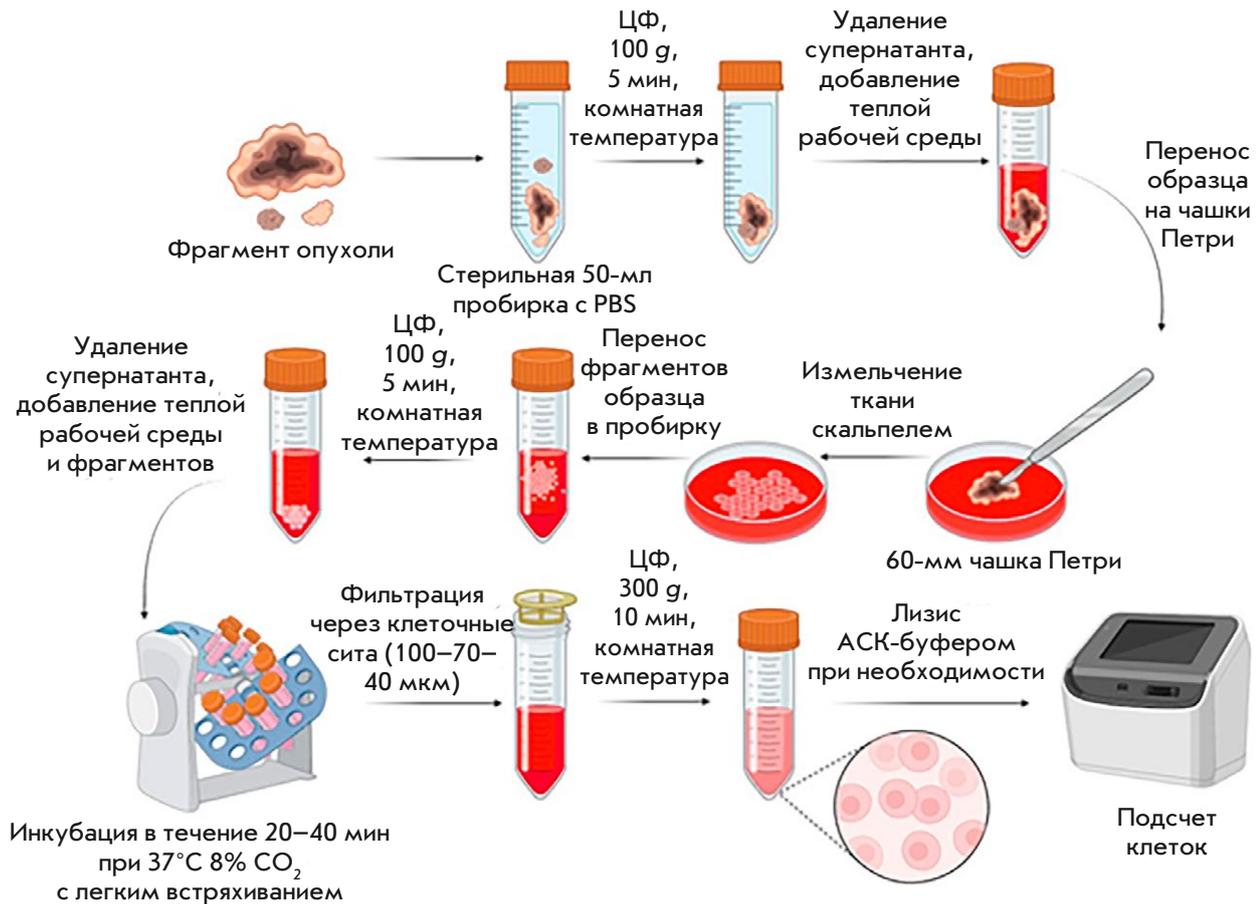


Рис. 1. Схема диссоциации опухолевой ткани

площади контакта ткани с ферментами на следующей стадии. Для разрушения внеклеточного матрикса и получения суспензии клеток опухоли применяют ферментативную диссоциацию с использованием ферментов, обладающих коллагеназной, гликозидазной и протеолитической активностью. Тип ферментов, используемых для диссоциации, может значительно влиять на количественный выход и показатель жизнеспособности получаемых клеток. В ходе исследования была подобрана оптимальная комбинация ферментов, состоящая из гиалуронидазы, ДНКазы I, коллагеназы I и IV типов (1.0; 0.25, 0.5 и 0.5 мг/мл соответственно; см. «Экспериментальная часть»), использование которой приводит к эффективному разрушению клеточных контактов. Эта комбинация позволила нам сократить продолжительность стадии ферментативной диссоциации до 30–40 мин и повысить выход жизнеспособных клеток до 80% и более. Фильтрацию полученной суспензии необходимо для дальнейшей дезагрегации препарата клеток, при этом использование клеточного сита с размером пор 100 мкм позволило эффективно удалять крупные клеточные конгломе-

раты, жировую фракцию и облегчило дальнейшее фильтрование образца через сита с размером пор 70 и 40 мкм для получения гомогенной суспензии клеток. Таким образом, использование сочетания механической и ферментативной диссоциации опухолевой ткани позволило получить однородную суспензию клеток с высоким уровнем жизнеспособности, составляющим в среднем 88%.

Для идентификации и количественной оценки популяции В-клеток, отражающей степень инфильтрации опухолевой ткани, все образцы были проанализированы с помощью проточной цитометрии (рис. 2). Окрашивание проводили с использованием моноклональных антител против общего лейкоцитарного антигена CD45 человека, конъюгированного с флуоресцентной меткой APC-Cy7 (CD45 APC-Cy7), и антител к В-лимфоцитарному антигену CD19 человека, конъюгированному с флуоресцентной меткой PE-Cy7 (CD19 PE-Cy7). На первом этапе на точечной диаграмме FSC (прямое светорассеяние) против SSC (боковое светорассеяние) идентифицировали популяцию клеток из опухоли (рис. 2А), далее отделяли одиночные клетки от кле-

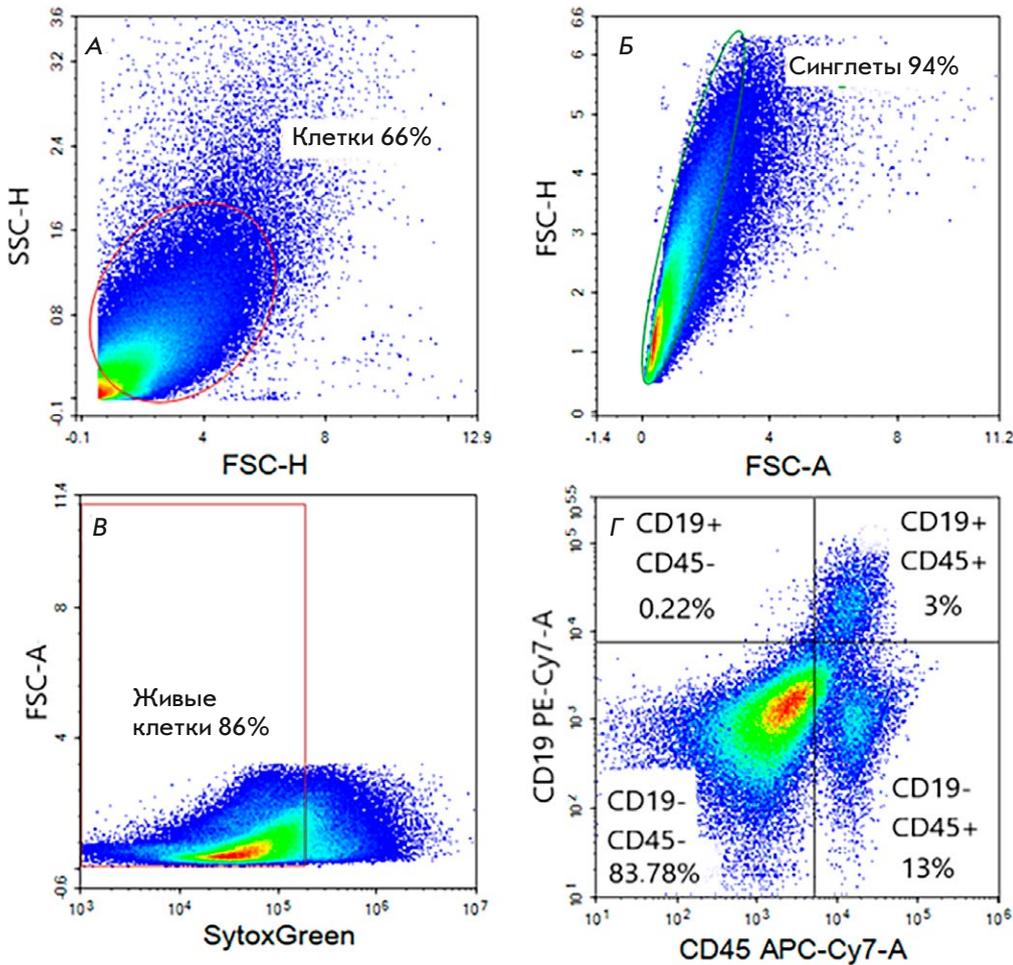


Рис. 2. Стратегия последовательного гейтирования при оценке доли опухоль-инфильтрирующих В-клеток. А – овальной областью выделены клетки, соответствующие по показателям бокового и прямого светорассеяния популяции клеток из опухоли. Б – овальной областью выделены одиночные клетки. В – прямоугольной областью выделена популяция живых клеток. Г – изображение поделено на квадранты, соответствующие субпопуляциям клеток CD45-/CD19-, CD45-/CD19+, CD45+/CD19- и CD45+/CD19+. Субпопуляция клеток CD45+/CD19+ соответствует В-клеткам

точных агрегатов, способных давать завышенное значение флуоресцентного сигнала при дальнейшем определении количества В-клеток (рис. 2Б). На втором этапе проводили гейтирование живых клеток среди одиночных клеток (рис. 2В) по окрашиванию флуоресцентным красителем SytoxGreen, высокоаффинным к нуклеиновым кислотам. Краситель проникает только в клетки с поврежденными плазматическими мембранами, поэтому его используют для оценки жизнеспособности клеток. Затем среди живых клеток выделяли четыре субпопуляции в соответствии с окрашиванием специфическими антителами к поверхностным антигенам CD45 и CD19, где В-клеткам соответствует гейт с двойным положительным окрашиванием (рис. 2Г).

Аналогичным образом были проанализированы образцы клеток образцов всех исследуемых нозологий, содержание количества CD19+ В-клеток значительно варьировало от 0.4 до 40% (рис. 3А).

Наибольшее процентное содержание ТИВ наблюдалось у пациентов с раком ободочной и сигмовидной кишки, медиана значений по группе составила 11.5 и 6% соответственно ($p < 0.05$). Для остальных

групп (рак слепой и прямой кишки, рак легкого) медианное значение доли В-клеток составляло около 3%. Самое низкое содержание доли В-клеток зафиксировано при раке почки – медиана составила 1%.

Интерквартильные интервалы доли ТИВ составляли, соответственно, 4–20% при раке ободочной кишки, 3–11% – раке сигмовидной кишки, 0.7–3.7% – раке слепой кишки, 0.9–3.6% – раке прямой кишки, 1.0–2.3% – раке почки и 1.8–12% – раке легкого.

Проведен анализ представленности ТИВ в образцах рака ободочной кишки в зависимости от стадии заболевания (рис. 3Б).

Полученные результаты не выявили статистически значимых различий в процентном содержании ТИВ на разных стадиях опухолей.

Обобщенный анализ содержания В-лимфоцитов при КРП и клинико-морфологических характеристик заболевания представлен в табл. 1.

Выявлена прямая корреляция между количеством В-клеток и размером опухоли, а именно, опухоли большего размера характеризуются большим содержанием В-клеток. Также стоит отметить, что низкодифференцированные опухоли характеризуются

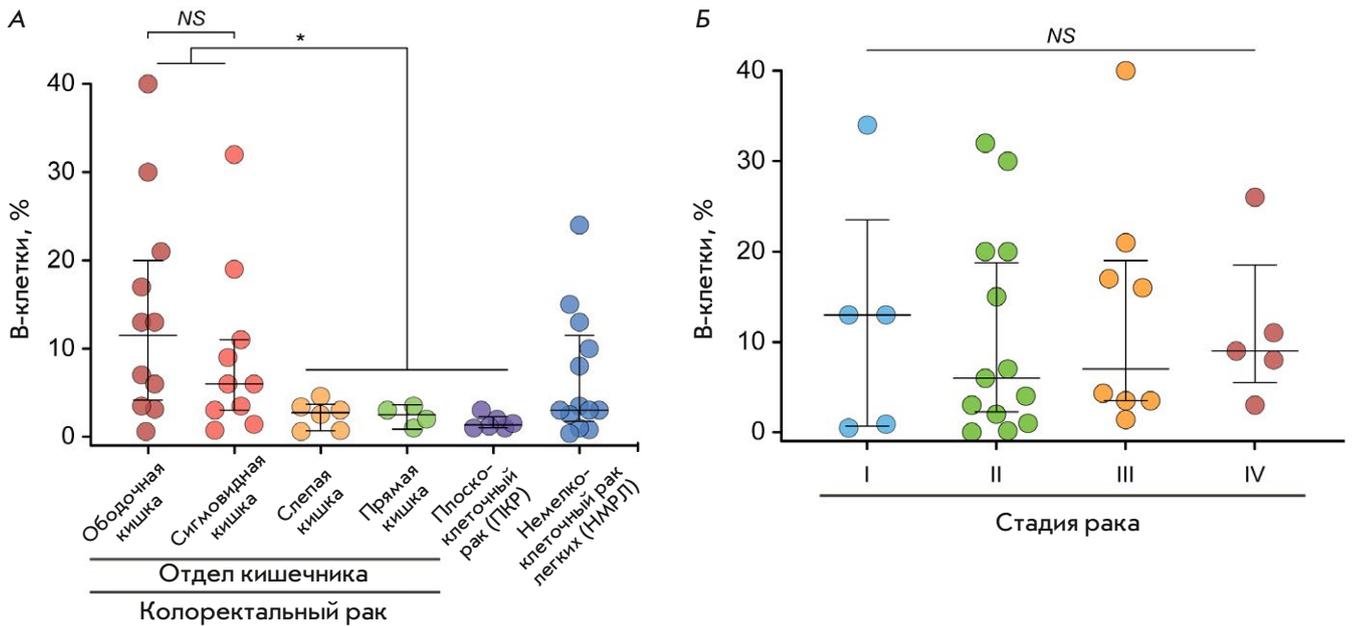


Рис. 3. А – оценка количества опухоль-инфильтрирующих В-клеток в опухолевом материале различной нозологии. Б – представленность опухоль-инфильтрирующих В-клеток в образцах рака ободочной кишки в зависимости от стадии. Статистический анализ проведен с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни. * $p < 0.05$; NS – нет достоверного отличия

Таблица 1. Ассоциация содержания В-клеток при колоректальном раке с клинко-морфологическими характеристиками опухоли

Характеристика	n	CD19+ В-клетки, %		
		медиана	квартили 25–75%	p
Возраст				
≤63	15	7.0	3.5–15.0	0.428
>63	16	3.3	2.1–14.5	
Пол/Gender				
Мужской/male	14	7.0	3.5–20.0	0.135
Женский/female	17	3.5	2.3–8.5	
Стадия/Stage				
I–II	18	6.0	1.8–16.3	0.805
III–IV	13	3.5	2.8–12.0	
Степень дифференцировки опухоли (G)/Grade				
G1	4	3.8	2.1–9.5	0.175
G2–G3	27	15.0	6.0–20.0	
Размер опухоли (T)/Tumor size				
T1–T2	20	1.9	0.2–3.1	0.019*
T3–T4	11	6.0	3.0–16.0	
Наличие регионарных метастазов (N)/Nodal status				
N0	29	5.15	2.0–13.8	0.707
N1	2	4.0	3.0–16.0	
Наличие отдаленных метастазов (M)/Metastasis				
M0	28	4.3	2.3–15.5	0.727
M1	3	6.0	4.0–8.0	
Локализация				
толстая кишка	27	6.0	2.5–16.0	0.255
прямая кишка	4	3.25	2.3–3.9	
Отдел толстой кишки				
левый	14	5.15	1.7–9.3	0.296
правый	13	8.0	2.8–18.5	

большим содержанием В-клеток, однако эти результаты не достигали статистической значимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным 2020 года, в мире зарегистрировано 1.9 млн новых случаев колоректального рака. По некоторым оценкам, в России ежегодное увеличение составляет около 50 тысяч новых случаев в год. Колоректальный рак достаточно поздно выявляется, поэтому летальность от него довольно высока и достигает 40% в течение года с момента обнаружения опухоли [19] и, по данным Всемирной организации здравоохранения, он является второй по значимости причиной смерти от рака во всем мире [20]. В связи с этим поиск терапевтически значимых онкоспецифических антигенов и/или терапевтических антител к ним становится важнейшей задачей.

Полученные в ходе исследования данные позволяют расширить знания о представленности Т1В в различных нозологических формах онкологических заболеваний. Установлено, что рак ободочной кишки характеризуется наибольшим процентным содержанием Т1В. Забор материала для исследо-

ваний можно проводить независимо от стадии заболевания, поскольку не выявлено достоверных различий в представленности В-клеток на разных стадиях прогрессии опухолей. Однако есть противоречивые данные, что количество Т1В при колоректальном раке зависит от стадии развития опухоли [21]. Известно также, что число внутриопухолевых В-клеток обратно коррелирует со стадией рака легкого [22].

С фундаментальной точки зрения глубокое профилирование Т1В расширяет знания о закономерностях иммунного ответа на раковые клетки и открывает новые возможности для поиска потенциальных маркеров злокачественной трансформации. С практической точки зрения опухоль-инфильтрирующие В-клетки можно использовать для создания библиотек антител с целью дальнейшей разработки CAR-T-терапии и других подходов персонализированной терапии. ●

Исследование поддержано совместным грантом РФФ № 23-44-00043 и грантом Национального фонда естественных наук Китая 82261138553.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения. Официальный сайт ВОЗ. Доступно по: <https://www.who.int/>
2. Kim S., Kim A., Shin J.Y., Seo J.S. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 9536.
3. Brummel K., Eerkens A.L., de Bruyn M., Nijman H.W. // *Br. J. Cancer.* 2023. V. 128. № 3. P. 451–458.
4. Yu P., Fu Y.X. // *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 2006. V. 86. № 3. P. 231–245.
5. Tay R.E., Richardson E.K., Toh H.C. // *Cancer Gene Ther.* 2021. V. 28. № 1–2. P. 5–17.
6. Perez-Diez A., Joncker N.T., Choi K., Chan W.F., Anderson C.C., Lantz O., Matzinger P. // *Blood.* 2007. V. 109. № 12. P. 5346–5354.
7. Fearon E.R., Pardoll D.M., Itaya T., Golumbek P., Levitsky H.I., Simons J.W., Karasuyama H., Vogelstein B., Frost P. // *Cell.* 1990. V. 60. № 3. P. 397–403.
8. Pati S., Chowdhury A., Mukherjee S., Guin A., Mukherjee S., Sa G. // *Appl. Cancer Res.* 2020. V. 40. № 1. P. 7.
9. Sharonov G.V., Serebrovskaya E.O., Yuzhakova D.V., Britanova O.V., Chudakov D.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2020. V. 20. № 5. P. 294–307.
10. Zhang E., Ding C., Li S., Zhou X., Aikemu B., Fan X., Sun J., Zheng M., Yang X. // *Biomark. Res.* 2023. V. 11. № 1. P. 28.
11. Li Q., Teitz-Tennenbaum S., Donald E.J., Li M., Chang A.E. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 5. P. 3195–3203.
12. Guo F.F., Cui J.W. // *J. Oncol.* 2019. V. 2019. P. 2592419.
13. Marsigliante S., Bisozzo L., Marra A., Nicolardi G., Leo G., Lobreglio G.B., Storelli C. // *Cancer Lett.* 1999. V. 139. № 1. P. 33–41.
14. Willsmore Z.N., Harris R.J., Crescioli S., Hussein K., Kakkassery H., Thapa D., Cheung A., Chauhan J., Bax H.J., Chenoweth A., et al. // *Front. Immunol.* 2021. V. 11. P. 622442.
15. Federico L., McGrail D.J., Bentebibel S.E., Haymaker C., Ravelli A., Forget M.A., Karpinetz T., Jiang P., Reuben A., Negrao M.V., et al. // *Ann. Oncol. Off J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2022. V. 33. № 1. P. 42–56.
16. Reuschenbach M., von Knebel Doeberitz M., Wentzensen N. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. № 10. P. 1535–1544.
17. Coronella-Wood J.A., Hersh E.M. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2003. V. 52. № 12. P. 715–738.
18. Leelatian N., Doxie D.B., Greenplate A.R., Sinnaeve J., Ihrie R.A., Irish J.M. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2017. V. 118. P. 25C.1.1–25C.1.23.
19. Avksentyeva M. // *Eur. J. Health Econ. HEPA Health Econ. Prev Care.* 2010. V. 10. Suppl 1. P. S91–98.
20. Всемирная организация здравоохранения. Официальный сайт ВОЗ. Доступно по: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/colorectal-cancer>.
21. Bindea G., Mlecnik B., Tosolini M. // *Immunity.* 2013. V. 39. № 4. P. 782–795.
22. Gottlin E.B., Bentley R.C., Campa M.J., Pisetsky D.S., Herndon J.E., Patz E.F. // *J. Thorac. Oncol. Off Publ. Int. Assoc. 2011. V. 6. № 10. P. 1687–1690.*

УДК 577.1

Синтетические повреждения с флуоресцеинкарбамоильной группировкой как аналоги объемных повреждений, удаляемых системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Сравнительное исследование свойств

А. А. Попов, В. М. Голышев, Л. С. Королева, К. Д. Назаров, Р. О. Анарбаев, И. О. Петрусева
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090
Россия

E-mail: irapetru@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 03.05.2024

Принята к печати 05.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27419

РЕФЕРАТ Система эксцизионной репарации нуклеотидов млекопитающих (ЭРН) с широкой субстратной специфичностью удаляет из ДНК объемные повреждения. В работе системы ЭРН принимает участие более 30 белков. Большое число белков-участников, существование двух ветвей ЭРН (общегеномная репарация и репарация, ассоциированная с транскрипцией), необходимость в использовании протяженных ДНК-субстратов, а также объемные повреждения, индуцируемые в ДНК в ходе химиотерапии, направляют усилия исследователей в сторону поиска эффективных методов оценки активности ЭРН и модельных ДНК, имеющих выраженные субстратные свойства в реакции удаления повреждения. В данной работе проведено сравнительное исследование свойств модельных ДНК, содержащих объемные повреждения, одно из которых – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFluL), эффективно распознается и элиминируется из ДНК системой ЭРН; второе, N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол (nFluS), ранее для создания субстратов системы ЭРН не использовали. Оценка эффективности специфической эксцизии этих повреждений белками ЭРН-компетентного клеточного экстракта, проведенная методом 3'-концевого мечения продуктов эксцизии, показала, что удаление nFluS происходит в 2 раза более эффективно. Результаты сравнительного анализа влияния nFluL и nFluS на геометрию и термостабильность ДНК-дуплексов, а также результаты спектрофотометрического и спектрофлуориметрического титрования nFluL- и nFluS-ДНК комплементарной цепью ДНК позволяют заключить, что отсутствие в структуре nFluS протяженного гибкого линкера меняет характер взаимодействия объемного флуоресцеинового фрагмента ненуклеозидного повреждения с азотистыми основаниями соседних звеньев дцДНК и ассоциировано с эффективным удалением этого синтетического аналога объемного повреждения из модельного ДНК-субстрата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эксцизионная репарация нуклеотидов, объемные повреждения ДНК, спектрометрическое титрование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ОГ-ЭРН – общегеномная ЭРН; nFluL – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFluS – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол; ОДН – олигодезоксирибонуклеотид.

ВВЕДЕНИЕ

Поддержание целостности и стабильности генома обеспечивается механизмами репарации ДНК. Одним из таких механизмов является эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН), ответственная за удаление объемных повреждений. Как правило, это ковалентные аддукты, присутствие кото-

рых вносит существенные изменения в регулярную структуру ДНК. В результате многостадийного процесса, в ходе которого белки последовательно формируют на ДНК в районе повреждения многосубъединичные комплексы переменного состава, повреждение распознается и удаляется из ДНК в составе окружающего его фрагмента цепи раз-

мером от 24 до 32 нуклеотидов. Исходная последовательность восстанавливается действием репарационных полимераз и ДНК-лигаз с использованием неповрежденной цепи ДНК в качестве матрицы. Различают две ветви ЭРН – независимую от функционального состояния генома, так называемую общегеномную ЭРН (ОГ-ЭРН), и репарацию, ассоциированную с транскрипцией [1, 2].

Система ЭРН характеризуется широкой специфичностью и удаляет из ДНК повреждения разной структуры: продукты, возникающие при воздействии УФ- и радиоактивного излучения, химически активных веществ из внешней среды, например, полициклических ароматических углеводородов и их активных метаболитов, диолэпоксидов. Действие многих химиопрепаратов также основано на формировании объемных аддуктов с ДНК. Изучению механизма ЭРН посвящено большое количество исследований. К настоящему времени обнаружены основные белки-участники ЭРН в клетках живых организмов, определены их функции, характер белковых взаимодействий и основные этапы данного процесса [1, 3]. Тем не менее многие детали механизма ЭРН и работы конкретных белков остаются неясными и продолжают изучаться на уровне белково-нуклеиновых комплексов [4–7]. Большой интерес – как фундаментальный, так и прикладной – вызывает сравнительная оценка активности ЭРН *in vitro*. Для оценки активности ОГ-ЭРН в таких исследованиях наиболее широко используются модельные субстраты, представляющие собой протяженные (не менее 120 п.н.) линейные ДНК-дуплексы, одна из цепей которых содержит во внутренней позиции объемное повреждение [8–11]. Подобные дуплексы различной длины используют и при изучении механизмов взаимодействия с поврежденной ДНК рекомбинантных белков, отвечающих за протекание обеих ветвей ЭРН [7, 12], а также при изучении функционирования ЭРН в контексте нуклеосом [4].

Модельные ДНК часто создают с использованием синтетических аналогов повреждений, вводимых в ДНК с помощью автоматического синтеза, что налагает определенные требования на свойства включаемого в цепь ДНК модифицированного звена [13]. Таким образом, поиск аналогов объемных

повреждений, структура которых, с одной стороны, обеспечивает их эффективное удаление системой ЭРН, а с другой – позволяет стабильно и с высокой эффективностью встраивать модифицированные звенья в модельные ДНК, является актуальной задачей. Модельные ДНК, содержащие такие повреждения, могут использоваться для оценки активности системы ЭРН, в том числе в практических целях, для понимания того, насколько активно те или иные клетки могут противостоять появлению индуцированных проведением химиотерапии или спонтанных повреждений, а также как инструмент для изучения деталей механизма работы этой системы репарации.

В данной работе предпринято сравнительное изучение свойств модельных ДНК-дуплексов, содержащих синтетические объемные повреждения, различающиеся способом соединения N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоильного фрагмента с пропандиольной вставкой. С использованием ДНК, содержащей N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол (nFluL), который эффективно удаляется белками системы ЭРН, проведены сравнительные исследования активности ЭРН в экстрактах клеток различных млекопитающих [14–17]. N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-3-амино-1,2-пропандиол (nFluS) в качестве модельного повреждения ранее не исследовали (рис. 1).

Структура повреждения nFluS, не содержащего гексаноильный линкер, выбрана на основании результатов наших работ, в которых была проанализирована эффективность первичного распознавания комплексами белка ХРС участка ДНК, содержащего повреждение, и проверки наличия в дестабилизированной области дцДНК объемного повреждения, осуществляемой АТФ-зависимой 5'→3'-хеликазой XPD – субъединицей комплекса ТФIIH. Выбрав для анализа несколько модельных ДНК, содержащих повреждения, которые с разной эффективностью удаляются белками системы ЭРН, мы показали, что самое высокое сродство XPD проявляет к nFlu-содержащей модельной ДНК [18]. Результаты моделирования молекулярной динамики показали, что наличие протяженного гибкого линкера позволяет флуоресцеиновому фрагменту менять расположение и взаимодействовать с несколь-

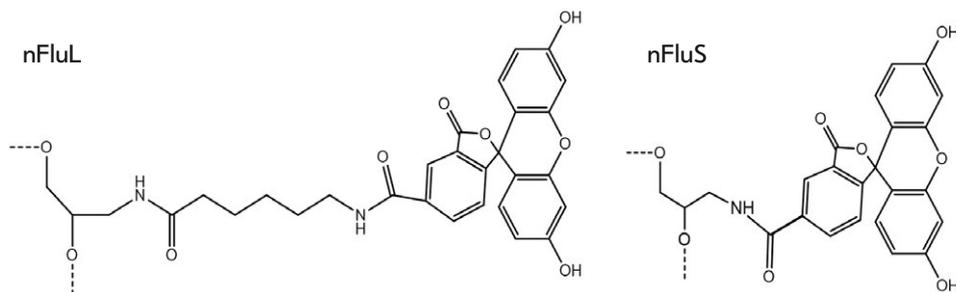


Рис. 1. Синтетические аналоги повреждений, используемые в работе. nFluL – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nFluS – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол

Таблица 1. ОДН, использованные в работе

№	Последовательность	Длина, н.	Описание
1	P-5'-atccagggcgacggtg	16	Немодифицированная цепь (серединное звено)
2	P-5'-atccagggm ^S gacggtg	16	ОДН с нуклеотидным звеном, несущим остаток флуоресцеина (nFluS), для включения в верхнюю цепь (серединное звено, ОДН-2)
3	P-5'-atccagggm ^L gacggtg	16	ОДН с нуклеотидным звеном, несущим остаток флуоресцеина и с линкером на основе аминокислотной кислоты (nFluL), для включения в верхнюю цепь (серединное звено верхней цепи, ОДН-3)
4	P-5'-caccgtcgccttgat	16	Нижняя цепь без модификации
5	5'-tggacgatatcccgaagagcccgccagctaccg-gcataaccaagcctatgcctacagc	59	5'-компонента для верхней цепи (левое плечо верхней цепи)
6	P-5'-ccgaggatgacgatgagcgcattgtagattcat acacgggtgctgactgcgtagcaatt	62	3'-компонента для верхней цепи (правое плечо верхней цепи)
7	5'-catctcggcaccgtcgccttgatgctgtaggcatag	38	Комплементарная цепь для лигирования трех фрагментов верхней цепи базовой последовательности
8	5'- tgcgctcatgctcatctcggcaccgtcgccttgatg ctgtaggcataggctt	54	Нижняя немодифицированная цепь (серединное звено для нижней цепи, ОДН-7)
9	5'-ggggcgctacctgtgagcaatcgtgttcatcat-P	34	Матрица для достройки продуктов эксцизии [α - ³² P]-dCMP
10	5'-P-gggtatgccggtactgcccggcctcttgcgggata tegtcca	42	3'-компонента для нижней цепи (правое плечо нижней цепи)
11	5'-cgatgagcgcattgtagatttc	23	Комплементарная цепь для лигирования ОДН-7 и левого плеча нижней цепи
12	5'-agtaccggcataaccaagcctatgcc	26	Комплементарная цепь для лигирования ОДН-7 и правого плеча нижней цепи

кими участками дцДНК, окружающей повреждение, в том числе и с 3'-стороны от повреждения, вызывающая дестабилизацию структуры ДНК в этой области [17, 18]. Связывание ХРС с расположенным таким образом участком дестабилизированной ДНК приводит к формированию непродуктивных для репарации комплексов ХРС–ДНК, поскольку связавшийся с 3'-стороны от повреждения и продвигающийся в направлении 5'→3' верифицирующий комплекс ТФИИ с повреждением не сталкивается и покидает ДНК [19, 20]. Наиболее детальное представление о структуре и взаимодействиях объемных повреждений ДНК обеспечивают методы ЯМР, однако для таких исследований необходимы миллиграммовые количества образцов ДНК, несущей повреждение.

Помимо сравнительной оценки эффективности специфической эксцизии nFluS и nFluL белками ЭРН-компетентного экстракта клеток HeLa, нами методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала определена также степень влияния nFluS или nFluL во внутренней позиции одной из цепей ДНК-дуплексов (16 п.н.) на геометрию дцДНК и ее термостабильность. Кроме того, проведены эксперименты по спектрометрическому титрованию, в результате которых получены данные о характере взаимодействия полициклических фрагментов объемных повреждений с азотистыми основаниями соседних звеньев ДНК [21].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

ЭРН-компетентный экстракт клеток HeLa был приготовлен по стандартной методике [22]. Использовали Т4-полинуклеотидкиназу, Т4-ДНК-лигазу и Таq-ДНК-полимеразу производства «Биосан» (Россия), протеиназу К (Sigma, США), EDTA, Tris, Нерес, дитиотреитол (ДТТ, Sigma). Олигодезоксирибонуклеотиды (ОДН) синтезировали в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН, использованные при синтезе амидофосфиты были производства («НаноТех-С», Россия), [γ -³²P]-АТР (3000 Ки/ммоль) и [α -³²P]-дСТР (3000 Ки/ммоль) произведены в ИХБФМ СО РАН. В работе также использовали DEAE-фильтры DE-81 (Whatman, Великобритания), мочевины, N,N'-метиленисакриламид (Amresco, США), акриламид (Applichem, ФРГ), TEMED (Helicon, Россия). Использовали также: PSA, MgCl₂, NaCl, H₃BO₃, NaOH, NaCac, LiClO₄, (NH₄)₂SO₄, HCl, ацетон.

Нуклеотидные последовательности всех ОДН, использованных в работе, приведены в табл. 1.

Синтез протяженных модельных ДНК

Протяженные модельные ДНК 137 п.н. синтезировали с использованием ОДН 1–3 и 5–12 и Т4-ДНК-лигазы как описано ранее [14]. Последовательности

ОДН и протяженных модельных ДНК не отличались от использованных нами ранее.

Оценка субстратных свойств модельных ДНК-дуплексов, содержащих флуоресцеиновые аддукты

Для сравнительного анализа эффективности специфической эксцизии использовали метод 3'-концевого мечения продуктов эксцизии [14]. Реакционную смесь для проведения реакции (30 мкл), которая содержала 16 нМ ДНК-субстрат, 1.6 мг/мл NER-компетентного экстракта клеток и 0.5 мкМ матричный ОДН-9 для гибридизации продуктов эксцизии, в буфере (25 мМ Tris-HCl, pH 7.8; 45 мМ NaCl; 4.4 мМ MgCl₂; 0.1 мМ EDTA; 4 мМ АТР) инкубировали при 30°C в течение 10–40 мин. Для инактивации реакции смесь нагревали до 95°C, после чего охлаждали до комнатной температуры. После добавления 3 мкл смеси, содержащей 100 мкМ dATP, dGTP и dTTP, 5 ед. Taq-ДНК-полимеразы и 500–750 Бк [α -³²P]-dCTP, смесь инкубировали при 37°C в течение 5 мин, затем добавляли 0.5 мкл 50 мкМ dCTP, после чего инкубировали в течение еще 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя раствор протеиназы К (4 мкг/мл), 10% SDS (по 1 мкл) и выдерживая смесь в течение 30 мин при 37°C. Продукты реакции переосаждали в 96% этаноле, после чего центрифугировали при 12000 g (4°C), отмывали в 70% этаноле, а полученный осадок растворяли в воде. Продукты реакции разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях. Гели, содержащие радиоактивно меченные образцы ДНК, анализировали с помощью радиолуминесцентного экрана Imaging Screen-K (Kodak, США) с последующим сканированием на GE Turphoon FLA 9500. Для количественного анализа результатов использовали программу Quantity One.

Определение угла изгиба ДНК-дуплексов

Угол изгиба дуплексов рассчитывали на основе данных об электрофоретической подвижности в неденатурирующих условиях (10% ПААГ, 1 × TBE, 4°C) по формуле:

$$\alpha = \pi - \arccos \sqrt{\frac{\mu_{\text{модиф.}}}{\mu_{\text{немодиф.}}}}$$

где $\mu_{\text{модиф}}$ и $\mu_{\text{немодиф}}$ – электрофоретические подвижности дуплексов при разделении в неденатурирующем геле.

Оценка термостабильности ДНК-дуплексов методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала

В экспериментах использовали спектрофотометр Cary 300-Bio (Varian, Австралия), оборудованный шестисекционным элементом Пельтье для изме-

нения температуры, и кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0.2 см. Использовали диапазон температур 5–95°C. Температуру образца в каждой кювете откалибровывали с использованием термодатчика Temperature Probes Series II (Varian, Австралия). Измерения проводили на длинах волн 260, 270 и 300 нм (базовая линия; ширина щели 1 нм, время усреднения сигнала 1 с, скорость изменения температуры 0.5°C/мин). Все образцы для термической денатурации растворяли в деионизированной воде Mili-Q и в 10-мМ какодильном буфере (CH₃)₂AsO₂Na pH 7.2, 0.1 М NaCl. Значения термодинамических параметров рассчитывали, обрабатывая данные об изменении оптической плотности при нагреве и охлаждении на длинах волн 260 и 270 нм путем подгонки теоретических кривых в рамках приближения модели двух состояний с помощью программы Simplex. Базу данных, характеризующую термостабильность ДНК-комплексов, формировали в MS Excel.

Спектрометрическое титрование

Спектрометрическое титрование проводили с использованием 16-звенных ОДН (табл. 1). Были приготовлены две серии образцов, которые содержали ОДН-2 (nFluS-ОДН) или ОДН-3 (nFluL-ОДН) в постоянной концентрации (5.4 мкМ) и комплементарную цепь (ОДН-4), концентрация которой варьировала от 1.25 до 5.4 мкМ, в 20 мМ Tris-HCl-буфере pH 8.0, содержащем 50 мМ NaCl. Контрольные образцы содержали только ОДН с модификацией. Образцы инкубировали в течение 5 мин при температуре 95°C в 1 × TE, затем охлаждали со скоростью 1°C/мин до комнатной температуры для формирования дуплекса. Спектры образцов были записаны с использованием спектрофлуориметра Clariostar plate reader (BMG Labtech, ФРГ) в UV-прозрачных планшетах Corning 3635.

Для полученных данных определяли стандартное отклонение по формуле:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (xi - \bar{x})^2}$$

где n – объем выборки; xi – i -й элемент выборки; \bar{x} – среднее арифметическое выборки. Планки погрешностей на всех рисунках представляют собой стандартные отклонения, полученные на основе не менее трех независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительная оценка эффективности удаления nFluL и nFluS из модельных ДНК в реакции специфической эксцизии

Влияние структурных различий nFluL и nFluS на эффективность их удаления из ДНК-субстратов

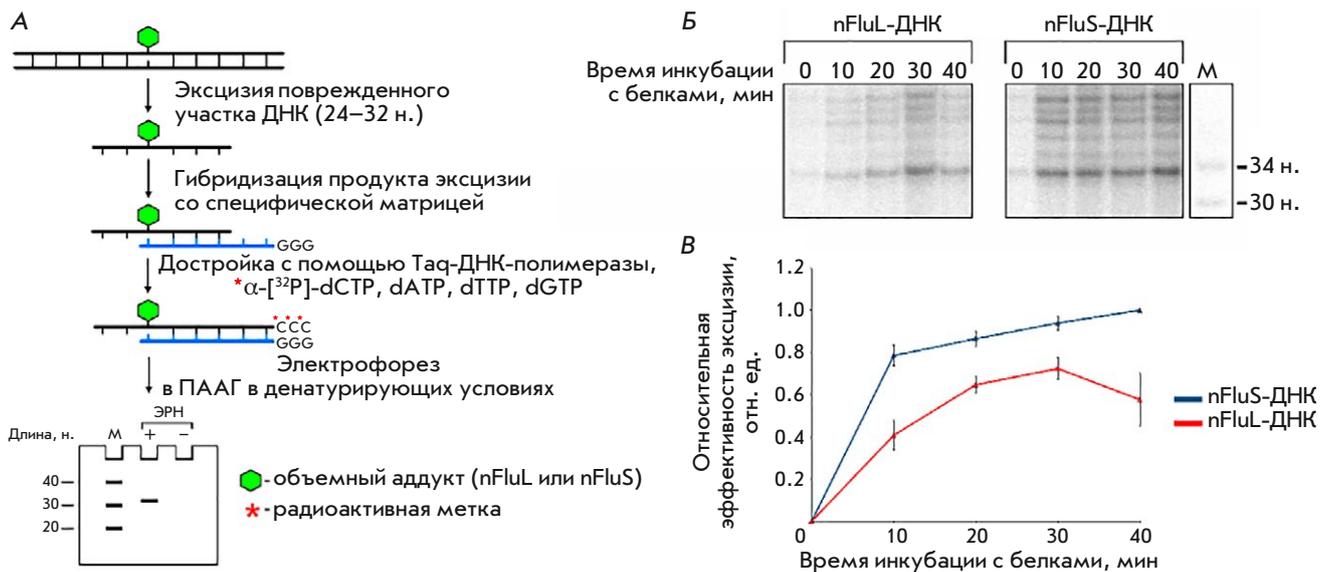


Рис. 2. Сравнительная оценка эффективности удаления nFluL или nFluS из модельных ДНК в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками экстракта клеток HeLa. А – схематическое представление процедуры оценки эксцизионной активности ЭРН *in vitro* методом концевого мечения продуктов специфической эксцизии (адаптировано из [14, 23]); Б – радиоавтограф геля после разделения продуктов реакции эксцизии; В – график зависимости относительной эффективности эксцизии поврежденного участка ДНК от времени инкубации с белками ЭРН. Значения для кривых рассчитывали с учетом интенсивности сигнала продуктов длиной 34 н.

оценивали с помощью метода концевого мечения продуктов специфической эксцизии (рис. 2А) [14]. В качестве субстратов эксцизионной репарации нуклеотидов использовали протяженные (137 п.н.) ДНК-дуплексы, содержащие во внутренней (68) позиции одной из цепей ненуклеотидное звено nFluL или nFluS. Модельные ДНК-субстраты инкубировали в течение 0–40 мин при 30°C с белками экстракта клеток HeLa. После остановки реакции продукты специфической эксцизии (фрагменты цепи ДНК длиной 24–32 нуклеотидов, содержащие повреждение) гибридизовали с присутствующей в реакционной смеси матрицей (табл. 1, ОДН-9), комплементарной содержащему повреждение участку цепи ДНК (рис. 2А). Далее проводили достройку продуктов специфической эксцизии, гибридизованных на матрице, с помощью Taq-ДНК-полимеразы, а также смеси dNTP и α - ^{32}P -dCTP, благодаря чему происходило ^{32}P -мечение продуктов специфической эксцизии. Длина продуктов эксцизии после достройки составила, в основном, 34 нуклеотида. Продукты эксцизии разделяли с помощью электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях (рис. 2Б). На основе данных об интенсивности полос, соответствующих 34 нуклеотидам, были построены графики зависимости относительной эффективности эксцизии от времени инкубации с белками экстракта (рис. 2В).

Как видно из представленных результатов, на всем временном промежутке удаление nFluS из модельной ДНК происходило в 1.5–2 раза более эффективно,

чем nFluL. Проведение последующих экспериментов позволило получить и сравнить данные об индуцированных этими объемными повреждениями изменениях геометрии дцДНК и ее стабильности – характеристик, от которых зависит эффективность удаления повреждений ДНК системой ЭРН.

Особенности геометрии модельных ДНК, содержащих объемную модификацию nFluL или nFluS

Перегиб сахарофосфатного остова в месте расположения объемного повреждения – одно из нарушений регулярной двухцепочечной структуры ДНК, распознаваемых на этапе первичного узнавания места повреждения. Величина перегиба зависит от типа повреждения и окружающей его последовательности [24]. Чем больше перегиб ДНК-дуплексов, который вызывает присутствие объемной модификации (т.е. чем больше значение угла изгиба отдалается от 180°), тем меньше их подвижность в геле при электрофорезе в неденатурирующих условиях. Это явление объясняется меньшей компактностью изогнутой структуры ДНК, затрудняющей ее прохождение через поры геля. Таким образом, особенности геометрии модельных 16-звенных ДНК-дуплексов, несущих модификацию nFluL или nFluS в одной из цепей, могут быть определены на основе данных об их подвижности в геле при электрофорезе в неденатурирующих условиях. Радиоавтограф геля, полученный в результате эксперимента, представлен на рис. 3.

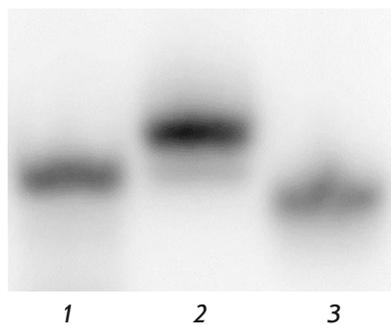


Рис. 3. Сравнение электрофоретической подвижности 16-звенных ДНК-дуплексов. Радиоавтограф геля после проведения электрофореза в неденатурирующих условиях. 1 – nFluS-дцДНК, 2 – nFluL-дцДНК, 3 – НМ-дцДНК

Согласно результатам обчислений по формуле (см. «Определение угла изгиба ДНК-дуплексов»), nFluL-содержащий ДНК-дуплекс изогнут сильнее – угол изгиба для него составляет $165.40 \pm 0.95^\circ$, что совпадает с данными, полученными ранее [17, 25], в то время как для nFluS-дцДНК угол изгиба составил $170.64 \pm 0.83^\circ$. Эти различия в перегибе сахарофосфатного остова двух эффективно процессуемых субстратов могут быть обусловлены различиями во взаимодействии флуоресцеинового фрагмента повреждений с азотистыми основаниями соседних нуклеотидных звеньев. Согласно результатам моделирования молекулярной динамики ДНК-дуплекс, содержащий nFluL, наряду с преимущественным нахождением флуоресцеинового фрагмента вне дуплекса, показал высокую подвижность в области введения повреждения; наблюдалась динамика возникновения/исчезновения изгиба в области повреждения на достаточно большой угол ($\sim 135^\circ$) [17]. Структура nFluS позволяет предполагать, что в этом случае Flu не склонен к выворачиванию, что может быть связано с преимущественным расположением флуоресцеинового фрагмента nFluS внутри дуплекса. Стоит также отметить, что, несмотря на меньшую степень изгиба nFluS-ДНК по сравнению с nFluL-ДНК, nFluS удалялся более эффективно белками экстракта клеток HeLa. Тем не менее эффективность репарации объемного аддукта не всегда коррелирует со степенью изгиба спирали ДНК, что показано нами ранее [11].

Сравнение термической стабильности дуплексов

Методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала определены термическая стабильность и термодинамические характеристики формирования ДНК-дуплексов длиной 16 п.н. Проведена регистрация зависимости величины оптической плотности растворов ДНК-дуплексов от температуры. Анализ кривых термической денатурации различных субстратов показал, что гипохромный эффект в случае дуплекса без модификации выражен более заметно, чем у дуплексов,

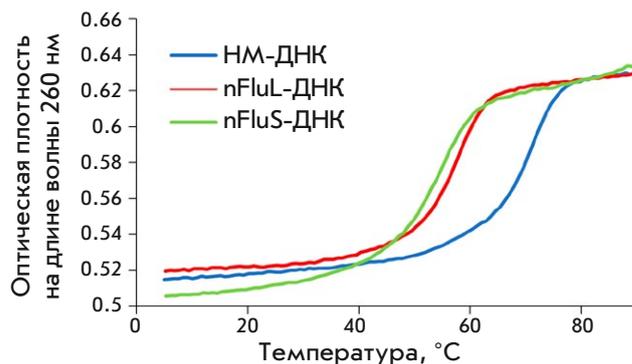


Рис. 4. График зависимости оптической плотности ДНК-дуплексов на длине волны 260 нм от температуры

содержащих ненуклеотидное звено. Согласно расчетам, гипохромный эффект НМ-ДНК составляет 14.75%, nFluL-ДНК 13.5%, nFluS-ДНК 14.3%. На нормированных графиках зависимости оптической плотности от температуры видны различия в термостабильности ДНК-дуплексов (рис. 4).

Наиболее стабильным оказался ДНК-дуплекс без модификации, T_m составила $67.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$; у nFluL-дуплекса T_m составила $55.6 \pm 0.3^\circ\text{C}$ и наименее термостабильным оказался nFluS-дуплекс ($T_m = 51.5 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Таким образом, присутствие повреждений nFluL и nFluS сильнее, чем присутствие другого ненуклеотидного повреждения – nAnt (T_m для nAnt-ДНК составляет $59.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$) [16], однако nFluS дестабилизирует двухцепочечную структуру дуплексов наиболее заметно. Ранее с использованием компьютерного моделирования мы показали, что флуоресцеиновые фрагменты синтетических азотистых оснований, связанные с сахарофосфатным остовом ДНК протяженными линкерами (Flu-dU и nFluL), взаимодействуют с азотистыми основаниями нуклеотидных звеньев соседних участков дцДНК, нарушая и дестабилизируя регулярную структуру этих участков. С использованием молекулярно-динамического моделирования показано, что флуоресцеиновый фрагмент nFlu способен выворачиваться из дуплекса и большую часть времени находится снаружи [17, 25].

Полученные нами данные дают основание полагать, что более существенное снижение термостабильности nFluS-содержащего дуплекса (по сравнению с nFluL-содержащим) может быть связано с преимущественным расположением флуоресцеинового фрагмента nFluS внутри существенно искажаемого его присутствием дуплекса и его взаимодействиями с азотистыми основаниями ближайших нуклеотидных звеньев [26]. С использованием минимизации суммы квадратов отклонений между экспериментальной и теоретической кривой термической денатурации проведен расчет термоди-

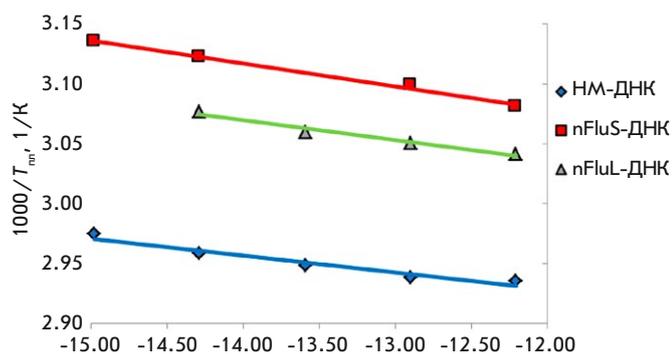


Рис. 5. График в линейных координатах Вант-Гоффа для немодифицированного ДНК-дуплекса и дуплексов, содержащих повреждение nFlu (nFluL) и (nFluS)

наимических параметров плавления. Значения ΔS° и ΔH° определяли путем линейризации выражения в координатах $1000/T_{пл}$ и $\ln(C_i/4)$ (координаты Вант-Гоффа) и построения линейной зависимости обратной величины температуры плавления от логарифма концентрации $\ln(C_i/4)$ методом наименьших квадратов. Графики, представленные на рис. 5, результаты расчетов термодинамических параметров в табл. 2 также говорят о повышенной способности nFluS к дестабилизации двухцепочечной структуры окружающей ДНК по сравнению с nFluL.

Спектрометрическое титрование

Метод спектрометрического титрования в сочетании с другими подходами позволяет на основе данных об изменениях спектральных характеристик, обусловленных формированием дуплекса, сделать вывод о наличии тех или иных взаимодействий. Наиболее заметные различия между двумя повреждениями, содержащими объемный карбоксифлуоресцеиновый фрагмент, выявлены при сравнительном изучении ДНК-дуплексов, содержащих объемные модификации nFluL и nFluS, с помощью спектрометрического титрования. Использование этого метода в сочетании с другими подходами позволяет на основе данных об изменениях спектральных характеристик при формировании дуплекса сделать выводы о взаимодействиях, в которые вовлекается (или не вовлекается) флуоресцентная группировка. Образцы содержали модифицированные цепи nFluS или nFluL

в постоянной концентрации 5.4 мкМ; концентрация комплементарной ДНК варьировала. Контрольные образцы в каждой серии содержали только модифицированную цепь. Измерения проводили после проведения гибридизации цепей. Спектры оптического поглощения представлены на рис. 6.

На длине волны 260 нм наблюдалось постепенное увеличение оптической плотности обеих серий образцов, происходящее в результате увеличения суммарной концентрации ДНК в смеси, в то время как на длине волны 495 нм (максимум поглощения флуоресцеина) характер изменения оптической плотности образцов, содержащих nFluS-ДНК и nFluL-ДНК, менялся по мере увеличения содержания в образцах комплементарной цепи, а следовательно, и двухцепочечных структур.

Сравнение оптического поглощения nFluS-ДНК и nFluL-ДНК, полученных при их титровании немодифицированной ДНК, показывает, что в области максимального поглощения нуклеотидов (260 нм) в обеих сериях ДНК наряду с ростом оптической плотности наблюдается одинаковый по величине гипохромный эффект, обусловленный формированием дуплексов (рис. 6). Характер изменений оптической плотности вблизи максимума поглощения флуоресцеина (495 нм) при этом отличается: в случае ДНК-дуплексов, содержащих nFluS, гипохромный эффект, проявляющийся при максимальной концентрации неповрежденной цепи, составляет 40%, в то время как у ДНК-дуплексов, содержащих nFluL, он не превышает 20% (рис. 6).

Ранее на примере спектров поглощения ДНК-дуплексов, которые содержали *цис*- и *транс*-B[α]P-N2-dG-повреждения, было показано, что образование дуплексов, в которых аддукт B[α]P формировал прочные интеркаляционные комплексы, сопровождается гипохромным эффектом, проявляющимся в области поглощения пиренильных колец B[α]P [27]. Таким образом, результаты спектрофотометрического титрования показывают, что, хотя присутствие повреждения с более протяженным спейсерным фрагментом приводит к локальной дестабилизации ДНК, достаточной для эффективного распознавания и удаления nFluL белками системы ЭРН, его флуоресцеинилкарбамоильный фрагмент

Таблица 2. Термодинамические данные и температура плавления ДНК-дуплексов

ДНК-дуплекс	ΔS° , ккал/моль \times К	ΔH° , ккал/моль	ΔG°_{37} , ккал/моль	T_m (20 мкМ), $^\circ\text{C}$
НМ-ДНК	-382 ± 167	-140.0 ± 56.7	-20.2 ± 4.8	$67.6 \pm 0.3^{**}$
nFluL-ДНК	-339 ± 187	-119.4 ± 61.2	-14.3 ± 3.2	$55.6 \pm 0.3^{**}$
nFluS-ДНК	-295 ± 104	-103.5 ± 33.5	-12.0 ± 1.2	$51.5 \pm 0.3^{**}$

**Стандартное отклонение для температуры взято исходя из погрешности измерительного прибора.

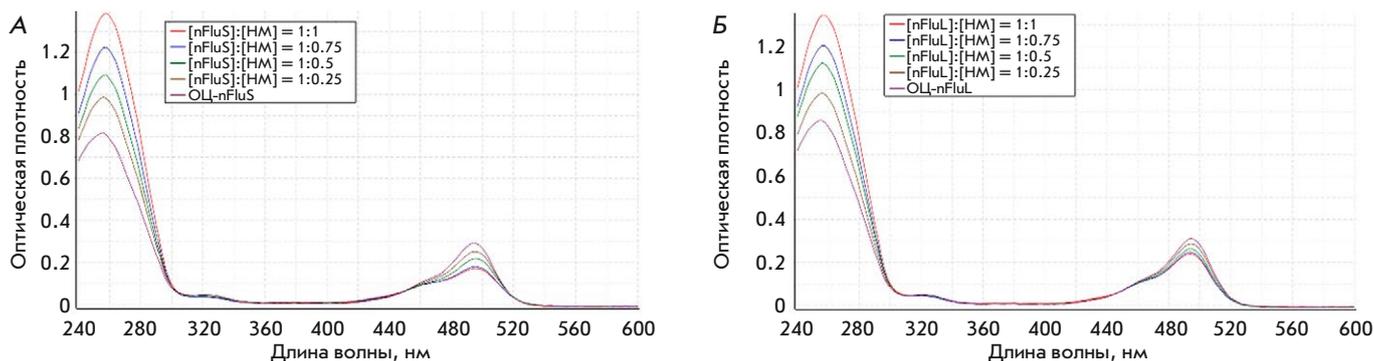


Рис. 6. Спектры оптического поглощения образцов, содержащих nFluS-ДНК (А) или nFluL-ДНК (Б) в постоянной концентрации 5.4 мкМ. Указаны соотношения концентраций в образцах, содержащих модифицированную (nFluS- или nFluL) и немодифицированную (НМ) цепи, формирующие дуплексы

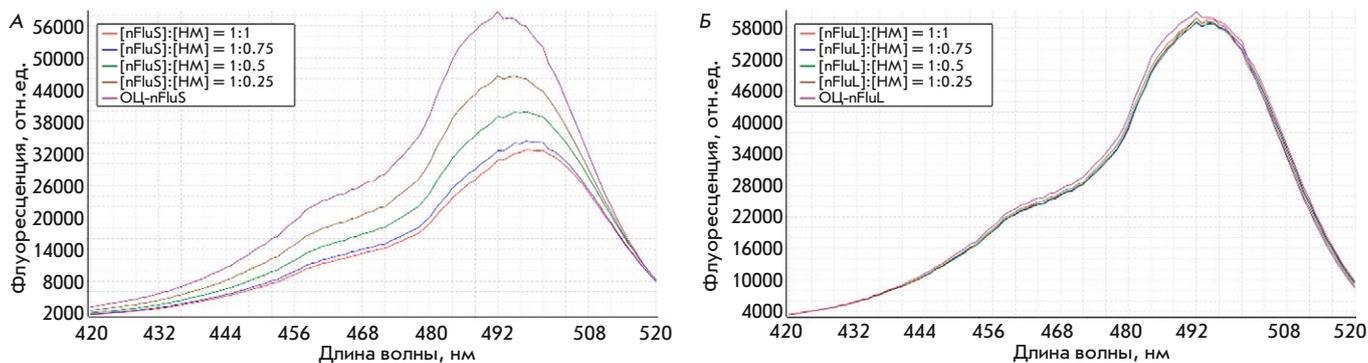


Рис. 7. Спектры возбуждения флуоресценции в диапазоне 420–520 нм в сериях образцов, содержащих nFluS-ДНК (А) или nFluL-ДНК (Б), в концентрации 5.4 мкМ и комплементарную цепь без модификаций (НМ)

не образует устойчивых сэндвич-структур либо других комплексов, формирование которых приводит к заметным изменениям в спектре, что коррелирует с данными недавно выполненного моделирования МД-траекторий nFluL-содержащих ДНК [17].

Наиболее наглядные результаты, позволяющие судить о причинах, лежащих в основе различий двух флуоресцеиновых повреждений, получены при сравнении спектров флуоресценции двух серий образцов, содержащих nFluS-ДНК либо nFluL-ДНК и немодифицированную цепь ДНК в таких же соотношениях, как и в экспериментах по анализу изменения оптических спектров. Полученные спектры возбуждения и испускания ДНК-дуплексов с повреждениями nFluS и nFluL представлены на рис. 7 и 8 соответственно. Спектры возбуждения флуоресценции записывали при фиксированной длине волны испускания 548 нм; длина волны возбуждения изменялась в диапазоне 420–520 нм с шагом 1 нм (рис. 7А,Б соответственно). Спектры испускания, представляющие собой зависимость интенсивности испускания света флуорофором (Flu) от длины волны возбуждающего света, снимали в диапазоне 500–600 нм с шагом измерения 1 нм при фиксированной длине волны возбуждающего света 533 нм (рис. 8А,Б).

Интенсивность флуоресценции образцов, содержащих nFluS-ДНК, заметно и последовательно уменьшается по мере увеличения концентрации комплементарной цепи, в то время как в случае образцов, содержащих nFluL-ДНК, в структуре которого есть протяженный линкер, интенсивность флуоресценции практически не изменяется (рис. 7А и 8А).

Таким образом, результаты спектрометрического титрования с большой уверенностью позволяют предполагать, что при образовании дуплекса флуоресцеинилкарбамоильный фрагмент повреждения nFluS располагается внутри дуплекса и способен взаимодействовать с гуанинами ближайших к повреждению звеньев ДНК аналогично тому, как это описано для некоторых вариантов расположения флуоресцеиновой модификации в дуплексе [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В соответствии с нашим предположением, nFluS (N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)]-3-амино-1,2-пропандиол) представляет собой аналог объемного повреждения, эффективность специфической эксцизии которого из модельной ДНК выше, чем у nFluL (N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)-гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиола). В результате

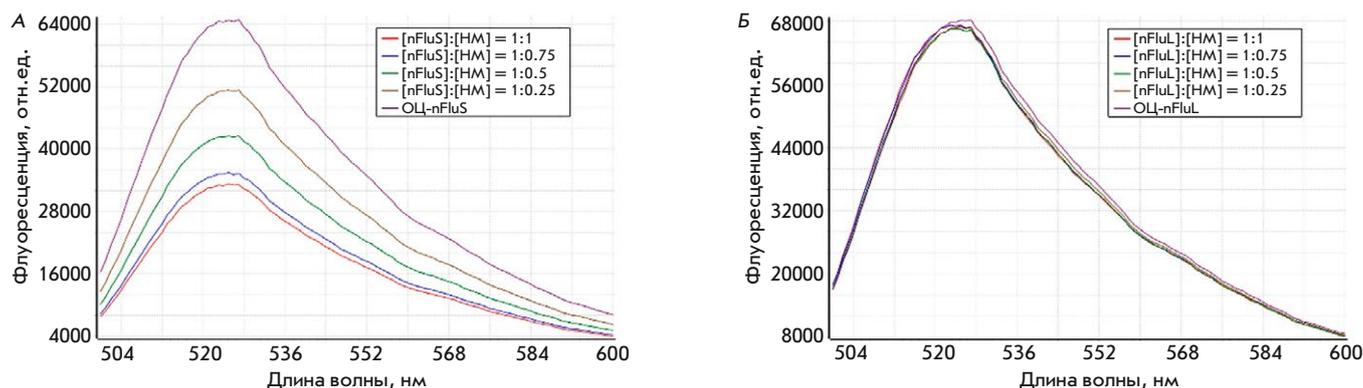


Рис. 8. Спектры испускания флуоресценции в серии образцов, содержащих nFluS (А) или nFluL (Б), в концентрации 5.4 мкМ и комплементарную цепь без модификаций (НМ)

сравнительного исследования особенностей геометрии, термодинамических характеристик, анализа спектров оптического поглощения, а также спектров флуоресценции модельных ДНК-дуплексов, содержащих nFluS или nFluL, показано, что увеличение эффективности специфической эксцизии nFluS по сравнению с nFluL ассоциировано с обусловленной взаимодействием флуоресцеинилкарбамоильного фрагмента с соседними азотистыми основаниями дцДНК дополнительной дестабилизацией двухцепочечной структуры ДНК. При этом расположение

дестабилизированного участка в nFluS-содержащих дцДНК, вероятно, способствует формированию продуктивных комплексов ХРС-ДНК, внося вклад в улучшение субстратных свойств nFluS-ДНК в реакции специфической эксцизии. Для подтверждения последнего предположения необходимо проведение экспериментов по молекулярному моделированию. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 19-74-10056П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schärer O.D. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 10. P. a012609.
- Sugasawa K. // Enzymes. 2019. V. 45. P. 99–138.
- Krasikova Y., Rechkunova N., Lavrik O. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 12. P. 6220.
- Shafirovich V., Kolbanovskiy M., Kropachev K., Liu Z., Cai Y., Terzidis M.A., Masi A., Chatgialiloglu C., Amin S., Dadali A., et al. // Biochemistry. 2019. V. 58. № 6. P. 561–574.
- Fu I., Mu H., Geacintov N.E., Broyde S. // Nucl. Acids Res. 2022. V. 50. № 12. P. 6837–6853.
- Fu I., Geacintov N.E., Broyde S. // Nucl. Acids Res. 2023. V. 51. № 22. P. 12261–12274.
- Kim J., Li C.L., Chen X., Cui Y., Golebiowski F.M., Wang H., Hanaoka F., Sugawara K., Yang W. // Nature. 2023. V. 617. № 7959. P. 170–175.
- Huang J.C., Sancar A. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19034–19040.
- Reardon J.T., Sancar A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 11. P. 4056–4061.
- Kropachev K., Kolbanovskii M., Cai Y., Rodríguez F., Kolbanovskii A., Liu Y., Zhang L., Amin S., Patel D., Broyde S., et al. // J. Mol. Biol. 2009. V. 386. № 5. P. 1193–1203.
- Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Сильников В.Н., Лаврик О.И. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 3. С. 386–400.
- Li C.L., Golebiowski F.M., Onishi Y., Samara N.L., Sugawara K., Yang W. // Mol. Cell. 2015. V. 59. № 6. P. 1025–1034.
- Gillet L.C., Alzeer J., Schärer O.D. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 6. P. 1961–1969.
- Evdokimov A., Petrusseva I., Tsidulko A., Koroleva L., Serpukrylova I., Silnikov V., Lavrik O. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 12. e123.
- Evdokimov A., Kutuzov M., Petrusseva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., Romanenko S., Perelman P., Prokopov D., et al. // Aging (Albany NY). 2018. V. 10. № 6. P. 1454–1473.
- Лукьянчикова Н.В., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Королева Л.С., Лаврик О.И. // Мол. биология. 2018. Т. 52. № 2. С. 277–288.
- Naumenko N.V., Petrusseva I.O., Lomzov A.A., Lavrik O.I. // DNA Repair (Amst.). 2021. V. 108. P. 1–11.
- Petruseva I., Naumenko N., Kuper J., Anarbaev R., Kappenberger J., Kisker C., Lavrik O. // Front. Cell Dev. Biol. 2021. V. 9. P. 617160.
- Sugasawa K., Akagi J., Nishi R., Iwai S., Hanaoka F. // Mol. Cell. 2009. V. 36. № 4. P. 642–653.
- 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.
- Liu Z., Ding S., Kropachev K., Jia L., Amin S., Broyde S., Geacintov N.E. // PLoS One. 2015. V. 10. № 9. P. e0137124.
- Reardon J.T., Sancar A. // Methods Enzymol. 2006. V. 408. P. 189–213.
- Попов А.А., Петрусева И.О., Науменко Н.В., Лаврик О.И. // Биохимия. 2023. Т. 88. № 11. С. 2235–2250.
- 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.
- 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.
- Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 9. P. 2089–2195.
- Huang W., Amin S., Geacintov N.E. // Chem. Res. Toxicol. 2002. V. 15. № 2. P. 118–126.

УДК 577.29, 632.4.01/.08

Изучение структуры компонентов системы поли(ADP-рибозил)ирования у грибов рода *Fusarium* и оценка динамики экспрессии ее ключевых генов

А. А. Стахеев*, Р. Р. Кутуков, М. Э. Тальянский, С. К. Завриев

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

*E-mail: stakheev.aa@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2024

Принята к печати 18.07.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27450

РЕФЕРАТ Одним из основных типов посттрансляционных модификаций является полиADP-рибозилирование, ключевую роль в котором играет поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP). Этот фермент широко представлен у эукариотических организмов, однако сведения как о структуре, так и о функциональном значении PARP у представителей царства Грибы (Fungi) на сегодняшний день крайне ограничены. В настоящей работе проведен биоинформатический поиск гомологов PARP и его антагониста – PARG – у четырех штаммов фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, структуры полных геномов которых аннотированы и депонированы в базах данных. Показано, что штаммы *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1 и *F. oxysporum* Fo47 содержат по одному гомологу PARP и PARG. В то же время штамм *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 содержит четыре дополнительных белка, имеющих в своем составе каталитические домены PARP, отличающиеся по своей структуре от остальных найденных гомологов. Проведено секвенирование частичных последовательностей нуклеотидов, кодирующих каталитический домен гомолога PARP и PARG, у 11 штаммов 9 видов *Fusarium*, представленных во всероссийских коллекциях, оценены филогенетические характеристики исследуемых генов. В опытах с токсигенным штаммом *F. graminearum* показано усиление экспрессии гена, кодирующего гомолог PARP, при росте культуры в условиях, стимулирующих продукцию микотоксина ДОН, а также активизацию экспрессии PARG на более поздних стадиях роста, что косвенно свидетельствует об участии системы поли(ADP-рибозил)ирования в регуляции экспрессии генов, ответственных за биосинтез ДОН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Fusarium*, парилирование, PARP, PARG, регуляция транскрипции, микотоксин, экспрессия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PARP – поли(ADP-рибоза)полимераза; PARG – поли(ADP-рибоза)гликогидролаза; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ДОН – дезоксиниваленол.

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания растений, вызываемые фитопатогенными грибами, представляют существенную проблему для сельского хозяйства и экономики во всех регионах мира [1, 2]. Представители некоторых таксономических групп царства Грибы (Fungi), в том числе рода *Fusarium*, не только способны заражать сельскохозяйственные культуры, но также являются продуцентами токсических вторичных метаболитов – микотоксинов [3], ингибирующих синтез белка, индуцирующих апоптотические процессы, а также оказывающих гепатотоксическое и имму-

носупрессивное действие на млекопитающих [4–7]. Способность к синтезу трихотеценовых микотоксинов является фактором агрессивности гриба по отношению к растению-хозяину: мутантные штаммы *F. graminearum*, не продуцирующие дезоксиниваленол (ДОН), могли заражать растение, однако распространения инфекции в другие его части не происходило [8].

Биосинтез основных групп микотоксинов организован сходным образом: ключевые гены, ответственные за различные его этапы, сгруппированы в кластеры, находящиеся под контролем

одного или нескольких регуляторных факторов [9, 10]. В свою очередь, «глобальные» факторы транскрипции являются медиаторами, регулирующими экспрессию специфических генов в зависимости от различных факторов внешней среды, таких, как температура, влажность, pH, доступность питательных веществ [11, 12]. В число ключевых регуляторных процессов входят модификации гистоновых белков, в том числе поли(ADP-рибозил)ирование, или парилирование.

Процесс парилирования представляет собой перенос нескольких остатков ADP-рибозы от молекулы кофактора NAD⁺ на целевую аминокислоту либо нуклеиновую кислоту, приводящий к изменению структуры, функций и стабильности молекулы-мишени [13, 14]. Ключевым ферментом, ответственным за осуществление реакции парилирования, является поли(ADP-рибоза)полимераза (PARP), относящаяся к семейству поли(ADP-рибозил)трансфераз [15]. По существующим на сегодняшний день представлениям, ферменты этого семейства обладают структурным и функциональным сходством с экзотоксинами патогенных бактерий, такими, как дифтерийный и холерный токсины [16, 17]. PARP является достаточно консервативным ферментом, он обнаружен у всех эукариот, кроме дрожжей. Наиболее хорошо охарактеризован на сегодняшний день PARP1 человека, представляющий собой белок массой 116 кДа, состоящий из трех основных доменов: N-концевого ДНК-связывающего домена, содержащего структуры типа «цинковые пальцы», центрального регуляторного (BRCT) домена, а также C-концевого каталитического домена – наиболее консервативного, обязательного для белков семейства поли(ADP-рибозил)трансфераз [18, 19]. Кроме того, в структуре гомологов PARP1 могут встречаться домен WGR (Trp-Gly-Arg), трансмембранные структуры, а также различные регуляторные последовательности [20]. Спектр процессов, в регуляции которых принимает участие PARP, достаточно широк: репарация ДНК, апоптоз, регуляция клеточного цикла, контроль транскрипции генов и др. [21–24]. На сегодняшний день известно, что некоторые эукариоты содержат несколько копий PARP: например, в клетках человека, помимо PARP1, найдены также белки-гомологи PARP2 и PARP3, по функциональной роли схожие с PARP1. В целом же геном человека содержит 17 генов, кодирующих белки PARP-семейства [15, 25]. Также необходимо отметить, что парилирование – это обратимая модификация: антагонистом PARP является поли(ADP-рибоза)гликогидролаза (PARG), ответственная за гидролиз связей рибоза–рибоза и расщепление полимерных цепей [26, 27]. В каноническом варианте (человек) PARG со-

стоит из C-концевого каталитического макродомена и N-концевой регуляторной части, хотя у других организмов структура может отличаться [28].

Необходимо отметить, что, несмотря на универсальность и высокую консервативность, сведения о функциях ферментов системы парилирования у представителей Грибы (Fungi), в том числе аскомицетов (*Ascomycota*), достаточно ограничены. Опубликован ряд работ, свидетельствующих об участии PARP в процессах апоптоза [29, 30], репликативного старения [31], а также формирования структур бесполого размножения [32]. При этом практически ничего не известно о возможной роли PARP в патогенезе и биосинтезе микотоксинов.

Цель настоящего исследования – выявление возможных гомологов PARP и PARG у представителей рода *Fusarium* путем биоинформатического поиска в общедоступных базах данных и секвенирование фрагментов генов *PARP* и *PARG* у штаммов 9 видов *Fusarium*, распространенных на территории России и сопредельных государств. Кроме того, проведено сравнение профилей экспрессии гомологов PARP и PARG у штамма *F. graminearum*, обладающего способностью к биосинтезу микотоксинов, при росте на различных средах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический анализ

Для поиска гомологов PARP и PARG выбраны четыре штамма грибов рода *Fusarium*, структуры полных геномов которых аннотированы и депонированы в онлайн-базах данных GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) и *Fusarium oxysporum* pangenome database (<http://www.fopgdb.site/>): *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1, *F. oxysporum* Fo47 и *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287. В качестве референсных использовали аминокислотные последовательности белков PARP1 и PARG человека, гомолога PARP гриба *Aspergillus nidulans* (PrpA), а также нуклеотидные последовательности соответствующих генов. Поиск гомологов проводили с использованием алгоритма BLAST [33]. Функциональные домены в составе выявленных последовательностей белков моделировали с использованием онлайн-сервиса InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Штаммы грибов

В работе использовали 11 штаммов 9 видов рода *Fusarium* из коллекций «ФИЦ питания и биотехнологии» (ФИЦПБ), Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВНИИЗР), Пущинского научного центра биологических ис-

следований (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ВКМ). Перечень штаммов с указанием их географического происхождения, видов растений-хозяев, годами сбора и принадлежности к той или иной коллекции приведен в *табл. 1*. Рост культур происходил в течение 7 суток при 25°C на картофельно-сахарозном агаре.

Выделение нуклеиновых кислот

ДНК выделяли по описанной ранее методике [34]. РНК выделяли из жидких культур гриба *F. graminearum* MFG 58918 с использованием набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия) по протоколу производителя. Концентрацию и качество нуклеиновых кислот оценивали с помощью спектрофотометра NanoVue (GE HealthCare, США), флуориметра Qubit (Thermo Scientific, США), а также электрофореза в 1% агарозном геле.

Дизайн праймеров, проведение ПЦР, секвенирование продуктов амплификации

Подбор праймеров для ПЦР и секвенирования проводили с использованием алгоритма ClustalW [35]. Физико-химические свойства праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.71.

Структуры праймеров и зондов, использованных для оценки относительной экспрессии референсного гена *TEF1α* и гена триходиенсинтазы *TRI5*, опубликованы ранее [36].

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия) с использованием следующих программ амплификации:

Программа 1 (праймеры PARPF-R): 93°C, 90 с (1 цикл); 93°C, 1 с; 55°C, 5 с; 72°C, 5 с (40 циклов).

Программа 2 (праймеры PARGF-R): 93°C, 90 с (1 цикл); 93°C, 10 с; 60°C, 15 с; 72°C, 10 с (40 циклов).

Количественную ПЦР для оценки относительного уровня представленности транскриптов проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология») с использованием Программы 2. Накопление транскриптов оценивали с помощью программного обеспечения QGene [37].

Продукты ПЦР клонировали с использованием набора реагентов Quick-TA kit («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Фрагменты ДНК секвенировали в ЗАО «Евроген» по методу Сэнгера с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1. с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Полученные последовательности нуклеотидов депонированы в базу данных GenBank NCBI (номера PQ040409-PQ040429).

Филогенетический анализ

Множественное выравнивание и филогенетический анализ аминокислотных и нуклеотидных последовательностей, а также оценку их филогенетических свойств проводили с использованием пакета программ MEGA7 [38]. Построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и моделей Джоунса–Тейлора–Торнтон (для аминокислот, [39]) и GTR+G (для нуклеотидов, [40]). Достоверность топологий построенных деревьев подтверждали бутстрепным анализом (1000 повторений).

Таблица 1. Штаммы грибов, использованные в ходе исследования

Штамм	Вид	Коллекция	Источник выделения	Географическое происхождение	Год
MFG 58918	<i>F. graminearum</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Краснодарский край	2016
ION-17-9/8	<i>F. graminearum</i>	ФИЦПБ	Зерно пшеницы	Московская область	2017
MFG 96801	<i>F. oxysporum</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Северная Осетия	2007
F-840	<i>F. oxysporum</i>	ВКМ	Неизвестно	Германия	Неизвестно
MFG 58242	<i>F. venenatum</i>	ВНИИЗР	Неизвестно	Германия	2008
ION-3/4	<i>F. coffeatum</i>	ФИЦПБ	Зерно пшеницы	Тульская область	2014
F-3495	<i>F. redolens</i>	ВКМ	Зерно ячменя	Московская область	Неизвестно
F-206	<i>F. verticillioides</i>	ВКМ	Растение табака	Краснодарский край	Неизвестно
F-446	<i>F. fujikuroi</i>	ВКМ	Зерно риса	Япония	Неизвестно
MFG 61701	<i>F. poae</i>	ВНИИЗР	Зерно пшеницы	Саратовская область	2010
F-3951	<i>F. solani</i>	ВКМ	Почва	Московская область	Неизвестно

Оценка накопления микотоксина ДОН, продуцируемого *F. graminearum* в жидкой культуре

Для оценки накопления микотоксина дезоксиниваленола (ДОН) штамм *F. graminearum* MFG 58918 культивировали в двух средах различного состава: картофельно-сахарозном бульоне и среде MYRO [41]. Для этого жидкие среды (10 мл) инокулировали 100 мкл суспензий конидий *F. graminearum* MFG 58918 и инкубировали в течение 7 суток при 25°C. Материал для анализа относительной экспрессии целевых генов отбирали каждые 24 ч со 2-х по 7-е сутки. Пробы для анализа уровня микотоксинов отбирали на 4-е и 6-е сутки культивирования.

Содержание микотоксина в средах анализировали иммунохимическим экспресс-методом с использованием тест-наборов DONSENSOR производства компании Unisensor (Бельгия) по протоколу производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Поиск гомологов PARP и PARG

Поиск, выполненный с использованием алгоритма BLASTp, показал, что геномы штаммов *F. graminearum* PH-1, *F. proliferatum* ET-1, *F. oxysporum* Fo47 и 4287 содержат по одной открытой рамке

считывания, продукты трансляции которых предположительно являются гомологами PARP1 человека и PrpA *A. nidulans*. Выявленные белки состоят из 747–752 аминокислотных остатков и содержат в своем составе четыре предсказанных домена: BRCT, WGR, регуляторный и каталитический. В отличие от PARP1 человека, у них отсутствует N-концевой домен, содержащий структурные мотивы типа «цинковые пальцы», а также субдомен pADR (рис. 1). В целом, структура выявленных гомологов соответствовала структуре охарактеризованного ранее PrpA *A. nidulans* [32]. Анализ сходства аминокислотных последовательностей показал, что наиболее консервативной частью всех проанализированных белков является каталитический домен: так, идентичность последовательностей каталитического домена PARP1 человека и его гомолога у *F. graminearum* PH-1 составила 43.9%, а идентичность последовательностей четырех проанализированных штаммов *Fusarium* – 85.1%. При этом, сравнение полных последовательностей PARP показало идентичность 24.5% у человека и *F. graminearum*, 76.6% между штаммами *Fusarium*. Также в структурах гомологов выявлен аминокислотный мотив гистидин-тирозин-глутаминовая кислота (H-Y-E, рис. 2), ключевой, согласно существующим представлениям, для осуществления каталитической функции PARP.

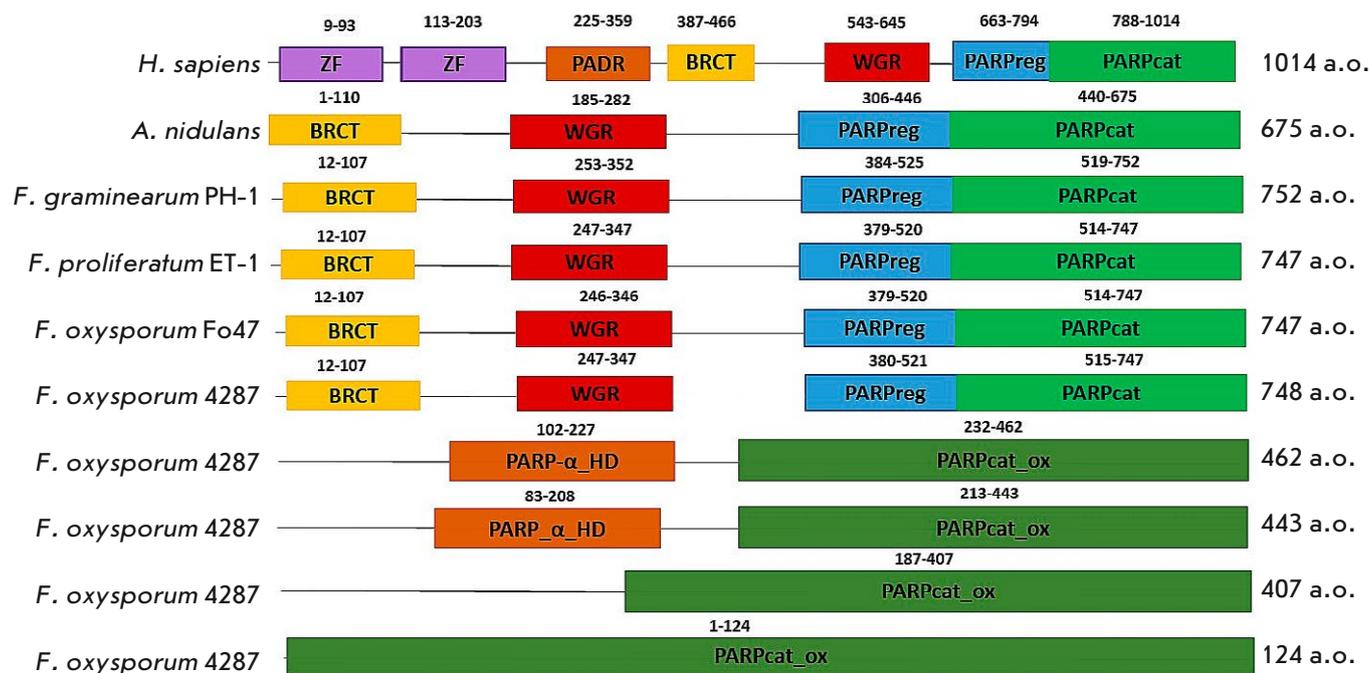


Рис. 1. Схематическое расположение основных функциональных доменов в PARP1 человека, PrpA *A. nidulans*, а также гомологов PARP четырех штаммов рода *Fusarium*. Над каждым из доменов указаны номера аминокислотных остатков в последовательности белка. ZF – структуры типа «цинковые пальцы»

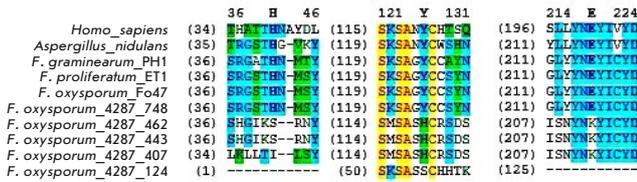
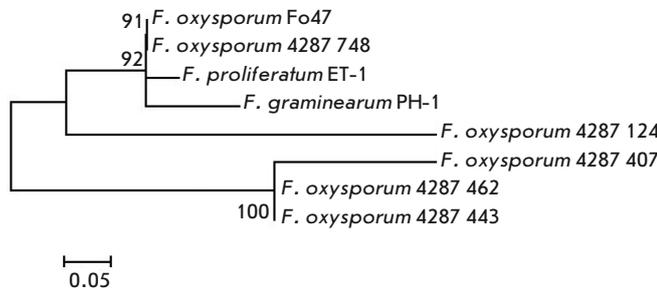


Рис. 2. Фрагменты выравнивания аминокислотных последовательностей PARP1 человека, PrpA *A. nidulans*, а также белков-гомологов PARP четырех штаммов *Fusarium*, содержащие аминокислотные остатки, составляющие мотив Н-У-Е. Ключевые аминокислоты выделены жирным шрифтом

менов которых содержатся альфа-спиральные (PARP αHD) субдомены. Еще один предсказанный гомолог длиной 407 а.о. (FoxPARP407, XP_018251711) содержал только каталитический домен без αHD-субдомена. Четвертый гомолог представлял собой короткий белок длиной 124 а.о. (FoxPARP124, XP_018251751), вся структура которого охарактеризована как каталитический домен. Интересно отметить, что гены, кодирующие четыре «дополнительных» PARP, расположены на разных хромосомах (FoxPARP462, FoxPARP407 и FoxPARP124 на хромосоме 3, FoxPARP443 – на хромосоме 6; при этом ген, кодирующий «основной» PARP, расположен на хромосоме 4). Структуры этих гомологов существенно отличались как друг от друга, так и от «основных» гомологов PARP *F. oxysporum* и других видов. Идентичность структур каталитических доменов FoxPARP443 и FoxPARP407 составила 67%, FoxPARP443 и FoxPARP124 – 52,8%, FoxPARP443 и «основного» PARP *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* – 57,2%, FoxPARP443 и PARP1 человека – 31,2%. Эти результаты подтверждаются данными филогенетического анализа аминокислотных последовательностей каталитических доменов (рис. 3). На дендрограмме видны два кластера, поддержанные значениями бутстрепа 92 и 100%: в первый входят «основные» домены четырех анализируемых штаммов, во второй – каталитические домены белков FoxPARP462, FoxPARP443 и FoxPARP407. Домен белка FoxPARP124 формировал отдельную ветвь, занимающую промежуточное положение между двумя кластерами. Также в структуре каталитических доменов «дополнительных» PARP не выявлено ни каталитического мотива Н-У-Е, ни другого распространенного в семействе поли(ADP-рибозил)-трансфераз мотива аргинин-серин-глутаминовая кислота (R-S-E).

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей каталитических доменов белков-гомологов PARP, выявленных в геномах четырех штаммов *Fusarium* с помощью метода максимального правдоподобия. Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей



Поиск гомологов PARP проводили с использованием PARG человека в качестве референса. В каждом из исследованных геномов выявлено по одной открытой рамке считывания. Транслируемые белки состояли из 443–476 а.о. и обладали общей структурой, включающей N-концевой α-спиральный и C-концевой каталитический домены. Во всех структурах выявленных гомологов идентифицирован мотив глутамин-глутаминовая кислота-глутаминовая кислота-изолейцин (Q-E-E-I), считающийся необходимым для функциональной активности фермента (рис. 4). При этом анализ сходства аминокислотных последовательностей показал, что PARG является менее консервативным белком, чем PARP: идентичность PARG четырех анализируемых *Fusarium* составила 60,5%, а между гомологами PARG *Fusarium* и человека – лишь 17,6%.

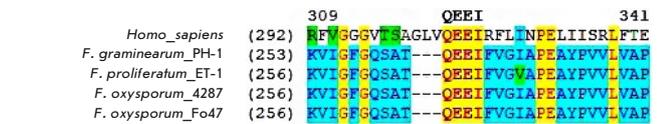


Рис. 4. Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей PARG человека и белков-гомологов PARG четырех штаммов *Fusarium*, содержащий аминокислотные остатки, составляющие мотив Q-E-E-I (выделен жирным шрифтом)

Кроме того, поиск гомологов PARP при использовании в качестве запроса исключительно последовательностей аминокислот каталитических доменов PARP1 и PrpA позволил обнаружить в геноме штамма *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287 еще четыре открытых рамки считывания, продукты трансляции которых содержат каталитические домены PARP (рис. 1). Два из них представляют собой белки длиной 443 (FoxPARP443, номер депонирования GenBank XP_018253699) и 462 а.о. (FoxPARP462, XP_018251710), на N-конце каталитических до-

Дизайн праймеров, секвенирование и филогенетический анализ фрагментов генов, кодирующих гомологи PARP и PARG

На основании выравнивания последовательностей нуклеотидов генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, обнаруженные по результатам биоинформатического анализа, сконструированы универсальные праймеры для секвенирования их фрагментов. В качестве мишеней выбрали последовательность, кодирующую каталитический домен PARP и фрагмент гена PARG, кодирующий С-конец α -спирального и N-конец каталитического доменов, а также соединяющий их участок. Структуры разработанных праймеров были следующими: PARP – прямой праймер PARPF 5'-ATCCTCTYGATCGHCARTT-3', обратный праймер PARPR 5'-GHAGSAGRTAVCGBAGCTTG-3'; PARG – прямой праймер PARGF 5'-GGYAAAATHCCATTYTGGCC-3', обратный праймер PARGR 5'-AGACVACGACDGCNCCTCCTT-3'. Показано, что пара праймеров PARPF-R амплифицировала фрагменты ДНК всех 11 штаммов, выбранных для исследования (табл. 1), а пара праймеров PARGF-R – все, за исключением ДНК штамма *F. solani* F-3951. Размеры амплифицированных фрагментов составили 611 п.н. для PARP и 596–611 п.н. для PARG. Исследование филогенетических характеристик секвенированных фрагментов подтвердило тезис о том, что PARG менее консервативен, чем PARP: фрагмент гена, кодирующего гомолог PARP, содержал 58.7% консервативных, 41.3% переменных и 25.8% филогенетически информативных позиций, в то время как фрагмент гена, кодирующего гомолог PARG – 42.8% консервативных, 57.1% переменных и 42.4% филогенетически информативных позиций. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа фрагментов гена, кодирующего гомолог PARP (рис. 5А), содержало два основных кластера, в один из которых вошли виды, обладающие способностью к синтезу трихотеценовых токсинов (*F. graminearum*, *F. poae*, *F. venenatum*, *F. coffeatum*; бутстреп-поддержка 69%), а в другой – виды, продуцирующие другие группы токсинов (*F. fujikuroi*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. redolens*, бутстреп-поддержка 96%). Штамм *F. solani* F-3951 образовывал отдельную ветвь; при этом необходимо отметить, что вся группа штаммов *Fusarium* формировала единый большой кластер с бутстреп-поддержкой 100%. Схожая картина наблюдалась и при анализе филогенетического дерева, построенного на основе сравнения фрагментов гена, кодирующего гомолог PARG (рис. 5Б), с той разницей, что бутстреп-поддержка для кластеров, содержащих трихотеценпродуцирующие и непродуцирующие виды была выше (94 и 99% соответствен-

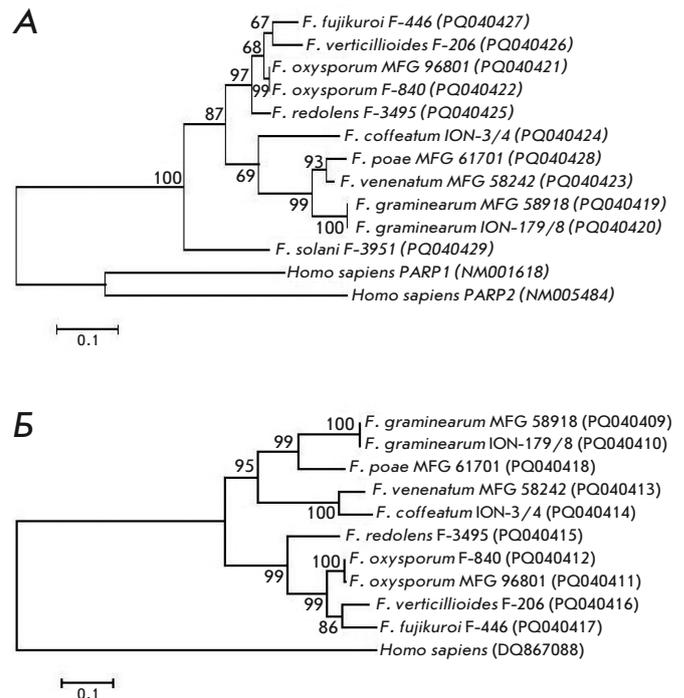


Рис. 5. Филогенетические деревья, построенные на основе сравнительного анализа последовательностей нуклеотидов PARP (А) и PARG (Б) 11 штаммов *Fusarium* из всероссийских коллекций с помощью метода максимального правдоподобия. Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В скобках приведен номер депонирования каждого исследованного штамма в базе данных GenBank

но). Кроме того, наблюдались отличия в топологии, выражающиеся в том, что *F. venenatum* вместе с *F. coffeatum* формировали отдельный подкластер с бутстреп-поддержкой 100%.

Анализ накопления микотоксина ДОН и динамики экспрессии генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, при росте гриба на различных средах

Для сравнения уровней токсинообразования штамм *F. graminearum* MFG 58918 культивировали на картофельно-сахарозном бульоне (КСБ), считающемся благоприятным для роста биомассы гриба, и среде MYRO, стимулирующей биосинтез микотоксинов (в данном случае ДОН). Анализ накопления ДОН показал, что на 4 сутки в среде MYRO его концентрация составляла 30.6 мг/л среды, а на 6 сутки – 39.9 мг/л среды. При этом в культурах, выращиваемых на КСБ, ДОН не был детектирован ни в одной из временных точек. Помимо генов, кодирующих гомологи PARP (*Fg*PARP) и PARG

(*FgPARG*), в исследование динамики относительной экспрессии также был включен ген *TRI5*, кодирующий триходииенсинтазу – ключевой фермент биосинтеза токсинов трихотеценовой группы. В результате показали, что при росте на среде MYRO относительная экспрессия как *TRI5*, так и *FgPARP* превышала контроль (КСБ) в каждой временной точке. Относительная экспрессия гена *FgPARG* была максимальной на 3 сутки роста (в 5.4 раза выше, чем в контроле, *рис. 6A*), а гена *TRI5* – на 4 сутки (в 8.6 раза выше, чем в контроле, *рис. 6B*). В то же время на 6–7 сутки уровни относительной экспрессии обоих генов снижались. Относительная экспрессия гена *FgPARG* на 2–5 сутки роста на среде MYRO практически не отличалась от показателей контрольной культуры, однако усиливалась на 6–7 сутки (в 2.3 и 3.2 раза соответственно выше, чем в контроле, *рис. 6B*).

ОБСУЖДЕНИЕ

PARP – фермент, принимающий участие во многих важных клеточных процессах и обнаруженный у организмов, относящихся к разным таксономическим группам. Важность изучения PARP и системы парилирования в целом определяется возможным практическим значением, в том числе использованием этого фермента в качестве мишени для лекарственных средств и препаратов для борьбы с патогенами, в том числе возбудителями болезней растений [42–46]. Однако информация о структуре и функциях компонентов системы парилирования у грибов на сегодняшний день крайне ограничена. Опубликованы данные о том, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* гомологи PARP отсутствуют [47]. С другой стороны, токсигенный гриб *A. nidulans* содержит гомолог PARP1 человека (PrpA), принимающий участие в процессах репарации ДНК и бесполого развития [32]. Показано, что гомолог PARP *F. pseudograminearum* является одним из участников процесса апоптоза [30], а обработка *F. oxysporum* ингибитором биосинтеза NAD⁺, основного субстрата PARP, снижает рост и патогенность гриба [48]. При этом одним из наиболее интересных вопросов является возможное участие PARP и его гомологов в регуляции биосинтеза микотоксинов, в том числе фузариотоксинов. На сегодняшний день модификации гистонов и изменение структуры хроматина рассматривают как одни из основных факторов, влияющих на активность генов и биосинтетических кластеров в целом [49, 50], однако роль парилирования в этих процессах у грибов не установлена.

В настоящей работе проведен поиск гомологов PARP и ее антагониста PARG с использованием баз

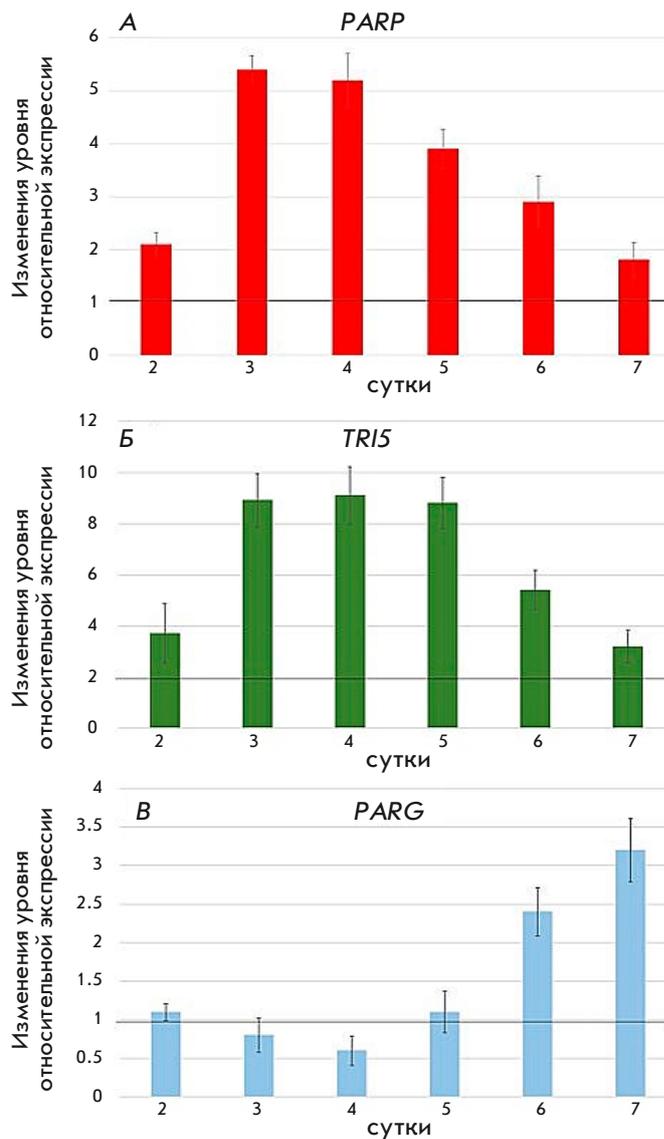


Рис. 6. Оценка уровней относительной экспрессии генов *FgPARP* (A), *TRI5* (Б) и *FgPARG* (B) с 2 по 7 сутки культивирования на среде MYRO в сравнении с контролем (КСБ, принят за 1)

данных, содержащих структуры полных геномов грибов рода *Fusarium* с предсказанными продуктами трансляции. В каждом из четырех исследованных геномов обнаружены гомологи PARP1 и PrpA длиной порядка 750 а.о., обладающие универсальной структурой: домены BRCT и WGR на N-конце, регуляторный и каталитический домены на С-конце. В отличие от PARP1 человека, у ферментов грибов отсутствовал N-концевой регуляторный домен, содержащий мотивы типа «цинковые пальцы», отвечающие за поиск и узнавание поврежденных ДНК и связывание с ними PARP, что может свидетель-

ствовать об их большем родстве с PARP2 человека, у которого также отсутствуют эти структуры [15], чем с PARP1. В связи с этим открытым остается вопрос, каким образом PARP грибов связываются с ДНК и осуществляют репарацию. Возможными вариантами, альтернативными «цинковым пальцам», могут быть участие в процессе связывания домена WGR [20] либо использование белка-посредника. Одним из наиболее интересных результатов проведенного исследования стало выявление у штамма *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, помимо «основного» гомолога PARP, также четырех белков, содержащих каталитический домен, однако не имеющих доменов WGR и BRCT. Дополнительный поиск в базе данных с использованием алгоритма BLASTp показал, что белки, содержащие каталитический домен и по структуре похожие на «дополнительные» PARP, обнаруженные у штамма 4287, представлены и у других штаммов *Fusarium*, прежде всего у *F. oxysporum*. Этот вид крайне пластичен, в его геноме помимо основных (коровых) хромосом могут присутствовать также дополнительные хромосомы, часто несущие в своем составе гены, связанные с патогенностью и специфичностью по отношению к конкретным растениям-хозяевам [51, 52]. Вероятно, грибы приобрели «дополнительные» белки, содержащие каталитические домены PARP, независимо от «основных» посредством горизонтального переноса генов, о чем может косвенно свидетельствовать наличие похожих белков у некоторых растений, таких, как люцерна или пшеница. Однако «дополнительные» PARP не могут полностью дублировать функции «основных», что обуславливается отсутствием некоторых функционально значимых доменов в их структуре. Это, впрочем, не говорит о функциональной неполноценности этих белков, поскольку эффект, приводящий к изменению структуры хроматина и перестройкам нуклеосом, может быть не связан с ферментативной активностью PARP [53].

Функциональная активность выявленных гомологов PARP1 косвенно подтверждена с помощью поиска аминокислотных мотивов, считающихся ключевыми с точки зрения каталитического действия ферментов. Этот результат важен с эволюционной точки зрения: по имеющимся на сегодняшний день представлениям, предшественниками ферментов системы парилирования у эукариот являются бактериальные экзотоксины, такие, как дифтерийный и холерный токсины. Они обладают способностью присоединять остатки моноADP-рибозы (моно(ADP-рибозил)ирование, или марилирование) к белкам организма-хозяина, тем самым оказывая негативное воздействие на физиологические и биохимические процессы [17, 42]. Ключевым каталитическим

мотивом дифтерийного токсина является H-Y-E, холерного – R-S-E. Соответственно, семейства эукариотических поли(ADP-рибозил)трансфераз, произошедших от этих двух токсинов, отличаются по наличию одного из этих мотивов [54]. В настоящей работе показано, что каталитические центры гомологов PARP грибов рода *Fusarium* содержат каталитический мотив H-Y-E и, таким образом, могут быть отнесены к семейству ферментов, произошедших от дифтерийного токсина. При этом, «дополнительные» PARP штамма 4287 не содержали ни одного из этих каталитических мотивов, что также свидетельствует о независимом характере их происхождения. Также у исследованных штаммов *Fusarium* нами выявлено по одному гомологу PARG классической структуры, содержащему ключевой каталитический мотив Q-E-E-I.

Другой задачей исследования было расширение информации о структуре и полиморфизме генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, у грибов рода *Fusarium*. На сегодняшний день в базах данных содержатся лишь единичные записи нуклеотидных последовательностей, охарактеризованных как гены, кодирующие компоненты системы парилирования. Разработаны универсальные праймеры, проведено секвенирование и филогенетический анализ фрагментов соответствующих генов в штаммах девяти видов рода *Fusarium*, содержащихся во всероссийских коллекциях. Показано, что фрагмент, кодирующий каталитический домен гомолога PARP, более консервативен, чем фрагмент гена, кодирующий гомолог PARG. Интересно, что топология филогенетических деревьев, построенных на основе сравнения структур этих двух генов, также несколько отличалась. По результатам анализа гомологов PARG виды *F. coffeatum* и *F. venenatum* формировали отдельный подкластер, поддержанный значением бутстрепа 100%. Этот результат выглядит необычно, поскольку, несмотря на сходство токсинных профилей (способность к синтезу трихотеценовых токсинов А типа), эти два вида относятся к разным комплексам видов (*F. coffeatum* – к *Fusarium incarnatum-euseti* species complex, а *F. venenatum* – к *F. sambucinum* species complex). При этом топология филогенетического дерева, построенного на основании сравнения последовательностей нуклеотидов фрагмента гена, кодирующего гомолог PARP, имела более классический вид: *F. venenatum* формировал подкластер с близкородственным *F. roae*, а *F. coffeatum* – отдельную ветвь.

В рамках проведенного исследования впервые оценена динамика экспрессии генов, кодирующих гомологи PARP и PARG, у токсигенного *F. graminearum* в условиях, благоприятствующих синте-

зу токсинов, и на среде, где токсин не образовывался. Показано, что усиление уровня относительной экспрессии *FgPARP* коррелировало с накоплением токсина и усилением экспрессии *TRI5* – ключевого гена биосинтетического каскада. На более поздних этапах культивирования (6–7 сутки) наблюдалось повышение уровня экспрессии гена *FgPARG*, что, вероятно, связано с процессом депарилирования и снижения биосинтеза токсина. При этом необходимо отметить, что эти результаты лишь косвенно свидетельствуют о связи активности генов, кодирующих белки системы парилирования, с биосинтезом токсина. Для получения более достоверных данных, доказывающих эти факты, необходимы дальнейшие исследования, включающие получение мутантных штаммов и/или подавление экспрессии целевых генов с помощью других подходов, не подразумеваю-

щих генетическую трансформацию, таких, как РНК-интерференция.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования нами существенно расширен и систематизирован объем информации, касающейся наличия компонентов системы парилирования у фитопатогенных грибов рода *Fusarium*, а также структуры, полиморфизма и активности соответствующих генов. Полученные результаты являются основой для дальнейшего изучения роли, которую играет парилирование в жизнедеятельности грибов, а также возможной разработки новых подходов в борьбе с этими патогенами. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00049).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Almeida F., Rodriguez M.L., Coelho C. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 214.
- Fones H.N., Bebbler D.P., Chaloner T.M., Kay W.T., Steinberg G., Gurr S.J. // *Nat. Food.* 2020. V. 1. № 6. P. 332–342.
- Latham R.L., Boyle J.T., Barbano A., Loveman W.G., Brown N.A. // *Essays Biochem.* 2023. V. 67. № 5. P. 797–809.
- Woloshuk C.P., Shim W.-B. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2013. V. 37. № 1. P. 94–109.
- Escrivá L., Font G., Manyes L. // *Food Chem. Toxicol.* 2015. V. 78. P. 185–206.
- Kamle M., Mahato D.K., Gupta A., Pandhi S., Sharma B., Dhawan K., Vasundhara Mishra S., Kumar M., Tripathi A.D., et al. // *Microbiol. Res.* 2022. V. 13. № 2. P. 292–314.
- Jansen C., von Wettstein D., Schafer W., Kogel K.H., Felk A., Maier F.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 46. P. 16892–16897.
- Maier F.J., Miedaner T., Haderl B., Felk A., Salomon S., Lemmens M., Kassner H., Schäfer W. // *Mol. Plant. Pathol.* 2006. V. 7. № 6. P. 449–461.
- Alexander N.J., Proctor R.H., McCormick S.P. // *Toxin Rev.* 2009. V. 28. P. 198–215.
- Wang W., Liang X., Li Y., Wang P., Keller N.P. // *J. Fungi.* 2023. V. 9. № 1. P. 21.
- Keller N. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 3. P. 167–180.
- Gallo A., Perrone G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 15. P. 7878.
- Bellocchi D., Costantino G., Pellicciari R., Re N., Marrone A., Coletti C. // *ChemMedChem.* 2006. V. 1. № 5. P. 533–539.
- Gibson B.A., Kraus W.L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. № 7. P. 411–424.
- Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. // *BioEssays.* 2004. V. 26. № 8. P. 882–893.
- Alemasova E.E., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 8. P. 3811–3827.
- Mikolčević P., Hloušek-Kasun A., Ahel I., Mikoč A. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021. V. 19. P. 2366–2383.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. // *Genes Dev.* 2005. V. 19. P. 1951–1967.
- Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 20. P. 9941–9946.
- Suskiewicz M.J., Munnur D., Strömmland Ø., Yang J.-C., Easton L.E., Chartin C., Zhu K., Baretic D., Goffinont S., Schuller M., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2023. V. 51. № 15. P. 8217–8236.
- Caldecott K.W. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. № 8. P. 619–631.
- Chaudhuri A.R., Nussenzweig A. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017. V. 18. № 10. P. 610–621.
- Spechenkova N., Kalinina N.O., Zavriev S.K., Love A.J., Taliatsky M. // *Viruses.* 2023. V. 15. № 1. P. 241.
- Matveeva E., Maiorano J., Zhang Q., Eteleeb A.M., Convertini P., Chen J., Infantino V., Stamm S., Wang J., Rouchka E.C., et al. // *Cell Discov.* 2016. V. 2. P. 15046.
- Sousa F.G., Matuo R., Soares D.G., Escargueil A.E., Henriques J.A.P., Larsen A.K., Saffi J. // *Carcinogenesis.* 2012. V. 33. № 8. P. 1433–1440.
- Slade D., Dunstan M.S., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., Ahel I. // *Nature.* 2012. V. 477. № 7366. P. 616–620.
- Kamaletdinova T., Fanaei-Kahrani Z., Wang Z.-Q. // *Cells.* 2019. V. 8. № 12. P. 1625.
- Dunstan M.S., Barkauskaite E., Lafite P., Knezevic C.E., Brassington A., Ahel M., Hergenrother P.J., Leys D., Ahel I. // *Nat. Commun.* 2012. V. 6. № 3. P. 878.
- Sharon A., Finkelstein A., Shlezinger N., Hatam I. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2009. V. 33. № 5. P. 833–854.
- Chen L., Ma Y., Peng M., Chen W., Xia H., Zhao J., Zhang Y., Fan Z., Xing X., Li H. // *mSphere.* 2021. V. 6. № 1. P. e01140–20.
- Kothe G.O., Kitamura M., Masutani M., Selker E.U., Inoue H. // *Fungal Genet. Biol.* 2010. V. 47. № 4. P. 297–309.
- Semighini C.P., Savoldi M., Goldman G.H., Harris S.D. // *Genetics.* 2006. V. 173. № 1. P. 87–98.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
- Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 225. P. 27–37.

35. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
36. Stakheev A.A., Erokhin D.V., Meleshchuk E.A., Mikityuk O.D., Statsyuk N.V. // *Microorganisms*. 2022. V. 10. № 7. P. 1347.
37. Simon P. // *Bioinformatics*. 2003. V. 19. № 11. P. 1439–1440.
38. Kumar S., Stecher G., Tamura K. // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
39. Jones D.T., Taylor W.R., Thornton J.M. // *Comput. Appl. Biosci.* 1992. V. 8. № 3. P. 275–282.
40. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford Univ. Press, 2000. 352 p.
41. Farber J.M., Sanders G.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. V. 51. № 2. P. 381–384.
42. Holbourn K.P., Shone C.C., Acharya K.R. // *FEBS J.* 2006. V. 273. № 20. P. 4579–4593.
43. Della Corte L., Foreste V., Di Filippo C., Giampaolino P., Bifulco G. // *Expert. Opin. Investig. Drugs*. 2021. V. 30. № 5. P. 543–554.
44. Keller K.M., Koetsier J., Schild L., Amo-Addae V., Eising S., van den Handel K., Ober K., Koopmans B., Essing A., van den Boogaard M.L., et al. // *BMC Cancer*. 2023. V. 23. № 1. P. 310.
45. Rissel D., Peiter E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 7. P. 1638.
46. Feng B., Liu C., Shan L., He P. // *PLoS Pathog.* V. 12. № 12. P. e1005941.
47. Citarelli M., Teotia S., Lamb R.S. // *BMC Evol. Biol.* 2010. V. 13. № 10. P. 308.
48. Anand G., Waiger D., Vital N., Maman J., Ma L.J., Covo S. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 329.
49. Soukup A.A., Chiang Y.-M., Bok J.W., Reyes-Dominguez Y., Oakley B.R., Wang C.C.C., Strauss J., Kellep N.P. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. № 2. P. 314–330.
50. Reyes-Dominguez Y., Boedi S., Sulyok M., Wiesenberger G., Stoppacher N., Krska R., Strauss J. // *Fungal Genet. Biol.* 2012. V. 49. № 1. P. 39–47.
51. Delulio G.A., Guo L., Zhang Y., Goldberg J.M., Kistler H.C., Ma L.-J. // *mSphere*. 2018. V. 3. № 3. P. e00231–18.
52. Yang H., Yu H., Ma L.-J. // *Phytopathology*. 2020. V. 110. № 9. P. 1488–1496.
53. Малюченко Н.В., Котова Е.Ю., Кирпичников М.П., Студитский В.М., Феофанов А.В. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16: Биология*. 2019. Т. 74. № 3. С. 200–206.
54. Cohen M.S., Chang P. // *Nat. Chem. Biol.* 2018. V. 14. № 3. P. 236–243.

УДК 577.24

Особенности фосфорилирования бета-амилоида при болезни Альцгеймера

П. А. Стрельникова^{1,2#}, А. Е. Бугрова^{1,2#}, Н. В. Захарова^{1,2}, К. В. Даничкина¹,
М. И. Индейкина^{1,2}, М. С. Гавриш³, В. Г. Круть⁴, А. А. Бабаев³, А. Ю. Морозова^{5,6},
А. С. Кононихин^{1,7*}, В. А. Митькевич^{8*}, А. А. Макаров⁸, Е. Н. Николаев¹

¹Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, 119334 Россия

³Научно-исследовательский институт нейронаук, Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

⁵Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, 119034 Россия

⁶Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, 117152 Россия

⁷Институт энергетических проблем химической физики имени В.Л. Тальрозе Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семёнова РАН, Москва, 119334 Россия

⁸Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

Равный вклад.

*E-mail: a.kononikhin@skoltech.ru; mitkevich@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2024

Принята к печати 16.08.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27456

РЕФЕРАТ Характерным признаком прогрессии болезни Альцгеймера (БА) является накопление нейротоксичных агрегатов бета-амилоидных пептидов (Аβ). Посттрансляционные модификации (ПТМ) способствуют агрегации и увеличению цитотоксичности Аβ, при этом содержание специфических протеоформ Аβ повышено в сенильных бляшках пациентов с БА. Патологические механизмы формирования агрегатов и роль протеоформ Аβ требуют детального изучения как для понимания роли конкретных процессов в инициации дегенерации нейронов, так и для поиска эффективных превентивных методов терапевтического воздействия. В представленной работе изучена динамика накопления фосфорилированной по серину-8 протеоформы Аβ (pSer8-Аβ) у мышей линии 5xFAD, использованных в качестве модели амилоидогенеза. Также изучены образцы Аβ из спинномозговой жидкости (СМЖ) и головного мозга человека. Методом Вестерн-блоттинга с использованием антител 1E4E11 и 4G8 показали, что накопление pSer8-Аβ в мозге мышей 5xFAD начинается уже в 3-месячном возрасте и достигает максимума к 14–17 месяцам, что в целом сходно с динамикой накопления общего пула пептидов Аβ. Содержание pSer8-Аβ в СМЖ человека при БА может составлять порядка 1–10% от всего количества Аβ. Масс-спектрометрический анализ показал возможность фосфорилирования Аβ в тканях мозга по остаткам Ser8, Tyr10 и Ser26, а также фосфорилирования APP по остатку Thr719. Полученные результаты подкрепляют предположение о вовлеченности фосфопротеоформ Аβ в развитие амилоидоза при БА.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бета-амилоид, масс-спектрометрия, болезнь Альцгеймера, фосфорилирование.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; Аβ – бета-амилоидные пептиды; Аβ_{1–42} – пептид из 42 аминокислотных остатков; ПТМ – посттрансляционные модификации; pSer8-Аβ – фосфорилированная по серину-8 протеоформа Аβ; СМЖ – спинномозговая жидкость; APP – белок-предшественник амилоида; ТФЭ – твердофазная экстракция; МК – муравьиная кислота; ИП – иммунопреципитация; ПСА – персульфат аммония; БСА – бычий сывороточный альбумин; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; PASEF – параллельное накопление и последовательная фрагментация.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) составляет 60–80% всех случаев деменции, а риск ее развития особенно высок у людей пожилого возраста [1]. Количество пациентов с БА существенно увеличивается с каждым годом и может достичь 115 млн к 2050 г. [2]. Патогенез БА тесно связан с гомеостазом бета-амилоидных пептидов (A β) в мозге [3], именно амилоидные отложения являются общепризнанными маркерами БА. Несмотря на более чем 30-летнюю историю исследований [4, 5], выяснение детальных аспектов молекулярных механизмов амилоидоза не теряет своей актуальности, поскольку влияние на амилоидоз представляется наиболее очевидной стратегией в поиске эффективных средств терапевтического воздействия при БА [6–8].

Полноразмерные формы A β -пептидов (A β_{1-40} и A β_{1-42}) имеют важные физиологические функции, которые могут отличаться в разных тканях организма, где эти пептиды образуются из различных изоформ белка-предшественника амилоида (APP) при участии β - и γ -секретаз [9, 10]. Эти пептиды играют важную роль в регуляции ангио- и нейrogenеза, а также снижают проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и способствуют посттравматическому восстановлению мозга [11]. Важной особенностью A β -пептидов является их способность к агрегации с образованием кросс- β -структур [12]. Дисбаланс между образованием полноразмерных форм A β и их своевременной деградацией может способствовать образованию модифицированных протеоформ, формирующих нейротоксичные олигомеры и агрегаты [3, 13]. В частности, задержка деградации полноразмерных A β -пептидов ведет к накоплению усеченных протеоформ [14–17] и появлению посттрансляционных модификаций (ПТМ), которые стабилизируют агрегаты A β и способствуют их дальнейшему росту. Примечательно, что подавляющее большинство описанных модификаций сосредоточено в цинксвязывающем домене и относится к шести полярным аминокислотным остаткам в N-концевом участке 1–11 [17], а присутствие в амилоидных бляшках мозга характерных укороченных с N-конца пептидов согласуется с повышенной скоростью модификации этого участка [15].

В целом, руго-Glu3, руго-Glu11, isoAsp1 и isoAsp7 являются наиболее распространенными ПТМ A β -пептидов [14, 18–23], которые могут способствовать их повышенной агрегации и стабилизации сенильных бляшек при БА. В частности, оценка динамики накопления разных ПТМ в амилоидных отложениях в мозге мышей линии 5xFAD, моделирующих БА, показала, что накопление руго-Glu3-A β у этих мышей начинается с самого раннего возраста и к 8

месяцам уже выходит на плато, тогда как изомеризация Asp7 в 7-месячном возрасте составляет лишь 8% и достигает своего максимума (~30%) к концу жизненного цикла, но так и не выходит на насыщение [24].

Фосфорилирование Ser8 – это еще одна ПТМ N-концевого участка A β , которая может играть важную роль в патогенезе БА. В частности, образование pSer8-A β , происходящее при участии протеинкиназ во внеклеточном пространстве и на поверхности клеток мозга [25], коррелирует с проявлением симптомов БА и затрудняет деградацию A β при участии инсулиндеградирующих и ангиотензинпревращающих ферментов [26]. Иммуногистохимический анализ образцов неокортекса позволил выявить взаимосвязь между фосфорилированием A β по Ser8 и его агрегацией в диспергируемые олигомеры, протофибриллы и фибриллы при симптоматической БА, но не на доклинической стадии [27]. При использовании синтетических полноразмерных пептидов pSer8-A β_{1-42} наблюдали стремительное образование стабильных фибриллярных агрегатов и нейротоксичных олигомеров в отсутствие ионов цинка [28, 29]. Кроме того, обнаружена возможность образования агрегатов с повышенной нейротоксичностью в результате взаимодействия pSer8-A β_{1-42} с немодифицированными A β_{1-42} [30]. Структурный ЯМР-анализ дополнительно выявил более высокую эффективность амилоидной амплификации и повышенную термодинамическую стабильность фибрилл pSer8-A β_{1-40} в сравнении с фибриллами нефосфорилированного пептида [31]. С другой стороны, как полноразмерный pSer8-A β_{1-42} , так и его цинксвязывающий фрагмент pSer8-A β_{1-16} существенно снижают *in vitro* агрегацию A β , индуцированную ионами цинка [32–34], а инъекции pSer8-A β_{1-42} уменьшают образование амилоидных бляшек в гиппокампе мышей [34]. По всей видимости, возможна реализация обоих сценариев, когда pSer8-A β провоцирует образование фибрилл или, наоборот, препятствует металлзависимой агрегации. Реализация каждого сценария зависит от внешних факторов – наличия и концентрации ионов цинка, белков-партнеров A β и др. В связи с этим исследование динамики накопления pSer8-A β может способствовать прояснению его роли в формировании амилоидных отложений.

Оптимизация подходов, в том числе масс-спектрометрических (МС), к анализу фосфорилированных форм амилоида остается актуальной задачей [17, 35, 36]. В состав A β входят три потенциальных сайта фосфорилирования (Ser8, Ser26 и Tyr10), а также потенциальные сайты в смежных с A β областях APP. На сегодняшний день получены

данные о присутствии *in vivo* фосфорформ Аβ с модифицированными Ser8 и Ser26 [17, 24]. Дальнейшие МС-исследования этих форм могут привести к получению важной информации о роли путей фосфорилирования в амилоидозе, а также к пониманию роли фосфорилирования в патогенезе БА. В представленной работе методами масс-спектрометрии и Вестерн-блотинга исследованы особенности фосфорилирования Аβ по Ser8 (pSer8-Аβ) на модельных мышцах 5xFAD, а также у пациента с БА.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и Аβ-пептиды

Все химические вещества и растворители, использованные в данном исследовании, были класса ВЭЖХ. Синтетические пептиды Аβ (Аβ₁₋₁₆, pSer8-Аβ₁₋₁₆, Аβ₁₋₄₂ и pSer8-Аβ₁₋₄₂), полученные методом твердофазного синтеза и очищенные до чистоты более 99.5% с использованием ВЭЖХ (BioPeptide Inc., США), были растворены в 10% ацетонитриле до концентрации 0.5 мг/мл, поделены на аликвоты по 50 мкл и хранились при -80°C. В качестве стандартов и контрольных образцов («спайков») использовали синтетические пептиды в известной концентрации. Для контрольных образцов в качестве матрицы использовали плазму крови человека, разведенную фосфатно-солевым буфером (рН 7.4) в соотношении 1 : 50.

Мыши 5xFAD

В работе использовали линию трансгенных мышей 5xFAD (лаборатория Jackson, США, инвентарный номер 006554) [37]. Мыши этой линии имеют пять тяжелых, связанных с БА, наследственных мутаций в генах белка-предшественника амилоида (APP) человека (SweK670N, M671L, LonV717I и FloI716V) и пресенилина 1 (PSEN1) (M146L и L286V), экспрессируемых под контролем промотора Thy1 мыши. Эти мыши экспрессируют трансгенный Аβ человека на значительно более высоком уровне, чем нативный мышинный Аβ, что приводит к ускоренному ухудшению когнитивных функций мозга. Первые поведенческие нарушения проявляются в возрасте ~6 месяцев и становятся наиболее выраженными к 9 месяцам [38].

Образцы мозга мышей были предоставлены Центром генетических коллекций лабораторных животных (Институт биологии и биомедицины ННГУ им. Н.И. Лобачевского). Когорта состояла из 6 особей в возрасте 3, 8, 12, 14, 17 и 23 месяцев. Животных содержали в колонии при свободном доступе к пище и воде в помещении с контролируемой температурой +20 ± 2°C и влажностью 40–60%

при 12-часовом цикле света/темноты. Эксперименты на мышцах проводили в соответствии с методиками, утвержденными местным этическим комитетом и органами контроля за животными (Методические рекомендации по размещению и уходу за животными. Окружающая среда, содержание и управление, 2016).

Все мыши 5xFAD были генотипированы для подтверждения наличия всех мутаций. Для этого ДНК выделяли из части хвоста, помещали в 300 мкл лизирующего буфера (10 mM Трис-НСl, рН 8.0, 100 mM NaCl) с протеиназой К, инкубировали с ротацией 650 об/мин 16–20 ч при +55°C, перемешивали и центрифугировали при комнатной температуре (5 мин, 14000 об/мин). Верхнюю фракцию, содержащую ДНК, дополнительно промывали 1 раз изопропанолом и дважды 80% этанолом с последующим центрифугированием при +4°C (15 мин, 14000 об/мин). Наличие генов *PSEN1* и *APP* человека проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфичных к вставкам праймеров 5'-AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA-3' и 5'-GCC AT G AGG GCACT AAT CAT-3' для *PSEN1* и 5'-AGG ACT GAC CACT CG ACC AG-3' и 5'-CGG GGG T CT AGT T CT GCA T-3' для *APP* [39]. Контрольными праймерами были 5'-CT A GGC CAC AGA AT T GAA AGA T CT-3' и 5'-GT A GGT GGA AAT T CT AGC ATC C-3'.

Образцы СМЖ и мозга человека

Образец ткани мозга человека получен от 82-летнего пациента со спорадической формой БА во время аутопсии (post-mortem interval (PMI) – 15 ч). Образцы височной доли и гиппокампа были заморожены в жидком азоте для дальнейшего МС-анализа, а также зафиксированы в 10% забуференном формалине («БиоВитрум», Россия) для гистологического анализа. Для верификации диагноза были изготовлены гистологические срезы ткани головного мозга толщиной 4–5 мкм и окрашены Конго красным («БиоВитрум», Россия). Для иммуногистохимического (ИГХ) окрашивания использовали антитела к тау-белку и Аβ.

Образец СМЖ получен путем диагностической люмбальной пункции стерильной иглой от мужчины 79 лет с установленным диагнозом болезнь Альцгеймера. Объем спинномозговой жидкости составлял 1 мл. В течение 1 ч с момента забора образец центрифугировали (1500 об/мин, 15 мин), далее проводили отбор супернатанта. Образцы хранили при температуре -80°C.

Все процедуры, связанные с получением биологического материала человека, проводили в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации

и после получения одобрения комиссии по этике (Протокол № 1 от 25 января 2022 года Этического комитета ПКБ № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ). Было получено письменное информированное согласие от пациентов.

Экстракция Аβ-пептидов из тканей мозга

Для выделения Аβ-пептидов образцы мозга гомогенизировали на льду с использованием стеклянного гомогенизатора Поттера с добавлением 4 объемов лизирующего буфера (20 мМ Трис, 2.5 мМ EDTA, 137 мМ NaCl, pH 7.6), содержащего смесь ингибиторов протеаз (Roche, Франция). После добавления муравьиной кислоты (МК) до 70% (по объему) образцы обрабатывали ультразвуком (10 мин × 2), встряхивали и центрифугировали (30000 g, 1 ч, +4°C). МК из супернатанта выпаривали с помощью вакуумного концентратора (Eppendorf, Германия). Полученные кислые экстракты хранили при температуре –80°C. Далее Аβ выделяли твердофазной экстракцией (ТФЭ), используя картриджи Oasis MCX (Waters, США), согласно протоколу производителя [40] со следующими модификациями. Кислые экстракты растворяли в смеси 8 М/2 М мочевины/тиомочевина и добавляли до 2% H₃PO₄. Картриджи для ТФЭ предварительно кондиционировали 1 мл метанола и уравнивали 1 мл 4% H₃PO₄. Образец (2 мл) загружали в картридж ТФЭ и промывали 2 мл 4% H₃PO₄ и 10% ацетонитрила (ACN). Фракцию, обогащенную Аβ, элюировали 1 мл раствора ACN/H₂O/NH₄OH 75 : 15 : 10 (по объему), образцы упаривали до 100 мкл, используя вакуумный концентратор (Eppendorf, Германия).

Выделение Аβ-пептидов из СМЖ человека

Аβ-пептиды из СМЖ и контрольных образцов («спайков») выделяли методом иммунопреципитации (ИП) с использованием высокоспецифичных к pSer8-Аβ моноклональных антител 1E4E11 (Merck KGaA, Германия), а также антител 6E10 и 1E8 (на три порядка более чувствительных к немодифицированному Аβ) и 4G8 (с одинаковой специфичностью к обеим формам Аβ). ИП проводили в течение 3 ч при +4°C с антителами, иммобилизованными на магнитные частицы Dynabeads (Thermo Scientific) в присутствии ингибиторов протеаз. Аβ элюировали с использованием 70% ACN с добавлением 10 мМ HCl либо двукратного денатурирующего буфера для образцов для последующего электрофореза пептидов и Вестерн-блоттинга.

Пептидный электрофорез и Вестерн-блоттинг

Полученные после ТФЭ образцы, обогащенные фракцией Аβ, смешивали в соотношении 1 : 1

с 2× буфером для образцов для пептидного электрофореза (100 мМ Трис-HCl pH 8.8, 1% SDS, 4% бета-меркаптоэтанол, 24% глицерин, 0.02% Кумасси бриллиантовый синий) и денатурировали в течение 5 мин при ~ +90°C [41]. Пептидный электрофорез проводили в ячейках Mini-PROTEAN (Bio-Rad, США) с использованием Трис-трициновой буферной системы (25 мМ Трис, 25 мМ Трицин, 0.05% SDS) в 12% полиакриламидном геле. На 10 мл разделяющего геля добавляли 4 мл 30% раствора акриламида/бисакриламида (AA/БА, 29/1), 5 мл 2.5 М Трис-HCl pH 8.8, 6 мкл TEMED и 100 мкл 10% персульфата аммония (ПСА). Для приготовления 5 мл 4% концентрирующего геля добавляли 0.66 мл AA/БА, 0.76 мл 2.5 М Трис-HCl pH 8.8, 5 мкл TEMED и 150 мкл ПСА. Электрофорез проводили в течение 1.5–2 ч при 60 мА с хорошим охлаждением, до начала выхода фронта краски из геля. Проводили полусухой перенос на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.2 мкм в течение 1 ч при 50 мА с использованием буфера, содержащего 47.9 мМ Трис, 38.6 мМ глицин, 0.0385% SDS и 20% метанол.

Для Вестерн-блоттинга мембрану блокировали в течение 30 мин в 2.5% растворе молока в 0.01 М PBS и 0.1% Tween-20 с добавлением 10 мг/мл БСА и инкубировали с первичными антителами в течение ночи. Для детекции pSer8-Аβ использовали высокоспецифичные к этой ПТМ антитела 1E4E11 (1 : 4000, Merck KGaA, Германия). Немодифицированные Аβ выявляли с помощью антител 6E10 (1 : 8000, эпитоп 3–8, Biologend, США), а также антитела 4G8 (1 : 4000, эпитоп 18–23, Biologend, США), способные детектировать как мономерные, так и олигомерные формы [42]. Инкубацию со вторичными антителами (1 : 5000, IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена, Nuts) проводили в течение 1 ч. Результаты визуализировали с применением усиленной хемилюминесценции (enhanced chemiluminescence, ECL) с реактивами SuperSignal (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения получали с использованием гель-документирующей системы SYNGENE G:Box (Syngene, Великобритания). Изображения обрабатывали с использованием программы GeneTools.

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС)

Все образцы для проведения ВЭЖХ-МС-анализа гидролизировали протеазой Lys-C (Promega, США) с получением гидрофильных фрагментов Аβ₁₋₁₆. Образцы после ТФЭ (20 мкл) смешивали (1 : 1) со 100 мМ бикарбоната аммония и 0.4 мкг Lys-C, затем инкубировали при 37°C в течение 4 ч.

Нецелевой ВЭЖХ-МС-анализ образцов-гидролизатов (Lys-C) проводили на ВЭЖХ-системе Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), соединенной с времяпролетным масс-спектрометром высокого разрешения TIMS TOF Pro (Bruker Daltonics, США), с использованием метода сбора данных с помощью параллельного накопления и последовательной фрагментации (PASEF) в режиме DDA. Настройки источника электроспрея (ESI) были следующими: напряжение на капилляре – 4500 В, потенциал смещения торцевой пластины – 500 В, расход сухого газа – 3.0 л/мин при температуре 180°C. Измерения проводили в диапазоне масса/заряд (m/z) от 100 до 1700. Диапазон подвижности ионов включал значения от 0.60 до 1.60 В·с/см² ($1/k_0$, где k_0 – подвижность ионов). Общее время цикла установлено равным 1.16 с, а количество сканирований PASEF MS/MS – 10. Для малых количеств образцов общее время цикла установлено равным 1.88 с.

Для ВЭЖХ загруженный объем образца составлял 1 мкл на инъекцию. ВЭЖХ проводили с использованием колонки-эмиттера Ion Optics (C18, 25 см × 75 мкм, 1.6 мкм; Parkville, Австралия) методом градиентного элюирования. Подвижная фаза А содержала 0.1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В содержала 0.1% МК в ацетонитриле. Разделение проводили при расходе 400 нл/мин с использованием 40-минутного градиента от 4 до 90% фазы В.

Данные нетаргетного ВЭЖХ-МС анализировали с использованием программы PEAKS Studio 8.5 (параметры: погрешность измерения массы родительского иона – 20 мд; погрешность массы фрагмента – 0.03 Да). Окисление метионина установлено как возможная переменная модификация. Поиск проводили с использованием базы данных Swissprot белков человека. Пороговые значения FDR для всех этапов установлены на уровне 1% или ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика накопления pSer8-Aβ в мозге мышей 5xFAD

Формирование фибриллярных Aβ-структур можно обнаружить уже в мозге 2-месячных мышей линии 5xFAD [37]. Динамика накопления некоторых протеоформ Aβ, исследованных ранее, показала, что в целом накопление протеоформ Aβ коррелирует с образованием амилоидных отложений [24]. Нами проведена серия экспериментов для оценки динамики накопления pSer8-Aβ методом Вестерн-блотинга.

Предварительно приблизительно оценили долю фосфорилированных Aβ у мыши среднего возраста

(12 месяцев). С этой целью сравнивали содержание пептидов в одинаковых навесках ткани одного и того же животного с линейкой соответствующих синтетических стандартов Aβ₁₋₄₂ и pSer8-Aβ₁₋₄₂ (рис. 1А). Для идентификации немодифицированных Aβ использовали антитела 6E10, выявляющие преимущественно мономерные пептиды (эпитоп 3–8); для идентификации pSer8 использовали высокоспецифичные антитела 1E4E11. Полученные результаты указывают на то, что суммарное количество мономерных немодифицированных по Ser8 форм Aβ к 12 месяцам может достигать 2 нг на 1 мг ткани мозга, а доля мономерных pSer8-Aβ может быть в 10–100 раз меньше. Необходимо отметить, что Вестерн-блотинг все-таки не относится к количественным методам и позволяет проводить лишь приблизительные относительные количественные оценки. Кроме того, как общее количество Aβ, так и количество его модифицированных форм может варьироваться у разных животных [24].

Динамику накопления общего и модифицированного Aβ определяли с использованием экстрактов, полученных из препаратов мозга 3-, 8-, 14-, 17- и 23-месячных мышей (рис. 1Б–Г). Для минимизации технических ошибок и с учетом того, что предварительный эксперимент подтвердил возможность присутствия pSer8-Aβ в значительно меньших количествах по отношению к немодифицированным Aβ, одну и ту же мембрану последовательно проявляли сначала антителами к pSer8-Aβ (1E4E11) и лишь затем антителами 4G8, которые, в отличие от 6E10, совсем не конкурируют за эпитоп с 1E4E11 и проявляют все формы Aβ, не имеющие модификаций в участке 18–23 (в том числе и pSer8-Aβ), включая их олигомеры [42]. Визуальная оценка результатов Вестерн-блотинга (рис. 1Б) позволяет заключить, что пептиды pSer8-Aβ выявляются уже в 3-месячном возрасте и в мономерной форме могут достигать максимума к 14 месяцам. Результаты дополнительной оценки интенсивности полос на полученных изображениях (рис. 1В) указывают на схожесть динамики накопления pSer8-Aβ и общего пула мономерных и димерных форм Aβ, что может косвенно указывать на взаимосвязь фосфорилирования Ser8 и стимуляции олигомеризации. Тем не менее полученный результат не позволяет сделать прямых выводов о возможном присутствии pSer8-Aβ в олигомерных формах: аналогично антителам 6E10, перекрывающиеся с ними по эпитопу в N-конце антитела 1E4E11, также могут плохо идентифицировать димерные и олигомерные формы из-за сниженной доступности специфичного участка.

Дополнительный анализ распределения интенсивности окрашивания полос в каждом из об-

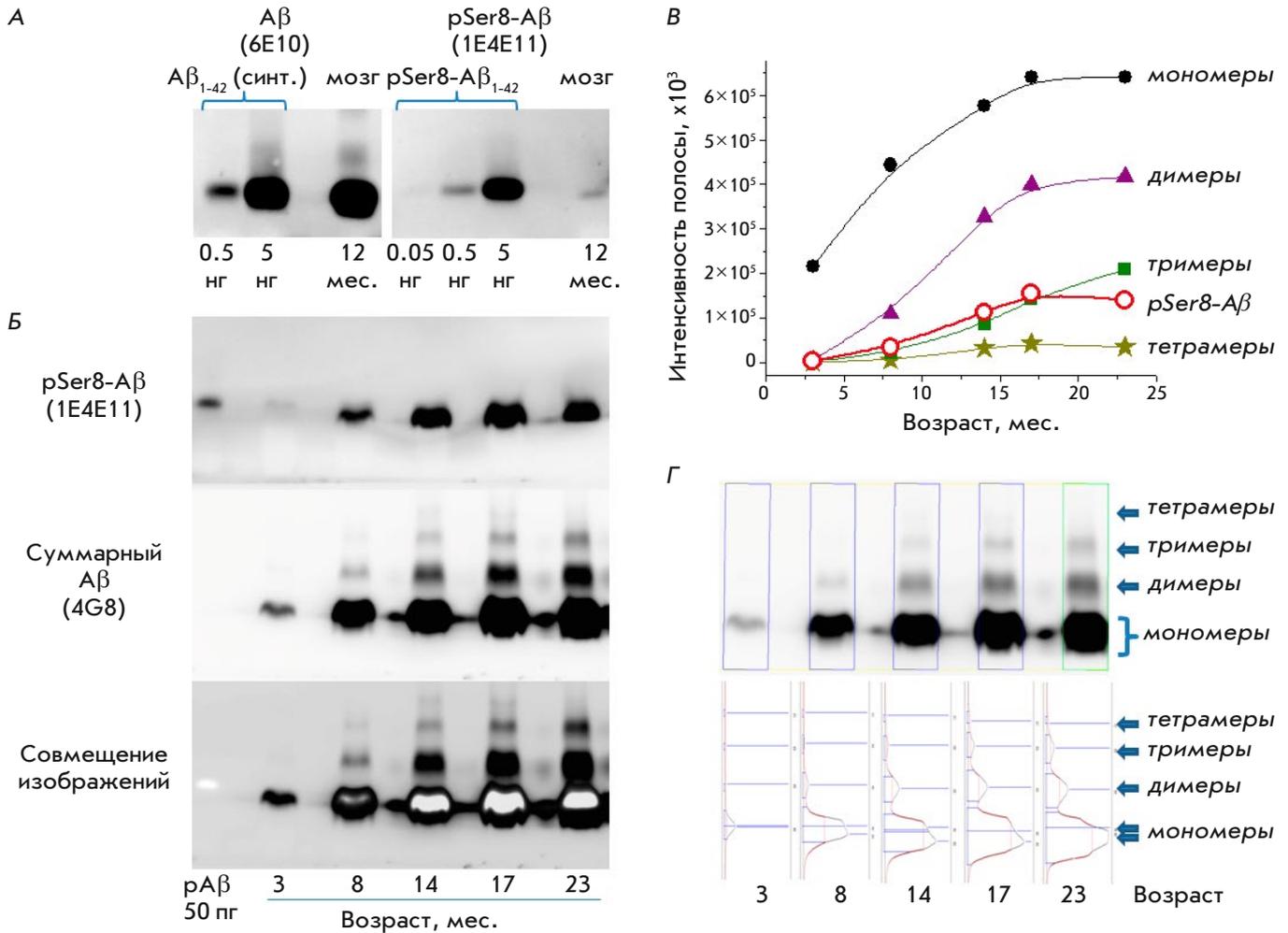


Рис. 1. Анализ динамики накопления pSer8-Aβ в сравнении с общим пулом пептидов Aβ методом Вестерн-блоттинга в мозге мышей 5xFAD. **А** – накопление немодифицированных и pSer8-мономерных форм Aβ в мозге мыши в возрасте 12 месяцев; количество нанесенного образца соответствует 0.3 мг ткани мозга для Aβ и 1 мг ткани – для pSer8-Aβ. **Б** – сравнительный анализ накопления общего пула пептидов Aβ и pSer8-Aβ-форм в мозге мышей разного возраста; количество нанесенного образца соответствует 3 мг ткани мозга. **В** – графики, отображающие динамику накопления мономерных и олигомерных форм Aβ, по результатам обработки изображений в программе GeneTools. **Г** – анализ распределения интенсивности окрашивания полос в каждой дорожке при помощи GeneTools

разцов (рис. 1Г) еще более отчетливо подчеркнул присутствие димеров, тримеров и тетрамеров Aβ в отдельных образцах, а также выявил гетерогенность и наличие, как минимум, двух пиков в пятнах, соответствующих мономерным формам, начиная с 8-месячного возраста. Это может указывать на присутствие усеченных мономеров, наряду с полноразмерными пептидами. Примечательно, что при совмещении изображений на рис. 1Б расположение фосфорилированных форм скорее можно отнести к верхней части мономерного пятна и, в целом, пятна, соответствующие pSer8-Aβ, имеют более четкие границы по сравнению с общим пятном.

Таким образом, можно предположить, что в нижней части общего пятна могут находиться пептиды, усеченные с N-конца и не содержащие участок с Ser8. Это может указывать на то, что фосфорилирование Ser8 может облегчать отщепление соответствующего N-концевого фрагмента.

Анализ pSer8-Aβ в СМЖ

Вестерн-блот-анализ Aβ из СМЖ пациента с БА выявил присутствие существенного количества pSer8-Aβ (рис. 2). Последовательное окрашивание мембраны высокоспецифичными антителами к pSer8-Aβ и антителами к немодифицированным

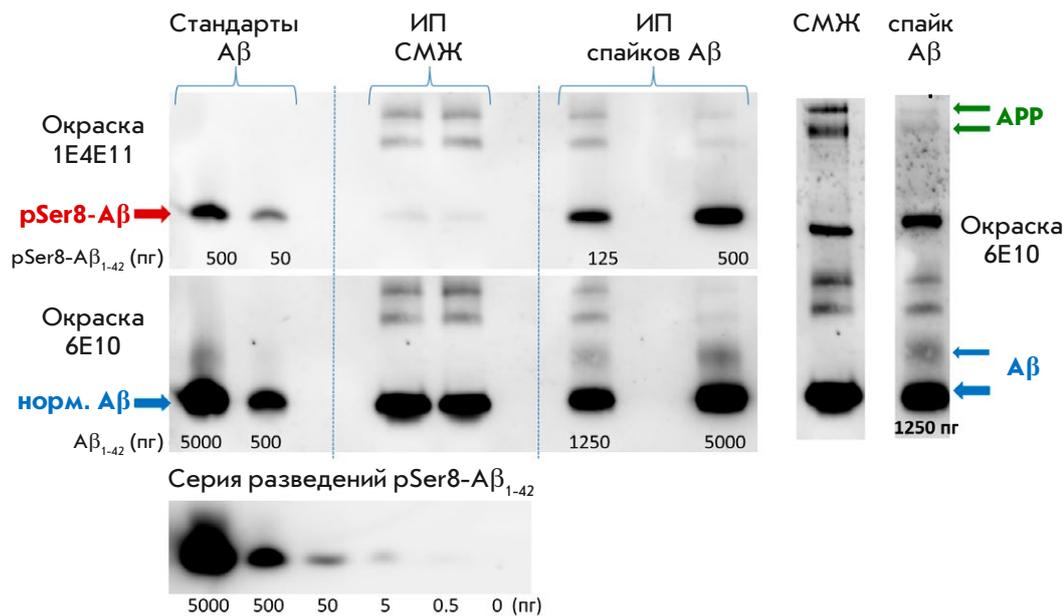


Рис. 2. Оценка содержания рSer8-Аβ в СМЖ пациента с БА методом Вестерн-блотинга. Иммунопреципитацию (ИП) проводили в СМЖ пациента, а также в контрольных образцах Аβ («спайки»). Зеленые стрелки – белок-предшественник (APP), синие – мономер и димер Аβ

формам позволило установить, что доля рSer8-Аβ-форм в СМЖ может составлять порядка 1–10% от немодифицированных полноразмерных форм пептида. Эта величина хорошо согласуется с результатами количественного определения доли фосфорилированных амилоидных мономеров, полученных с использованием электрохимического подхода [43].

Кроме того, в образце СМЖ антитела к немодифицированной форме Аβ идентифицируют две высокомолекулярные полосы, соответствующие белку APP (рис. 2), вероятно, его гликозилированной и негликозилированной формам.

Масс-спектрометрический анализ фосфоформ Аβ из тканей мозга

Фосфорилирование Аβ ранее не удавалось подтвердить методами масс-спектрометрии. В настоящей работе при проведении ВЭЖХ-МС-анализа образцов-фракций Аβ из тканей мозга мышей 5xFAD рассмотрена возможность фосфорилирования Ser, Thr и Tyr (рис. 3). Идентифицированы Аβ-пептиды, фосфорилированные по остаткам Ser8 и Tyr10, но строгое рассмотрение спектров фрагментации не позволило однозначно определить положение ПТМ. Кроме того, обнаружен пептид с двойным фосфорилированием. Это обстоятельство указывает на возможность фосфорилирования не только серина (Ser8), но и тирозина (Tyr10) в составе амилоида. Фосфорилирование Tyr10 не было показано ранее не только МС, но и другими методами. Хотя было установлено, что в данной позиции могут происходить нитрирование и обра-

зование дитирозина, а фосфорилирование может быть промежуточной реакцией, которую сложно детектировать. Помимо Ser8 и Tyr10, некоторые спектры фрагментации указывали на возможность фосфорилирования Ser26. Тем не менее общее качество спектров, полученных для Ser8, Tyr10 и Ser26, нельзя признать достаточным для уверенных выводов, поэтому данный вопрос требует дальнейших исследований.

Кроме того, по данным ВЭЖХ-МС-анализа Аβ-пептидов из мозга человека обнаружен фосфосайт Thr (T719), фосфорилирование которого было близко к 100% и не вызывало сомнений. Этот сайт представлен в составе только удлиненных форм Аβ (X-T48), которые, скорее всего, являются продуктами альтернативного процессинга APP или его деградации, не связанной с амилоидозом. Другие возможные позиции фосфорилирования в APP – 729, 730 и 743 – не имели достоверного покрытия при МС-анализе, что не позволяет сделать каких-либо заключений. Сайт Tyr757 имел хорошее покрытие, однако его фосфорилирования не выявлено.

В целом, хотя результаты МС-анализа указывают на присутствие определенных сайтов фосфорилирования в Аβ и смежных с ним областях APP, тема продолжения МС-исследований фосфоформ Аβ остается актуальной. Решение данной задачи в существенной степени может зависеть от оптимизации процедуры выделения фосфоформ Аβ, поскольку часто используемая солубилизация МК легко гидролизует этерифицированные фосфатные группы [20, 22]. Кроме того, определенные надежды

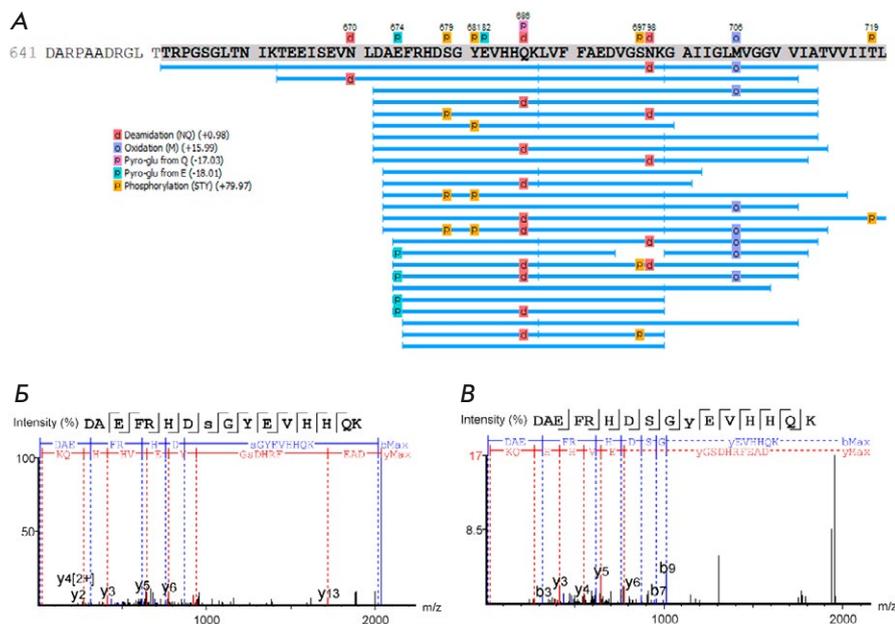


Рис. 3. Покрываемость последовательностей протеоформ Аβ (отмечено серым цветом), выделенных из мозга мышей 5xFAD, с локализацией возможных посттрансляционных модификаций, включая фосфорилирование (Ser (S), Thr (T) и Tyr (Y)). А – масс-спектры столкновительной фрагментации (отмечены характерные у- и b-серии ионов-фрагментов пептида) фосфорилированного пептида Аβ16 с разной локализацией фосфогруппы: спектр для Ser8(s) – Б; спектр для Tyr10(y) – В

связаны с последними достижениями в исследовании синтетических фосфоформ Аβ методом MALDI-TOF и с использованием матричных добавок, минимизирующих потерю фосфатных групп в процессе ионизации, а также усиливающих ионизацию именно фосфопептидов [35, 36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным результатам, накопление pSer8-Аβ-пептидов в мозге мышей линии 5xFAD схоже с динамикой накопления мономерных и димерных форм общего пула пептидов Аβ. К концу жизненного цикла суммарное количество накопленных Аβ-пептидов может достигать ~10 нг на 1 мг ткани мозга, а доля pSer8-Аβ может составлять 1–10%.

Также показано, что доля pSer8-Аβ-форм в СМЖ человека может составлять порядка 1–10% от немодифицированных полноразмерных форм Аβ. При использовании масс-спектрометрии высокого разрешения получены указания на возможность фосфорилирования Аβ по остаткам Ser8 и Ser26, а также фосфорилирования APP по остатку Thr719. Впервые получены указания на возможность фосфорилирования Tyr10. Дальнейшая оптимизация МС-методик для эффективного анализа фосфоформ Аβ остается крайне актуальной. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-30007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alzheimer's Association // Alzheimer's Dement. 2021. V. 17. № 3. P. 327–406.
- Prince M., Bryce R., Albanese E., Wimo A., Ribeiro W., Ferri C.P. // Alzheimer's Dement. 2013. V. 9. № 1. P. 63–75.
- Wang J., Gu B.J., Masters C.L., Wang Y.J. // Nat. Rev. Neurol. 2017. V. 13. № 10. P. 612–623.
- Hardy J.A., Higgins G.A. // Science. 1992. V. 256. № 5054. P. 184–185.
- Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Woods A.S., Cotter R.J., Gowing E., Ball M.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 22. P. 10836–10840.
- Klein W.L., Krafft G.A., Finch C.E. // Trends Neurosci. 2001. V. 24. № 4. P. 219–224.
- Selkoe D.J., Hardy J. // EMBO Mol. Med. 2016. V. 8. № 6. P. 595–608.
- Lee S.J.C., Nam E., Lee H.J., Savelieff M.G., Lim M.H. // Chem. Soc. Rev. 2017. V. 46. № 2. P. 310–323.
- Evin G., Zhu A., Holsinger R.M.D., Masters C.L., Li Q.X. // J. Neurosci. Res. 2003. V. 74. № 3. P. 386–392.
- Galozzi S., Marcus K., Barkovits K. // Expert Rev. Proteomics. 2015. V. 12. № 4. P. 343–354.
- Kent S.A., Spires-Jones T.L., Durrant C.S. // Acta Neuropathol. 2020. V. 140. № 4. P. 417–447.
- Gallardo R., Ranson N.A., Radford S.E. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2020. V. 60. P. 7–16.
- Rogers J., Strohmeier R., Kovelowski C.J., Li R. // Glia. 2002. V. 40. № 2. P. 260–269.
- Portelius E., Bogdanovic N., Gustavsson M.K., Volkman I., Brinkmalm G., Zetterberg H., Winblad B., Blennow K. // Acta Neuropathol. 2010. V. 120. № 2. P. 185–193.
- Wildburger N.C., Esparza T.J., Leduc R.D., Fellers R.T., Thomas P.M., Cairns N.J., Kelleher N.L., Bateman R.J., Brody D.L. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1–9.
- Zakharova N.V., Bugrova A.E., Kononikhin A.S., Indeykina M.I., Popov I.A., Nikolaev E.N. // Expert Rev. Proteomics.

2018. V. 15. № 10. P. 773–775.
17. Zakharova N.V., Kononikhin A.S., Indeykina M.I., Bugrova A.E., Strelnikova P., Pekov S., Kozin S.A., Popov I.A., Mitkevich V., Makarov A.A., et al. // *Mass Spectrom. Rev.* 2022. V. 28. P. e21775.
18. Kummer M.P., Heneka M.T. // *Alzheimer's Res. Ther.* 2014. V. 6. № 3. P. 28.
19. Brinkmalm G., Portelius E., Öhrfelt A., Mattsson N., Persson R., Gustavsson M.K., Vite C.H., Gobom J., Månsson J.E., Nilsson J., et al. // *J. Mass Spectrom.* 2012. V. 47. № 5. P. 591–603.
20. Mukherjee S., Perez K.A., Lago L.C., Klatt S., McLean C.A., Birchall I.E., Barnham K.J., Masters C.L., Roberts B.R. // *Brain Commun.* 2021. V. 3. № 2. fcab028.
21. Inoue K., Hosaka D., Mochizuki N., Akatsu H., Tsutsu-miuchi K., Hashizume Y., Matsukawa N., Yamamoto T., Toyō'oka T. // *Anal. Chem.* 2014. V. 86. № 1. P. 797–804.
22. Roher A.E., Kokjohn T.A., Clarke S.G., Sierks M.R., Maarouf C.L., Serrano G.E., Sabbagh M.S., Beach T.G. // *Neurochem. Int.* 2017. V. 110. P. 1–13.
23. Moro M.L., Phillips A.S., Gaimster K., Paul C., Mudher A., Nicoll J.A.R., Boche D. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2018. V. 6. № 1. P. 3.
24. Bugrova A.E., Strelnikova P.A., Indeykina M.I., Kononikhin A.S., Zakharova N.V., Brzhozovskiy A.G., Barykin E.P., Pekov S.I., Gavrish M.S., Babaev A.A., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 2022. P. 27.
25. Kumar S., Rezaei-Ghaleh N., Terwel D., Thal D.R., Richard M., Hoch M., Mc Donald J.M., Wüllner U., Glebov K., Heneka M.T., et al. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 11. P. 2255–2265.
26. Kumar S., Singh S., Hinze D., Josten M., Sahl H.G., Siepmann M., Walter J. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 11. P. 8641–8651.
27. Rijal Upadhaya A., Kosterin I., Kumar S., von Arnim C.A.F., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Thal D.R. // *Brain.* 2014. V. 137. № 3. P. 887–903.
28. Rezaei-Ghaleh N., Amininasab M., Kumar S., Walter J., Zweckstetter M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11359.
29. Jamasbi E., Separovic F., Hossain M.A., Ciccotosto G.D. // *Mol. Biosyst.* 2017. V. 13. № 8. P. 1545–1551.
30. Hu Z.W., Au D.F., Cruceta L., Vugmeyster L., Qiang W. // *ACS Chem. Neurosci.* 2020. V. 11. № 14. P. 2058–2065.
31. Hu Z.W., Vugmeyster L., Au D.F., Ostrovsky D., Sun Y., Qiang W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 166. № 23. P. 11253–11258.
32. Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Golovin A.V., Polshakov V.I., Kozin S.A., Nudler E., Makarov A.A. // *Mol. Biosyst.* 2014. V. 10. № 10. P. 2590–2596.
33. Istrate A.N., Kozin S.A., Zhokhov S.S., Mantsyzov A.B., Kechko O.I., Pastore A., Makarov A.A., Polshakov V.I. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21734.
34. Barykin E.P., Petrushanko I.Y., Kozin S.A., Telegin G.B., Chernov A.S., Lopina O.D., Radko S.P., Mitkevich V.A., Makarov A.A. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 302.
35. Liepold T., Klafki H.W., Kumar S., Walter J., Wirths O., Wiltfang J., Jahn O. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2023. V. 34. № 3. P. 505–512.
36. Kuzin A.A., Stupnikova G.S., Strelnikova P.A., Danichkina K.V., Indeykina M.I., Pekov S.I., Popov I.A. // *Molecules.* 2022. V. 27. № 23. P. 8406.
37. Oakley H., Cole S.L., Logan S., Maus E., Shao P., Craft J., Guillozet-Bongaarts A., Ohno M., Disterhoft J., van Eldik L., et al. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 40. P. 10129–10140.
38. Schneider F., Baldauf K., Wetzell W., Reymann K.G. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2015. V. 128. P. 68–77.
39. Popugaeva E., Chernyuk D., Zhang H., Postnikova T.Y., Pats K., Fedorova E., Poroikov V., Zaitsev A.V., Bezprozvan-ny I. // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 95. № 4. P. 337–348.
40. Lame M.E., Chambers E.E., Blatnik M. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 419. № 2. P. 133–139.
41. Haider S.R., Reid H.J., Sharp B.L. // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 869. P. 81–91.
42. Hatami A., Monjazebe S., Milton S., Glabe C.G. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 50. № 2. P. 517–525.
43. Yin Z., Wang S., Shen B., Deng C., Tu Q., Jin Y., Shen L., Jiao B., Xiang J. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 5. P. 3539–3545.

УДК 577.213

Характеристика генома двух новых фагов *Lactococcus lactis* phage vL_296 и vL_20A

Т. А. Чуксина¹, А. А. Фаткулин¹, Н. П. Сорокина², И. Т. Смыков², Е. В. Кураева²,
Е. С. Масежная², К. А. Смагина², М. Ю. Шкурников^{1*}

¹Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 101000 Россия

²ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, 109316 Россия

*E-mail: mshkurnikov@hse.ru

Поступила в редакцию 29.07.2024

Принята к печати 15.09.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27468

РЕФЕРАТ Производство ферментированных молочных продуктов основано на использовании заквасочных культур, которые сквашивают молоко с образованием продукта с определенной текстурой, ароматом и вкусом. Однако используемые в производстве молочнокислые бактерии подвержены инфицированию бактериофагами. Изучали геномы двух бактериофагов, выделенных из подсырной сыворотки при производстве сыров. Определили видовую принадлежность и литический спектр этих бактериофагов. Фаги vL_20A и vL_296, выделенные с использованием индикаторных культур лактококков, обладают уникальными литическими спектрами: только четыре бактерии-хозяина из 21 возможной выявленной у них общие. Геномы vL_20A и vL_296 состоят из линейной ДНК длиной 21909 и 22667 п.н. соответственно. Наиболее похожим на фаги vL_20A и vL_296 оказался *Lactococcus phage bIL67* (ANI 93.3 и 92.6 соответственно). Анализ спейсеров CRISPR в геномах заквасочных культур не выявил среди них специфичных к фагам vL_20A и vL_296. Это исследование подчеркивает биоразнообразие фагов *L. lactis*, а также широкое присутствие фагов на молочных заводах и их вирулентность. Однако вирулентность фагов уравнивается наличием в ряде заквасочных культур значительного количества штаммов бактерий, обладающих благодаря системе CRISPR-Cas различной чувствительностью к фагам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаг, CRISPR-Cas, сыроделие, заквасочные культуры, единое здоровье.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ R-M – система рестрикции-модификации; Abi – система абортирования фаговой инфекции.

ВВЕДЕНИЕ

Производство ферментированных молочных продуктов, таких, как сыры и йогурты, основано на использовании заквасочных культур, которые сквашивают молоко, создавая продукт с определенной текстурой, ароматом и вкусом [1]. Однако молочнокислые бактерии, которые используются в производстве, подвержены инфицированию бактериофагами [2]. Молочные предприятия являются специфичной обособленной экологической нишей для бактериофагов молочнокислых бактерий, поскольку лактобактерии всегда присутствуют в сыром молоке и вносятся в пастеризованное молоко в виде бактериальных заквасок [3].

Высокий уровень молочнокислого брожения предотвращает размножение в молоке посторонних и патогенных микроорганизмов, не уничтоженных при пастеризации или попавших в молоко после

пастеризации, а также определяет популяционные характеристики микробиома молочных продуктов за счет повышения кислотности и специфического антагонизма в отношении немолочнокислых бактерий. Развитие бактериофагов может негативно влиять на ферментацию и рост бактериальных культур [1]. Если фаги атакуют заквасочную культуру, то процесс сквашивания может замедлиться или даже остановиться. В результате возникает риск развития патогенной микрофлоры и появления пороков вкуса, аромата и текстуры [4].

В состав заквасок для большого числа кисломолочных продуктов и сыров входят лактококки (*Lactococcus lactis* sps., *L. cremoris*). Поэтому в молочной промышленности широко распространены бактериофаги, лизирующие лактококки. Наиболее уязвимым для фаговых атак является сыроделие. Это обусловлено тем, что при производстве сыров

используется самый мягкий режим пастеризации молока (72–76°C, 20–25 с) и часть популяции бактериофагов, находящихся в сыром молоке, не уничтожается. Кроме того, сыворотка, образующаяся в производстве сыров, практически всегда содержит значительные количества вирионов и служит источником распространения бактериофагов, которые обнаруживаются на различных объектах, в том числе в производственной закваске, на оборудовании, санитарной одежде и открытых частях тела работников [5]. После сообщения о лактококковых бактериофагах в 1930-е годы [6] и дальнейших многочисленных исследований этого явления фаголизис считается одной из постоянных и трудно устранимых проблем с молочнокислым брожением в молочной отрасли.

Для защиты молочнокислых бактерий от бактериофагов используют фагоустойчивые штаммы молочнокислых бактерий и систематически меняют партии заквасок [7]. Это обуславливает целесообразность изучения фагоустойчивости и фаготипа коллекционных культур лактококков. Эффективность отбора фагоустойчивых культур лактококков в значительной степени зависит от набора используемых фагов и спектра их литического действия. Это свидетельствует о необходимости систематического определения фагового фона на предприятиях молочной промышленности. Рассмотрение проблемы бактериофагии интересно также с позиции концепции «Единое здоровье», подразумевающей комплексный единый подход, направленный на устойчивое балансирование и оптимизацию здоровья людей, животных и экосистем, в том числе экосистемы молочных предприятий.

Бактериофаги – это самые распространенные вирусы на Земле. Считается, что большинство свободноживущих бактерий заражено фагами. Об этом свидетельствует присутствие профагов в подавляющем большинстве геномов бактерий [8, 9]. Бактерии выработали множество механизмов защиты от бактериофагов, которые можно назвать «прокариотической иммунной системой» [10]. Эти системы можно разделить на врожденную и адаптивную «прокариотическую иммунную систему» [11]. Классическими примерами врожденного иммунитета являются системы рестрикции-модификации (R-M) [12] или абортирования фаговой инфекции (Abi) [13]. Однако недавно было открыто множество дополнительных врожденных иммунных механизмов, подчеркивающих сильное избирательное давление, оказываемое фагами на микробные сообщества [14, 15].

Единственной «адаптивной» иммунной системой, известной на сегодняшний день, является система CRISPR-Cas. Она позволяет бактериям включать

короткие фрагменты фаговой ДНК в специальные матрицы CRISPR. При встрече с фагом транскрибированные спейсеры связываются с ДНК фага и направляют ее на деградацию с помощью белков Cas [16].

Мы изучали геномы двух новых видов бактериофагов, выделенных при производстве сыров. Определена видовая принадлежность и литический спектр этих фагов, проанализированы возможные механизмы вирулентности и их чувствительность к системе CRISPR-Cas основных заквасочных культур.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка бактериофагов

В работе использовали бактериальные штаммы и бактериофаги из Коллекции молочнокислых бактерий для производства сыров и бактериофагов к ним (ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН).

Бактериофаги были выделены из образцов подсырной сыворотки. Бактериофаг vL_20A выделен из сыворотки, полученной при изготовлении полутвердого сыра на Переславском сыродельном заводе (Ярославская область) 01.06.1985 года, и размножен на чувствительной культуре *L. lactis* subsp. *lactis* 393-8. Бактериофаг vL_296 выделен из сыворотки, полученной при изготовлении полутвердого сыра на Юговском комбинате молочных продуктов (Пермский край) 07.06.2022 года, и размножен на чувствительной культуре *L. lactis* subsp. *lactis* 345-8.

Чувствительную культуру выращивали на среде M17 с лактозой (HiMedia, Индия). Образцы сыворотки фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0.45 мкм.

Бактериофаги выделяли с использованием метода поверхностного посева: на чашки Петри с подсушенной твердой средой M17 (1.5% агара) наносили 0.1 мл культуры *L. lactis* subsp. *lactis* в фазе логарифмического роста, растирали стеклянным шпателем и оставляли на 10–15 мин для впитывания влаги в агар. Затем на чашку наносили каплю отфильтрованной сыворотки, закрывали крышкой и оставляли на 10–15 мин при комнатной температуре. После чего чашки переворачивали и термостатировали в течение 16–18 ч при температуре $30 \pm 1^\circ\text{C}$. При наличии зон лизиса в месте нанесения сыворотки кусочек агара из зоны лизиса помещали в пробирку с 3 мл среды M17, тщательно взбалтывали и выдерживали в течение 24 ч при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$ для более полного выхода частиц фага из агара. Затем каплю среды из пробирки наносили

на свежий газон культуры и термостатировали в течение 16–18 ч. Для получения чистого бактериофага выделенные смеси бактериофагов титровали методом двухслойного агара: по 0.1 мл культуры и 0.1 мл десятикратных разведений смеси фагов вносили в пробирки с 3 см³ полужидкого агара M17 (0.6% агара) и выливали суспензию в чашку с плотной средой. Инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 30 ± 1°C. Кусочки агара из отдельных негативных колоний (бляшек) использовали для накопления фагов в жидкой среде с чувствительной культурой. Полученные культуры бактериофагов фильтровали через стерильный фильтр с размером пор 0.22 мкм и хранили при температуре 4 ± 2°C.

Определение литического спектра

Спектр литической активности фагов в отношении 35 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis*, 35 штаммов *L. cremoris* и 35 штаммов *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* определяли методом культивирования на двухслойном агаре в культуральных планшетах [17]. О чувствительности лактококков к бактериофагам судили по наличию или отсутствию зоны просветления в месте нанесения фага.

Электронная микроскопия

Отобранные образцы фагов фиксировали при комнатной температуре 1.5% раствором глутаральдегида в 0.1 М фосфатном буфере Sorenson, pH 7.2, в течение 20 мин. После чего 5 мкл образца переносили на поддерживающую медную сетку (mesh-400), покрытую пленкой нитроцеллюлозы (parlodium), и выдерживали в течение 2 мин для осаждения дисперсных частиц на поверхность пленки. Контрастность образца повышали с помощью негативного контрастирования [18, 19]. Для этого пипеткой переносили каплю (2 мкл) 2% раствора уранилацетата на каплю зафиксированного образца, находящуюся на сетке, и выдерживали в течение 4 мин. После этого излишки раствора убирали с поверхности сетки фильтровальной бумагой и помещали в вакуумную камеру для окончательной сушки при комнатной температуре.

Морфологию бактериофагов изучали с помощью трансмиссионного электронного микроскопа EM-410 (Philips, Нидерланды) при напряжении 40 кВ. Изображения получены на пленке Fujicolor C-200 (FUJIFILM Corporation, TOKYO 106-8620, Япония).

Выделение ДНК-фагов и секвенирование

К образцам лизата бактерий добавляли раствор для осаждения (4% PEG-6000, 1 моль/л NaCl). Инкубировали при температуре 4°C в течение 3 ч. После инкубации пробирки центрифугировали в те-

чение 15 мин при 12 000 *g* при 4°C. Супернатант отбирали, а осадок ресуспендировали в 180 мкл PBS. Затем к образцам добавляли 1.25 мкл протеиназы К (20 мг/мл) и инкубировали при 56°C в течение 1.5 ч, избегая встряхивания. ДНК выделяли с помощью набора QiaAmp Viral DNA (Qiagen, ФРГ) по протоколу производителя. Концентрацию и качество ДНК оценивали с использованием Nanodrop и Qubit.

Библиотеки ДНК готовили с помощью NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina® (New England BioLabs, США) согласно протоколу производителя. Секвенирование полученных библиотек осуществляли на секвенаторе NovaSeq 6000 (Illumina, США) в режиме парных прочтений 2 × 150 п.н.

Анализ результатов секвенирования

Качество сырых прочтений оценивали с использованием программы FastQC 0.12.1. Затем прочтения предобрабатывали с помощью fastp 0.23.2. Дополнительно проводили таксономическую классификацию прочтений с использованием стандартной базы данных Kraken 2. Сборку геномов выполняли с использованием SPAdes 4.0.0. Бактериальные геномы получены с применением флага «-- isolate», в то время как для сборки вирусных геномов использовали опцию «--metaviral». Качество сборок оценивали с помощью программы QUAST 5.2.0.

Вирусные геномы затем были валидированы с использованием CheckV 1.0.1. Предварительная таксономическая идентификация фагов выполнена с помощью BLAST. Полные геномы вирусов, относящихся к виду *Lactococcus phage*, получены из базы данных Nucleotide NCBI, после чего ruANI 0.2.12 использовали для оценки средней идентичности нуклеотидов (ANI) методом ANIb. Геномы бактериофагов были переориентированы с помощью dnaapl 0.7.0 и далее аннотированы с использованием PharoKka 1.7.3. clinker 0.0.29 для построения сравнительной визуализации геномов.

При анализе спейсеров CRISPR изучили 562 генома заквасочных культур родов *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Propionibacterium freudenreichii* из базы данных NCBI GenBank [20]. Наличие систем иммунитета в бактериальных геномах определяли с помощью MinCED 0.4.2 и PADLOC 2.0.0.

Размещение данных

Полногеномные последовательности фагов vL_20A и vL_296 размещены в репозитории GenBank под номерами PQ062249 и PQ062250.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Выделение и морфологическая характеристика фагов

Фаги vL_20A и vL_296 были выделены из подсырной сыворотки с использованием индикаторных культур лактококков *L. lactis* subsp. *lactis* 393-8 и *L. lactis* subsp. *lactis* 345-8 в качестве бактериальных хозяев. Просвечивающая электронная микроскопия (рис. 1) показала, что фаг vL_20A имеет икосаэдрическую головку диаметром 39 ± 3 нм, хвост длиной 107 ± 6 нм. В свою очередь фаг vL_296 имеет икосаэдрическую головку диаметром 45 ± 4 нм и хвост длиной 125 ± 8 нм. Данная морфология указывает на сходство с каудовиридами (Caudoviricetes). Согласно Международному кодексу классификации и номенклатуры вирусов [21], эти фаги обозначены как *L. lactis* phage vL_20A и *L. lactis* phage vL_296 (Viruses; Duplodnaviria; Heunggongvirae; Uroviricota; Caudoviricetes; Ceduvovirus; Ceduvovirus vL_20A and vL_296).

Литический спектр

Литический спектр фагов определяли в зависимости от наличия или отсутствия образования зоны просветления (рис. 2). Четыре штамма *L. cremoris* были лизированы фагом vL_20A и восемь – vL_296. Литическая активность в отношении *L. cremoris* составила 11,8% (4/34) для vL_20A и 22,9% (8/35) для vL_296. Литическая активность в отношении *L. lactis* subsp. *lactis* составила 5,7% (2/35) и 14,3% (5/35) соответственно. Литическая активность фагов vL_20A и vL_296 в отношении *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* находилась на уровне 5,7% (2/35) и 14,3% (4/28) соответственно. Можно отметить, что фаги vL_20A и vL_296 обладают уникальными литическими спектрами. Из 21 выявленной бактерии-хозяина общими были только четыре (*L. cremoris* T4-39, *L. cremoris* 591-4-7, *L. cremoris* T5-1, *L. lactis* subsp. *lactis* 85-10).

Анализ генома

Полные последовательности геномов vL_20A и vL_296 получены с использованием платформы Illumina NovaSeq 6000. Их геномы состояли из линейной ДНК длиной 21 909 п.н. (GC 35,75%) и 22667 п.н. (GC 35,89%) соответственно. Предсказано 47 открытых рамок считывания (ORF) у vL_20A и 43 ORF у vL_296, из которых 11 были похожи на гены, кодирующие известные функциональные белки (рис. 3), в то время как остальные ORF кодируют предполагаемые белки.

По функциональной активности все предсказанные белки были разделены на четыре группы

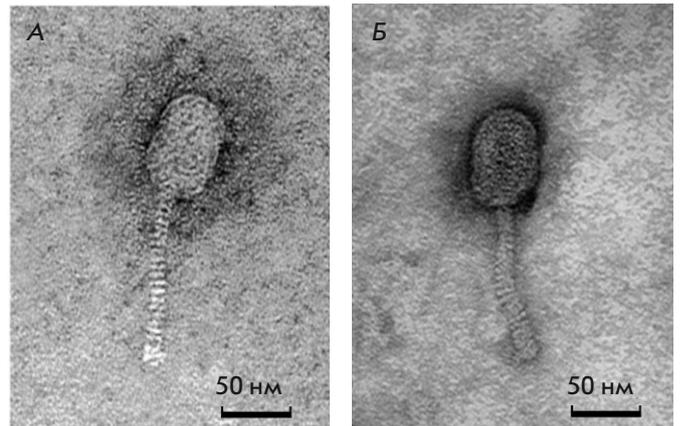


Рис. 1. Микрофотографии фагов *L. lactis* phage vL_20A (A) и *L. lactis* phage vL_296 (Б)

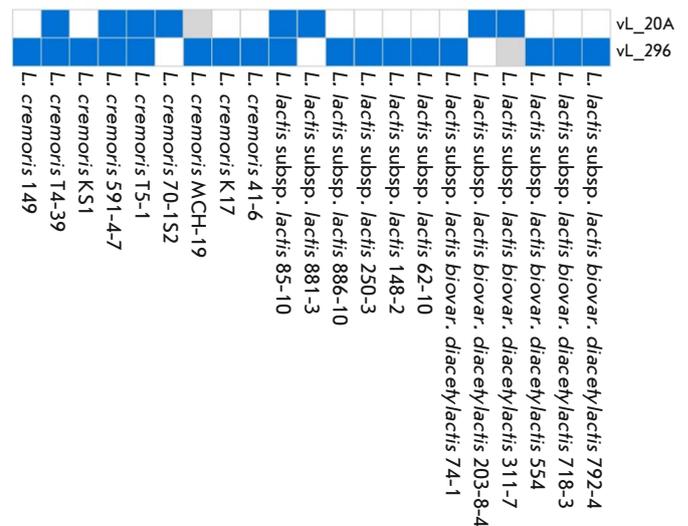


Рис. 2. Литический спектр фагов vL_20A и vL_296. Синий – наличие негативных колоний, белый – отсутствие негативных колоний, серый – не анализировали

(рис. 3): белки метаболизма ДНК (по две ORF), белки упаковки и формирования головки (по пять ORF), белки лизиса (по две ORF) и белки хвоста (по две ORF). Остальные ORF предположительно кодируют белки с неизвестной функцией. Поиск в базах данных VFDB и CARD не выявил генов вирулентности или устойчивости к антибиотикам.

Сравнительный анализ генома

Основным критерием при определении вида вируса была идентичность последовательности генома менее чем на 95% с остальными представителями рода [21]. Чтобы определить геномное сходство vL_20A и vL_296 с другими фагами, сначала про-

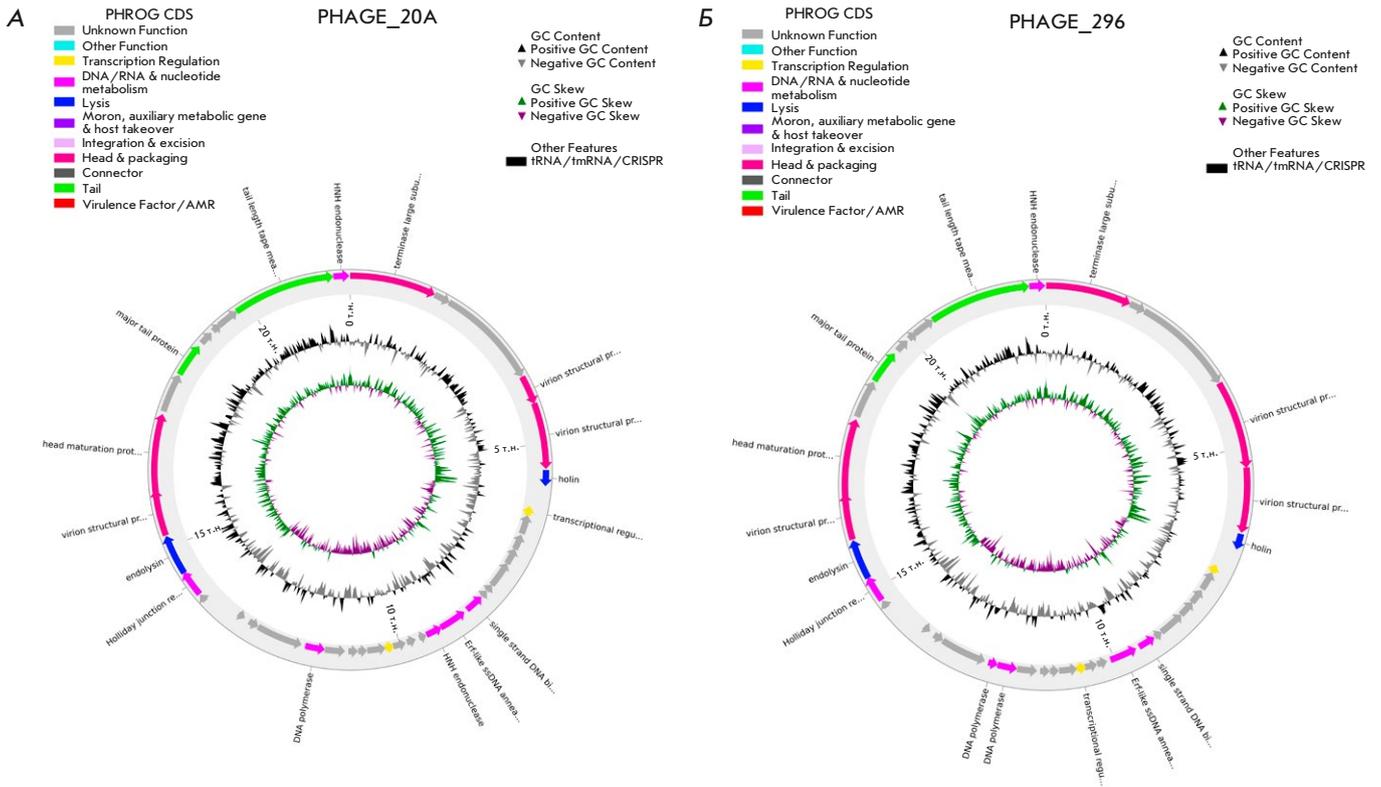


Рис. 3. Визуализация известных функциональных белков, кодируемых в геноме фагов *L. lactis* phage vL_20A (A) и *L. lactis* phage vL_296 (B)

вели BLASTn-поиск в NCBI. Геномы вирусов семейства *L. phage* получили из базы данных Nucleotide NCBI и оценили среднюю идентичность нуклеотидов (ANI).

На рис. 4 представлены результаты оценки ANI геномов 10 наиболее генетически близких фагов из 254 проанализированных. Наиболее сходным с фагами vL_20A и vL_296 был *L. phage* bIL67 (ANI 93.3 и 92.6 соответственно). Необходимо отметить, что значение ANI при сравнении vL_20A и vL_296 было меньше, чем для вида *L. phage* bIL67 и составляет 92.5 (рис. 5). Можно предположить, что vL_20A и vL_296 являются представителями отдельных видов, не описанных ранее.

ANI между двумя фагами составляет лишь 92.5. Сравнение геномов vL_20A и vL_296 выявило большое количество полиморфизмов в главном белке хвоста (major tail protein), который участвует в связывании фага с клеткой-хозяином (рис. 6). Кроме того, различия в нуклеотидной последовательности фагов предположительно могут отразиться на эффективности механизмов защиты бактериальной клетки, направленных на деградацию генома вируса.

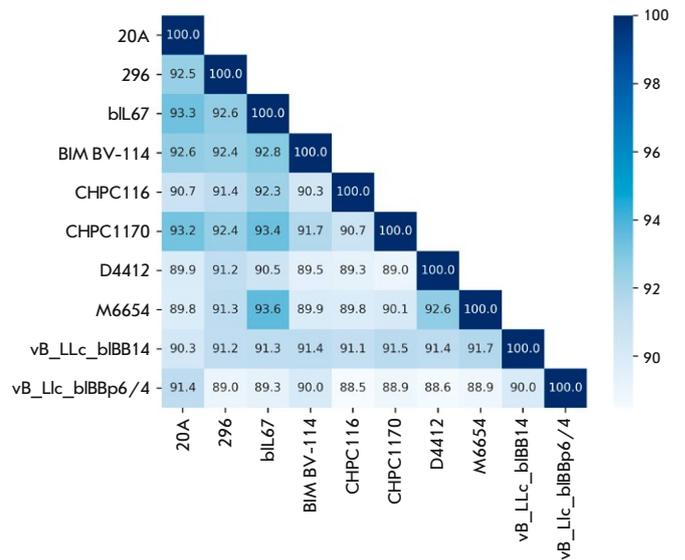


Рис. 4. Тепловая диаграмма ANI *L. lactis* phage vL_20A и *L. lactis* phage vL_296 и восьми наиболее гомологичных фагов *L. lactis*

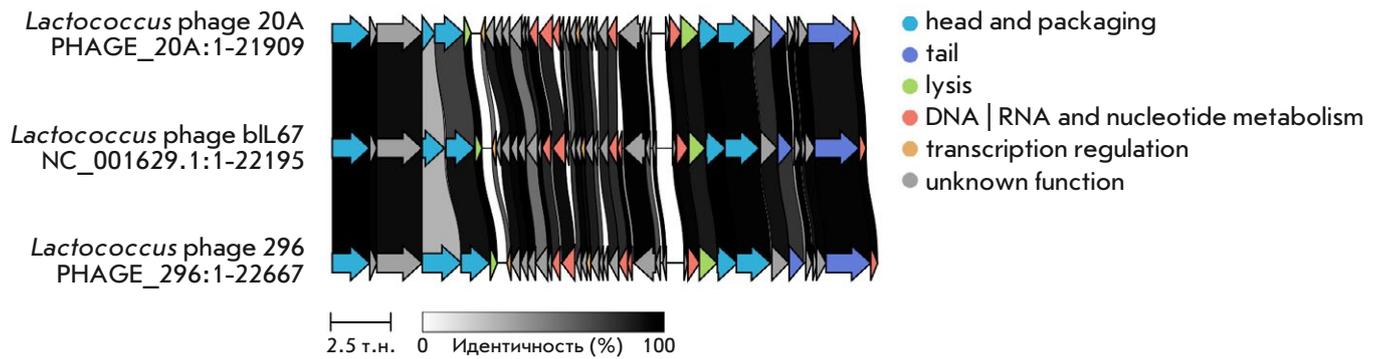


Рис. 5. Схема строения и гомологии геномов фагов *L. phage blL67*, *L. lactis phage vL_20A* и *L. lactis phage vL_296*

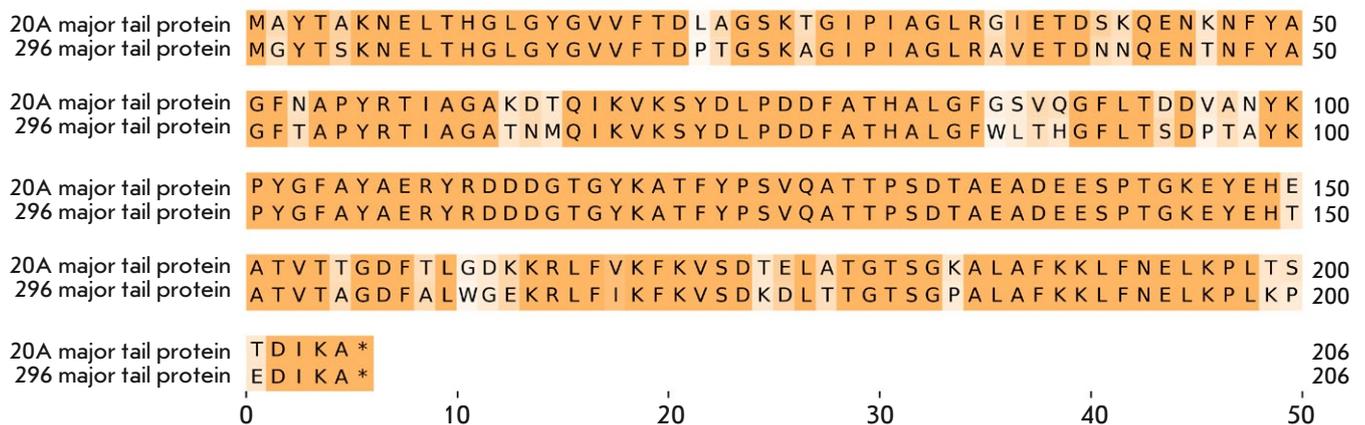


Рис. 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей главного белка хвоста в геномах vL_20A и vL_296

Анализ CRISPR-спейсеров молочнокислых бактерий

Бактерии обладают средствами защиты от чужеродных захватчиков, включая широко распространенную систему CRISPR-Cas. Спейсеры CRISPR участвуют в адаптивном иммунитете, обеспечивая комплементарное связывание РНК с нуклеиновыми кислотами чужеродных элементов и последующее разрушение их белками Cas. Эту систему содержит подавляющее большинство заквасочных культур бактерий (рис. 7).

Мы проанализировали наличие спейсеров, специфичных к фагам vL_20A и vL_296, в геномах заквасочных культур. Среди 562 проанализированных геномов заквасочных бактерий не удалось выявить ни одного спейсера, специфичного к фагам vL_20A и vL_296. Можно предположить, что выявленные нами новые виды фагов не контактировали длительное время с проанализированными заквасочными культурами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Фаговые атаки на кислотообразующую микрофлору сыров чрезвычайно опасны с точки зрения безопасности продукции, поскольку представляют угрозу интенсивного развития остаточной постпастеризационной микрофлоры. Для снижения риска выпуска недоброкачественной и опасной для здоровья потребителей продукции большое значение имеет ограничение репродукции бактериофагов путем использования многоштаммовых заквасок, их систематической ротации и включением в состав заквасочной микрофлоры фагорезистентных культур.

Подбор фагорезистентных штаммов, входящих в состав заквасок, требует изучения разнообразия и свойств фагов, способных заражать заквасочные культуры. В частности, описанные нами фаги были выделены из подсырной сыворотки с интервалом в 37 лет и вызывали проблемы ферментации сыра. Это свидетельствует о том, что фаги и чувствительные к ним штаммы бактерий сохраняются

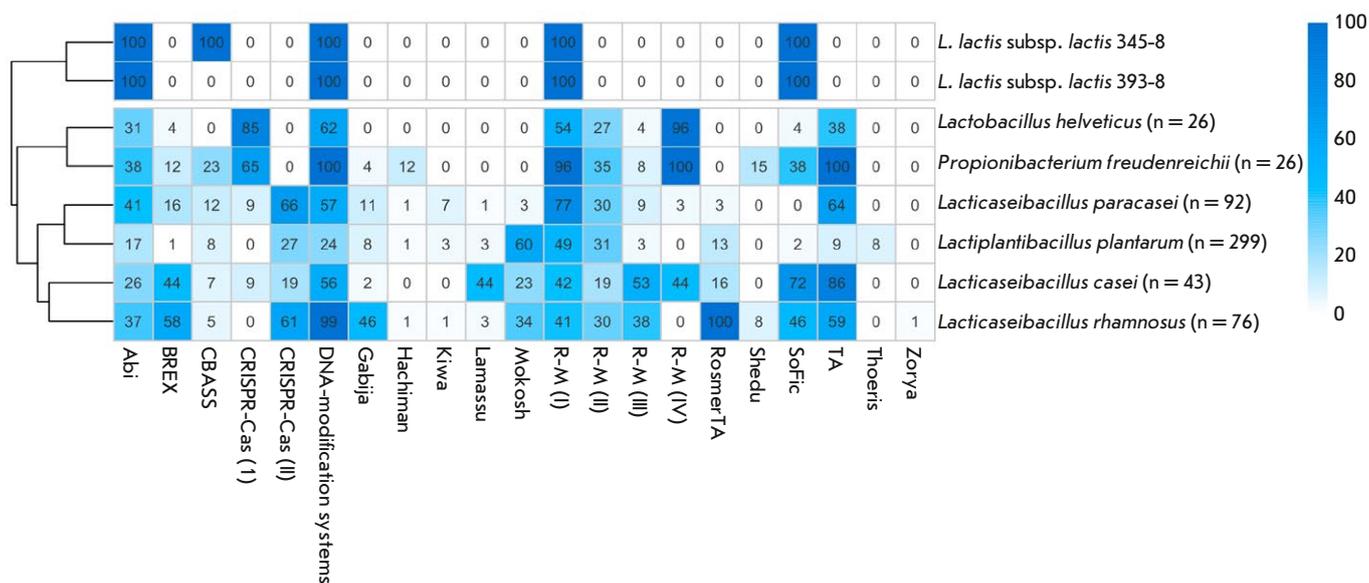


Рис. 7. Системы иммунитета молочнокислых бактерий. В ячейках указана частота встречаемости механизма иммунитета у представителей заквасочных культур. В названии рода указано число проанализированных геномов

в заквасочных культурах как показано ранее [22]. Учитывая, что уровень сходства ANI у вновь выделенных фагов был значительно ниже 95, можно предположить, что нами впервые описаны два новых вида фагов.

Наиболее генетически близким к этим фагам является вид *L. phage* biL67 [23]. Нами установлено, что геномы новых фагов *L. lactis* phage vL_20A и *L. lactis* phage vL_296 представляют собой линейную ДНК длиной 21 909 и 22 667 п.н. соответственно. В геномах vL_20A и vL_296 можно выделить 47 и 43 ORF, из которых 11 похожи на гены белков с известной функциональной активностью.

Литический спектр фагов довольно узкий и практически не перекрывается. Можно выделить только четыре общих штамма бактерий-хозяев: *L. cremoris* T4-39, *L. cremoris* 591-4-7, *L. cremoris* T5-1 и *L. lactis* subsp. *lactis* 85-10. Эти данные отличаются от результатов, полученных Stuer-Lauridsen и соавт., где большинство изученных фагов *L. lactis* были способны лизировать 10–90% штаммов [24]. Это можно объяснить различиями в источниках молочных продуктов, из которых были выделены фаги.

В CRISPR-кассетах заквасочных бактерий не удалось выявить ни одного спейсера, специфичного для фагов vL_20A и vL_296. Можно предположить, что выявленные нами новые виды фагов не контактировали длительное время с проанализированными заквасочными культурами. Тем не менее в геномах многих культур обнаружены системы

CRISPR/Cas типа 1 и 2, что позволяет ожидать формирование у них иммунитета при встрече с данными фагами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В текущих условиях мировой обстановки необходимо переходить к устойчивым, инклюзивным и независимым от внешних факторов агропродовольственным системам. Этого можно достичь, рассматривая пищевую систему как непрерывную и взаимосвязанную цепочку, в которой отслеживаются и контролируются риски на каждом этапе: от выращивания сырья до производства продукции, от состояния производственной среды до качества и безопасности готового продукта. В этой цепочке «фаговое здоровье производства» можно рассматривать как основную причину нарушений устойчивости при производстве кисломолочных продуктов.

Это исследование подчеркивает биоразнообразие фагов *L. lactis*, выделенных из подсырной сыворотки. Оно также подтвердило, что фаги широко распространены на молочных заводах и их вирулентность. Однако присутствие в заквасках штаммов бактерий с различной степенью чувствительности к фагам уравнивает эту опасность за счет систем бактериального иммунитета.

Высокий уровень устойчивости заквасочных штаммов к фаговой инфекции может препятствовать массовому размножению фагов в многокомпонентных заквасочных культурах и объяснять то,

почему фаги обнаруживаются в ферментированных молочных продуктах без проблем с подкислением. Однако иногда одновременное присутствие различных фагов, активных против большей части штаммов в пределах одной заквасочной культуры, может привести к получению дефектного продукта [7]. Необходимы дополнительные исследования для лучшего понимания экологической роли фагов и оценки их влияния на процесс ферментации. Обилие бактериофагов на молочных предприятиях,

инфицирующих закваски, еще раз подчеркивает важность разработки стратегий борьбы с фагами в молочной промышленности. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации на проведение крупных
научных проектов по приоритетным
направлениям научно-технологического развития
(проект № 075-15-2024-483).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- White K., Eraclio G., McDonnell B., Bottacini F., Lugli G.A., Ventura M., Volontè F., Dal Bello F., Mahony J., van Sinderen D. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2024. V. 90. № 3. P. e02152–23.
- Lahbib-Mansais Y., Mata M., Ritzenthaler P. // *Biochimie.* 1988. V. 70. № 3. P. 429–435.
- Kelleher P., Mahony J., Schweinlin K., Neve H., Franz C.M., van Sinderen D. // *International Journal of Food Microbiology.* 2018. V. 272. P. 29–40.
- White K., Yu J.-H., Eraclio G., Bello F.D., Nauta A., Mahony J., van Sinderen D. // *MRR.* 2022. <https://www.oaepublish.com/articles/mrr.2021.04>.
- Eller M.R., Dias R.S., De Moraes C.A., De Carvalho A.F., Oliveira L.L., Silva E. a. M., da Silva C.C., De Paula S.O. // *Arch Virol.* 2012. V. 157. № 12. P. 2265–2272.
- Whitehead H.R., Cox G.A. // *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 1935. V. 16. P. 319–320.
- Mahony J., McDonnell B., Casey E., van Sinderen D. // *Annu Rev. Food Sci. Technol.* 2016. V. 7. P. 267–285.
- Roux S., Hallam S.J., Woyke T., Sullivan M.B. // *eLife.* 2015. V. 4. P. e08490.
- Touchon M., Bernheim A., Rocha E.P.C. // *The ISME Journal.* 2016. V. 10. № 11. P. 2744–2754.
- Bernheim A., Sorek R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. № 2. P. 113–119.
- Dimitriu T., Szczelkun M.D., Westra E.R. // *Current Biology.* 2020. V. 30. № 19. P. R1189–R1202.
- Vasu K., Nagaraja V. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013. V. 77. № 1. P. 53–72.
- Labrie S.J., Moineau S. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 4. P. 1482–1487.
- Doron S., Melamed S., Ofir G., Leavitt A., Lopatina A., Keren M., Amitai G., Sorek R. // *Science.* 2018. V. 359. № 6379. P. eaar4120.
- Kronheim S., Daniel-Ivad M., Duan Z., Hwang S., Wong A.I., Mantel I., Nodwell J.R., Maxwell K.L. // *Nature.* 2018. V. 564. № 7735. P. 283–286.
- Koonin E.V., Makarova K.S. // *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2019. V. 374. № 1772. P. 20180087.
- Kutter E. In: *Bacteriophages* / Eds Clokie M.R.J., Kropinski A.M. Totowa, NJ. Humana Press, 2009. P. 141–149.
- Miller S.E. // *J. Elec. Microsc. Tech.* 1986. V. 4. № 3. P. 265–301.
- Wyffels J.T. // *Microsc. Microanal.* 2001. V. 7. № 1. P. 66.
- Sayers E.W., Beck J., Bolton E.E., Bourexis D., Brister J.R., Canese K., Comeau D.C., Funk K., Kim S., Klimke W., et al. // *Nucleic Acids Research.* 2021. V. 49. № D1. P. D10–D17.
- Adriaenssens E., Brister J.R. // *Viruses.* 2017. V. 9. № 4. P. 70.
- Zago M., Scaltriti E., Rossetti L., Guffanti A., Armiento A., Fornasari M.E., Grolli S., Carminati D., Brini E., Pavan P., et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. № 15. P. 4712–4718.
- Schouler C., Ehrlich S.D., Chopin M.-C. // *Microbiology.* 1994. V. 140. № 11. P. 3061–3069.
- Stuer-Lauridsen B., Janzen T., Schnabl J., Johansen E. // *Virology.* 2003. V. 309. № 1. P. 10–17.

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 сокращением (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 редакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам

в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу 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, doi. 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. doi: 10.1038/nature03440.

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.