

ISSN 2686-7389

Том 514

Январь – Февраль 2024



ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ ИЗ ЖИЗНИ



НАУКА

— 1727 —

Российская академия наук

ДОКЛАДЫ
РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК
НАУКИ О ЖИЗНИ

Том 514 2024 Январь-Февраль

Основан в 1933 г.

Выходит 6 раз в год

ISSN 2686-7389

Журнал издается под руководством

Президиума РАН

Редакционный совет

А.М. Сергеев (*председатель*), А.Р. Хохлов, О.В. Руденко,
Н.С. Бортников, А.Г. Габибов, К.В. Рудаков, С.С. Давыденко

Главный редактор

А.Г. Габибов

Редакционная коллегия

Ю.Ю. Дгебуадзе (*заместитель главного редактора*),
О.А. Донцова (*заместитель главного редактора*),
Н.А. Зиновьева (*заместитель главного редактора*),
А.А. Потапов (*заместитель главного редактора*),
Л.А. Ашрафян, А.В. Васильев, В.В. Власов, С.Г. Георгиева,
В.М. Говорун, А.И. Григорьев, И.И. Дедов, С.М. Деев,
В.М. Косолапов, В.В. Кузнецов, Н.Е. Кушлинский, И.В. Маев,
С.А. Недоспасов, М.А. Островский, Д.С. Павлов, В.О. Попов,
.А. Тихонович, А.Н. Томилин, М.В. Угрюмов, В.П. Чехонин,
А.А. Москалев, Arieh Warshel, Joseph Schlessinger,
Aaron Ciechanover, Roger D. Kornberg

Ответственный секретарь Кнорре Вера Дмитриевна

Зав. редакцией Велишаева Назифе Серверовна

Научный редактор Курбацкая Инна Николаевна

Адрес редакции: 117342, Москва, ул. Бутлерова, д. 17Б, 6 этаж

тел. (499) 658-01-02; (499) 658-01-03

СОДЕРЖАНИЕ

Том 514, 2024

Соотношение продукций фитопланктона, гетеротрофного планктона и планктоноядных рыб в разнотипных водоемах <i>В. В. Бульон</i>	5
Влияние солености среды на размножение и жирнокислотный состав микроводоросли <i>Nitzschia cf. thermaloides</i> <i>Н. С. Репкина, В. П. Воронин, О. И. Давидович, Н. А. Давидович, С. А. Мурзина</i>	11
Новый тип желез обнаружен у цестод: нейросекреторные нейроны выделяют секрет в организм хозяина-рыбы <i>Н. М. Бисерова, И. А. Кутырев, В. В. Малахов</i>	16
Анатомия пищеварительной системы и механизм питания <i>Quatuoralisia malakhovi</i> (Hemichordata, Torquaratoridae) <i>В. В. Малахов, А. И. Лукиных, О. В. Ежова</i>	21
Питание малого пещерного медведя (Mammalia, Carnivora, Ursidae, <i>Ursus (Spelaearctos) rossicus</i> Borissak, 1930) Урала по результатам анализа изотопов ¹³ C и ¹⁵ N в коллагене костей <i>П. А. Косинцев, К. Ю. Коновалова, Г. В. Симонова</i>	26
Увеличение продукции гликопротеиновых гормонов человека в клетках СНО при использовании гетерологичных сигнальных пептидов для бета-цепей <i>М. В. Синегубова, Д. Э. Колесов, Л. К. Даянова, И. И. Воробьев, Н. А. Орлова</i>	31
Параметры клеточной гибели и пролиферации в клетках рака предстательной железы человека с измененной экспрессией изоформ миозина 1С <i>Е. С. Соломатина, Е. Н. Нишкомаева, А. В. Ковалева, А. В. Творогова, Д. М. Поташикова, А. А. Саидова</i>	36
Комплекс TREX-2-ORC <i>D. melanogaster</i> участвует в ядерном экспорте мРНК гистонов <i>М. М. Курашкова, Ю. А. Якушева, С. Г. Георгиева</i>	44
Иммунолипосомы как перспективное противовирусное средство к SARS-CoV-2 <i>Т. В. Бобик, М. А. Симонова, Н. Ю. Рушкевич, Н. Н. Костин, Г. А. Скрыбин, В. Д. Кнорре, А. А. Шульга, Е. В. Коновалова, Г. М. Прошкина, А. Г. Габиров, С. М. Деев</i>	50
Исследование роли длинной некодирующей РНК <i>roX</i> в поддержании комплекса дозовой компенсации у <i>Drosophila melanogaster</i> <i>В. А. Бабоша, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко</i>	56
HSPBP1 в комплексе с пептидом белка врожденного иммунитета TAG7 способен лизировать опухолевые клетки, несущие TNFR1-рецептор <i>Е. А. Романова, Д. М. Юркина, Д. В. Яшин, Л. П. Сащенко, Г. П. Георгиев</i>	60
Два источника целомической мезодермы у брахиопод <i>Т. В. Кузьмина, Е. Н. Темерева</i>	65

Прямое репрограммирование соматических клеток кожи человека с болезнью Хантингтона в нейроны стриатума для создания моделей патологии <i>Н. А. Красковская, М. Г. Хотин, А. Н. Томилин, Н. А. Михайлова</i>	69
Активность ферментов энергетического обмена у смолтов и пестряток атлантического лосося (<i>Salmo salar</i> L), выращиваемых с применением разных режимов освещения <i>М. В. Кузнецова, М. А. Родин, Н. С. Шульгина, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицин, С. А. Мурзина, академик РАН Н. Н. Немова</i>	74
Неожиданная находка трехперстки (aves: Charadriiformes: Turnicidae) в нижнем плейстоцене Крыма <i>Н. В. Зеленков</i>	81
Эффективное редактирование локуса <i>CXCR4</i> с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов CAS9, стабилизированных полиглутаминовой кислотой <i>Д. С. Голубев, Д. С. Комков, М. В. Шепелев, Д. В. Мазуров, Н. А. Круглова</i>	85
Содержание изотопов ¹³ C и ¹⁵ N в коллагене костей малого пещерного медведя (Mammalia, Carnivora, Ursidae, <i>Ursus (Spelaearctos) rossicus</i> Borissiak, 1930) Западной Сибири <i>П. А. Косинцев</i>	91
Нейрональная и мышечная дифференцировки клеток млекопитающих сопровождаются сменой экспрессирующихся изоформ RHF10 <i>Д. О. Байрамова, А. М. Азиева, А. В. Феоктистов, С. Г. Георгиева, Н. В. Сошникова</i>	96
Полиморфизм меланофилина у хорьков разного окраса <i>Г. Ю. Косовский, В. И. Глазко, О. И. Абрамов, Т. Т. Глазко</i>	101
N ⁶ -(5-фенилпентан-1-ил)аденин – новый неконкурентный рецепторспецифичный антицитокинин <i>А. А. Зенченко, Е. М. Савельева, М. С. Дреничев, Г. А. Романов, В. Е. Ословский</i>	107
Контактное ингибирование пролиферации сопровождается экспрессией RHF10D субъединицы ремоделирующего хроматин комплекса rba1 в клеточных линиях мышцы и человека <i>Ю. П. Симонов, В. В. Татарский, С. Г. Георгиева, Н. В. Сошникова</i>	111

CONTENTS

Tom 514, 2024

Relationship Between Phytoplankton, Heterotrophic Plankton, and Planktivorous Fish Productions in Different Water Bodies <i>V. V. Boulion</i>	5
The Effect of Salinity on Reproduction and Fatty Acids Profile of the Diatom Microalgae <i>Nitzschia cf. thermaloides</i> <i>N. S. Repkina, V. P. Voronin, O. I. Davidovich, N. A. Davidovich, S. A. Murzina</i>	11
New Type of Gland Discovered in Cestodes: Neurosecretory Neurons Release a Secret into the Fish Host <i>N. M. Biserova, I. A. Kuttyrev, V. V. Malakhov</i>	16
Anatomy of Digestive System and Feeding Mechanism of <i>Quatuoralisia malakhovi</i> (Hemichordata, Torquaratoridae) <i>V. V. Malakhov, A. I. Lukinykh, O. V. Ezhova</i>	21
Nutrition of the Small Cave Bear (Mammalia, Carnivora, Ursidae, <i>Ursus (Spelaearctos) rossicus</i> Borissak, 1930) in the Urals According to the Results of the Analysis of ¹³ C and ¹⁵ N Isotopes in Bone Collagen <i>P. A. Kosintsev, K. Yu. Konovalova, G. V. Simonova</i>	26
Enhancing Human Glycoprotein Hormones Production in CHO Cells Using Heterologous Beta-chain Signal Peptides <i>M. V. Sinegubova, D. E. Kolesov, L. K. Dayanova, I. I. Vorobiev, N. A. Orlova</i>	31
Parameters Of Cell Death And Proliferation Of Prostate Cancer Cells With Altered Expression Of Myosin 1c Isoforms <i>E. S. Solomatina, E. N. Nishkomaeva, A. V. Kovaleva, A. V. Tvorogova, D. M. Potashnikova, A. A. Saidova</i>	36
TREX-2-ORC Complex of <i>D. melanogaster</i> Participates in Nuclear Export of Histone mRNA <i>M. M. Kurshakova, Y. A. Yakusheva, S. G. Georgieva</i>	44
Immunoliposomes as a Promising Antiviral Agent Against SARS-CoV-2 <i>T. V. Bobik, M. A. Simonova, N. U. Rushkevich, N. N. Kostin, G.A. Skryabin, V. D. Knorre, A. A. Schulga, E. V. Konovalova, G. M. Proshkina, A. G. Gabibov, S. M. Deev</i>	50
Study of the Role of Long Non-coding RNA <i>roX</i> in Maintaining of the Dosage Compensation Complex in <i>Drosophila melanogaster</i> <i>V. A. Babosha, P. G. Georgiev, O. G. Maksimenko</i>	56
HSPBP1 in Complex with the Peptide of the Innate Immunity Protein TAG7 is Able to Lyse Tumor Cells Carrying TNFR1 Receptor <i>E. A. Romanova, D. M. Yurkina, D. V. Yashin, L. P. Sashchenko, G. P. Georgiev</i>	60
Two Sources of Mesoderm in Brachiopods <i>T. V. Kuzmina, E. N. Temereva</i>	65

Direct Reprogramming of Somatic Skin Cells from a Patient with Huntington's Disease into Striatal Neurons to Create Models of Pathology	69
<i>N. A. Kraskovskaya, M. G. Khotin, A. N. Tomilin, N. A. Mikhailova</i>	
Metabolic Enzymes Activity in Smolts And Parrs of Atlantic Salmon (<i>Salmo Salar L</i>) Grown Under Different Light Regimes	74
<i>M. V. Kuznetsova, M. A. Rodin, N. S. Shulgina, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsin, S. A. Murzina, N. N. Nemova</i>	
Unexpected Find of a Buttonquail (Aves: Charadriiformes: Turnicidae) in the Lower Pleistocene of Crimea	81
<i>N. V. Zelenkov</i>	
Efficient Editing of the <i>CXCR4</i> Locus Using CAS9 Ribonucleoprotein Complexes Stabilized with Polyglutamic Acid	85
<i>D. S. Golubev, D. S. Komkov, M. V. Shepelev, D. V. Mazurov, N. A. Kruglova</i>	
Content of ¹³ C and ¹⁵ N Isotopes in Collagen of Bones of the Small Cave Bear (Mammalia, Carnivora, Ursidae, <i>Ursus (Spelaearctos) Rossicus</i> Borissiak, 1930) of Western Siberia	91
<i>P. A. Kosintsev</i>	
Neuronal and muscle differentiation of mammalian cells is accompanied by a change of PHF10 isoform expression	96
<i>D. O. Bayramova, A. M. Azieva, A. V. Feoktistov, S. G. Georgieva, N. V. Soshnikova</i>	
Melanophilin Polymorphism in Ferrets of Different Colors	101
<i>G. Yu. Kosovsky, V. I. Glazko, O. I. Abramov, T. T. Glazko</i>	
N ⁶ -(5-phenylpentan-1-yl)Adenine – a new Non-competitive Receptor-specific Anti-cytokinin	107
<i>A. A. Zenchenko, E. M. Savelieva, M. S. Drenichev, G. A. Romanov, V. E. Oslovsky</i>	
Contact inhibition of proliferation is accompanied by expression of the PHF10D subunit of the chromatin remodeling complex PBAF in mouse and human cell lines	111
<i>Yu. P. Simonov, V. V. Tatarskiy, S. G. Georgieva, N. V. Soshnikova</i>	

УДК 574.55:574.524

СООТНОШЕНИЕ ПРОДУКЦИЙ ФИТОПЛАНКТОНА, ГЕТЕРОТРОФНОГО ПЛАНКТОНА И ПЛАНКТОНОЯДНЫХ РЫБ В РАЗНОТИПНЫХ ВОДОЕМАХ

© 2024 г. В. В. Бульон

Представлено академиком РАН О.Н. Пугачевым

Поступило 11.08.2023 г.

После доработки 25.09.2023 г.

Принято к публикации 27.09.2023 г.

На примере 14 водоемов озерного типа, распределенных по разным широтам северного полушария, показано, что эффективность трансформации продукции фитопланктона через гетеротрофный бактериопланктон и нехищный зоопланктон к хищному зоопланктону и планктоноядным рыбам увеличивается в направлении от эвтрофных водоемов к олиготрофным. Наибольшие соотношения продукций автотрофных и гетеротрофных организмов выявлены для озер и водохранилищ, где вклад аллохтонных веществ в общий поток энергии относительно высок. Бактериопланктон, утилизирующий аллохтонное РОВ, – дополнительный источник энергии для зоопланктона, который, в свою очередь, служит пищевым объектом для планктоноядных рыб. Следовательно, для прогнозирования общей биологической продуктивности и продукции рыбного сообщества надо учитывать продукцию не только автотрофного планктона, но и той части гетеротрофного бактериопланктона, которая специализируется на утилизации РОВ, поступающего в водоем извне.

Ключевые слова: озера и водохранилища, продукция фитопланктона, продукция гетеротрофных организмов, трансформация энергии

DOI: 10.31857/S2686738924010017, EDN: LAWNLW

Фитопланктон, гетеротрофный планктон (бактерии, нехищный и хищный зоопланктон) и планктоноядные рыбы – ключевой участок пищевой сети в водной экосистеме. Изменение трофического статуса водоема при воздействии внешних факторов влечет за собой перестройку не только биомассы и продукции гетеротрофных и автотрофных организмов, но и соотношений между ними [1–6]. Большинство гидробиологических исследований касаются взаимоотношений фитопланктона и гетеротрофного бактериопланктона, либо фитопланктона и зоопланктона, реже – зависимости продукции (улова) рыб от первичной продукции, но лишь спорадически исследуется вся линейка организменных отношений, от фитопланктона до рыб. По этой причине остается открытым вопрос, как изменяется эффективность трансформации продукции фитопланктона гетеротрофными организ-

мами с изменением трофического статуса водоема и объективно ли отражает этот показатель внутрисистемные процессы?

Для прояснения этого вопроса в статье анализируются материал по продукции фитопланктона ($P_{\text{фит}}$), гетеротрофного бактериопланктона ($P_{\text{бцп}}$), нехищного и хищного зоопланктона ($P_{\text{нзо}}$, $P_{\text{хзо}}$) и планктоноядных рыб ($P_{\text{пир}}$) для 14 водоемов озерного типа (табл. 1), распределенных по разным широтам северного полушария (от субарктики до экватора). Большая часть материала была взята из литературных источников [7–15]. Недостающие производные показатели были реконструированы с помощью масс-балансовой модели [8, 16], базирующейся на закономерных связях между биотическими и абиотическими элементами водной среды. Как показали выполненные нами ранее исследования [8], реконструированные значения продукций ключевых групп гидробионтов хорошо согласуются с эмпирическими данными. В частности, в данной статье реконструкции подверглись продукция бактериопланктона и зоопланктона в экваториальном озере Виктория и продукция зоопланктона и рыб

Зоологический институт РАН,
Санкт-Петербург, Россия
E-mail: vboulion@mail.ru

в бессточном озере Иссык-Куль. Необходимые для реконструкции географические, гидрологические и физико-химические показатели указаны в таблице 1. Так как биотические и абиотические факторы через систему соподчиненных связей формируют поток энергии от фотосинтезирующих организмов и редуцентов к консументам разного порядка, такой системный подход в сочетании с балансовым принципом позволяет проследить последовательность трансформации энергии первичной продукции (от бактерий до рыб).

Диапазон средних за вегетационный сезон биомасс и годовых величин продукции компонентов трофической сети водоемов приведены в табл. 2. В водах бореальной зоны значения продукции за вегетационный сезон приравнивались к годовым величинам. Обращает на себя внимание большой размах биомасс и продукции разных групп гидробионтов: соотношение максимальных и минимальных биомасс составляет от 10 до 40, продукций – от 30 до 120.

Регрессионный анализ материалов выявил (рис. 1) следующую зависимость продукции гетеротрофного бактериопланктона от продукции фитопланктона:

$$\log P_{\text{bcp}} = (0.517 \pm 0.269) + (0.653 \pm 0.103) \log P_{\text{php}}$$

или, после потенцирования:

$$P_{\text{bcp}} = 3.29 P_{\text{php}}^{0.653}, \quad R^2 = 0.77 \quad p < 0.0001. \quad (1)$$

Анализ зависимости продукции нехищного зоопланктона от продукции фитопланктона показал:

$$\log P_{\text{hzo}} = -(0.368 \pm 0.181) + (0.800 \pm 0.069) \log P_{\text{php}}$$

$$\text{или } P_{\text{hzo}} = 0.43 P_{\text{php}}^{0.80}, \quad R^2 = 0.92 \quad p < 0.0001. \quad (2)$$

Продукция хищного зоопланктона косвенным образом также зависит от продукции фитопланктона:

$$\log P_{\text{pzo}} = -(1.102 \pm 0.180) + (0.806 \pm 0.069) \log P_{\text{php}}$$

$$\text{или } P_{\text{pzo}} = 0.079 P_{\text{php}}^{0.81}, \quad R^2 = 0.92 \quad p < 0.0001. \quad (3)$$

Продукция планктоноядных рыб через ряд промежуточных трофических звеньев связана с продукцией фитопланктона следующим образом:

$$\log P_{\text{plf}} = -(1.707 \pm 0.175) + (0.806 \pm 0.067) \log P_{\text{php}}$$

$$P_{\text{plf}} = 0.020 P_{\text{php}}^{0.80}, \quad R^2 = 0.91 \quad p < 0.0001. \quad (4)$$

Таблица 1. Географическая широта (Lat, °с.ш.) расположения водоемов, среднегодовая температура воздуха (Tem, °С) и годовая сумма осадков (Pre, мм) на водосборной площади, удельный водосбор (SDA), время пребывания воды в водоеме (T_w, годы), средняя глубина (D_{mean}, м), средняя за сезон концентрация в воде общего фосфора (TP, мкг/л), цветность (Pt, градусы) и прозрачность (Sec, м) воды, содержание хлорофилла *a* в планктоне (Chl, мкг/л)

Водоем	Lat	Tem	Pre	T _w	SDA	D _{mean}	TP	Pt	Sec	Chl
Богучанское вдхр.	58.4	-3.5	425	0.55	357	25	25	30	2	5.9
Зейское вдхр.	54.5	-3.1	525	4	35	38	15	75	1.9	2.5
Бурейское вдхр.	50.3	-3.5	690	0.38	94	14,5	10	75	2.1	2.0
Оз. Ханка	45	2	565	10	6.1	4,5	25	40	0.3	6.2
Рыбинское вдхр.	58	4	625	0.61	33	5,6	40	50	1.5	10
Онежское озеро	61.5	3	630	15.6	5.8	30	10	20	3.4	1.5
Ладожское озеро	60.6	3.7	610	11.7	14.5	47	20	23	2.4	4.6
Оз. Кривое ¹	66.5	0.5	523	9.1	4.2	12	5.3	25	3.7	0.90
Оз. Виктория	0	24	1300	20	2.5	40	45	20	1.8	14
Оз. Байкал	53.2	-2	562	377	18	730	10	5	4.9	2.0
Оз. Нарочь ²	55	6.4	515	11	3.5	9	15	15	3.8	1.5
Оз. Иссык-Куль	42.4	8.5	250	300	2.5	278	3.5	7	6.5	0.48
Оз. Красное ³	61	3.6	615	1.1	18.4	6.6	35	65	1.3	14
Оз. Зеленецкое ⁴	69.2	-4	250	10	5.0	8,5	3	40	3.9	0.42

Примечание: ¹ Северная Карелия, ² Беларусь, ³ Карельский перешеек, ⁴ Кольский п-ов.

Из регрессионных уравнений (1–4) были определены соотношения между продукционными показателями (рис. 2) и дана им статистическая оценка:

$$P_{\text{bcp}}/P_{\text{php}} = 3.29 P_{\text{php}}^{-0.347}, \quad R^2 = 0.49 \quad p = 0.003, \quad (5)$$

$$P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}} = 0.43 P_{\text{php}}^{-0.20}, \quad R^2 = 0.41 \quad p = 0.01, \quad (6)$$

$$P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}} = 0,079 P_{\text{php}}^{-0.19}, \quad R^2 = 0.40 \quad p = 0.01, \quad (7)$$

$$P_{\text{plf}}/P_{\text{php}} = 0,020 P_{\text{php}}^{-0.20}, \quad R^2 = 0.41 \quad p = 0,005. \quad (8)$$

Из уравнений (5–8) следует, что со снижением P_{php} от 3000 до 30 ккал/м² год отношение продукции бактерий к продукции фитопланктона ($P_{\text{bcp}}/P_{\text{php}}$) увеличивается от 0.2 до 1, отношение $P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}}$ – от 0.09 до 0.22, отношение $P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}}$ – от 0.017 до 0.041, отношение $P_{\text{plf}}/P_{\text{php}}$ от 0.004 до 0.01. Наибольшие соотношения выявлены для олиготрофных озер и Зейского и Бурейского водохранилищ, где вклад аллохтонных веществ в общий энергетический поток относительно высок.

Для 14 водных объектов были рассчитаны также среднеарифметические (со стандартными отклонениями) и медианные значения продукционных соотношений:

$$P_{\text{bcp}}/P_{\text{php}} = 0.50 \pm 0.35 \text{ при медиане } 0.37, \quad (9)$$

$$P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}} = 0.14 \pm 0.06 \text{ при медиане } 0.12, \quad (10)$$

$$P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}} = 0.027 \pm 0.011 \text{ при медиане } 0.023, \quad (11)$$

$$P_{\text{plf}}/P_{\text{php}} = 0.0066 \pm 0.0027 \text{ при медиане } 0.0057. \quad (12)$$

Из (9–12) можно сделать следующие выводы, имеющие общеэкологический интерес. При комбинации (9) и (10) получаем, что отношение $P_{\text{bcp}}/P_{\text{hzo}} = 0.50/0.14 = 3.57$. Если допустить, что вся продукция бактериопланктона входит в рацион нехищного зоопланктона, и принять его эффективность роста

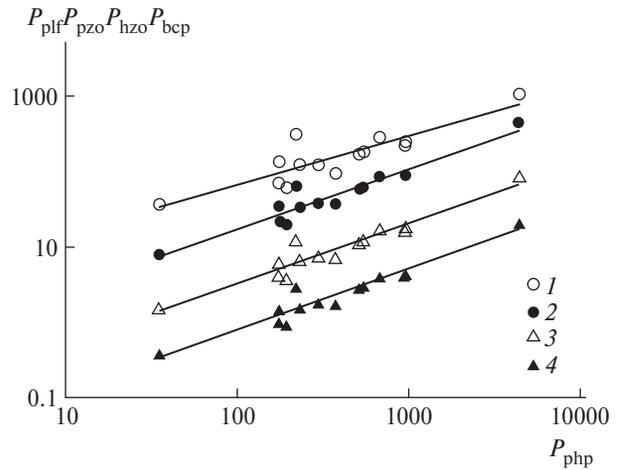


Рис. 1. Продукция бактериопланктона (1), нехищного (2) и хищного (3) зоопланктона, планктоноядных рыб (4) (P_{bcp} , P_{hzo} , P_{pzo} , P_{plf} , ккал/м² год) в зависимости от продукции фитопланктона (P_{php} , ккал/м² год) в озерах и водохранилищах разных регионов

(коэффициент K_1) равным 0.16, получаем: $3.57 \cdot 0.16 = 0.57$, т.е. ~57% рациона нехищного зоопланктона обеспечивается продукцией бактериопланктона и ~43% рациона – продукцией фитопланктона.

При комбинации (10) и (11) следует $P_{\text{pzo}}/P_{\text{hzo}} = 0.193$. Разделив это число на эффективность роста хищного зоопланктона ~0.35, находим, что рацион хищника составляет ~55% продукции нехищного зоопланктона. Проведя такую же процедуру с уравнениями (10) и (12), получаем $P_{\text{plf}}/P_{\text{hzo}} = 0.047$. Приняв эффективность роста планктоноядных рыб ~0.1, приходим к вполне ожидаемому выводу, что продукция нехищного зоопланктона почти в равных пропорциях входит в рацион хищного зоопланктона и планктоноядных рыб.

Таблица 2. Минимальные, средние, медианные и максимальные значения биомассы (ккал/м²) и продукции (ккал/м² год) компонентов планктона и планктоноядных рыб в разнотипных водоемах озерного типа

Параметры	Min	Mean	Median	Max
Средняя за сезон биомасса фитопланктона	0.91	11	7.0	41
Продукция фитопланктона	35	717	407	4430
Средняя за сезон биомасса бактериопланктона	0.72	3.1	3.0	7.5
Продукция бактериопланктона	37	233	177	1084
Средняя за сезон биомасса нехищного зоопланктона	0.77	4.7	4,5	16
Продукция нехищного зоопланктона	7.9	82	61	447
Средняя за сезон биомасса хищного зоопланктона	0.20	1.2	1.3	4.0
Продукция хищного зоопланктона	1.5	18	12	86
Средняя за сезон биомасса планктоноядных рыб	1.2	7,0	6.4	24
Продукция планктоноядных рыб	0.38	3.7	2.5	21

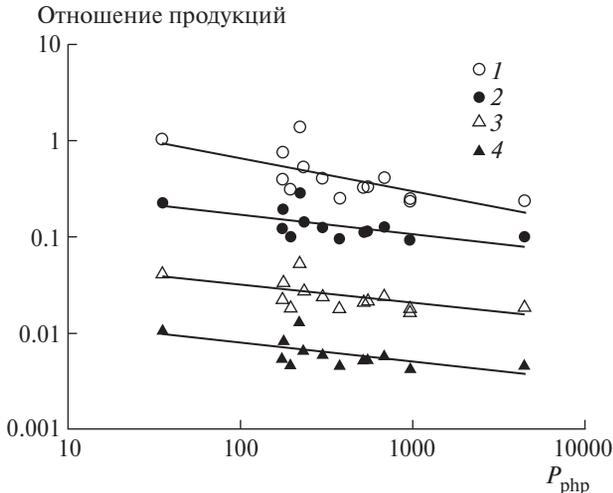


Рис. 2. Отношение $P_{\text{bcp}}/P_{\text{php}}$ (1), $P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}}$ (2), $P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}}$ (3) и $P_{\text{plf}}/P_{\text{php}}$ (4) в зависимости от величины P_{php}

По материалам Международной биологической программы [17] при существенном вкладе Советской секции мною были рассчитаны следующие уравнения регрессии:

$$P_{\text{bcp}} = 2.306 P_{\text{php}}^{0.711}, \quad R^2 = 0.840 \quad n = 11, \quad (13)$$

$$P_{\text{hzo}} = 0.397 P_{\text{php}}^{0.821}, \quad R^2 = 0.902 \quad n = 11, \quad (14)$$

$$P_{\text{pzo}} = 0.088 P_{\text{php}}^{0.740}, \quad R^2 = 0.613 \quad n = 11. \quad (15)$$

Уравнения (13–15) качественно не отличаются от уравнений (1–3): нижние коэффициенты близки по величине, показатели степени при $P_{\text{php}} < 1$. Это означает, что с ростом первичной продукции эффективность ее трансформации в гетеротрофную продукцию снижается. Речь, конечно, идет о видимой эффективности переноса энергии, т.к. мы в данном случае не учитываем участие аллохтонных веществ в общем энергетическом потоке.

Обращает на себя внимание факт сходства уравнения (4), связывающего продукцию планктоноядных рыб с продукцией фитопланктона, с уравнением, полученным для удобряемых рыбоводных прудов [18], в которых выращиваются нехищные виды и где улов рыб равен продукции рыб, т.к. практически вся продукция вылавливается:

$$P_{\text{plf}} = 0.019 P_{\text{php}}^{0.93 \pm 0.07}, \quad R^2 = 0,91 \quad n = 19. \quad (16)$$

Сходство обнаруживается только в нижних коэффициентах регрессий, но показатель степени в уравнении (16) в отличие от (4) приближается к 1. Это может быть объяснено тем, что продуктивность рыбоводных прудов характеризует их как эвтрофные и гиперэвтрофные системы при абсолютном доминировании автохтонного органического вещества.

М.Б. Иванова [1], анализируя литературные данные по годовым величинам P_{php} , P_{hzo} и P_{pzo} преимущественно для водоемов СССР ($n = 70$), приходит к выводу, что связь между этими показателями близка к линейной, т.к. показатель степени в уравнениях регрессий не отличается от 1. По ее расчетам, отношение $P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}}$ в среднем равно 0.102 при стандартной ошибке 0.016 и медиане 0.079, отношение $P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}} = 0.0155 \pm 0.0025$ (при медиане 0.010). Из-за большого разброса эмпирических данных коэффициенты вариаций средних превышает 100%. Несмотря на такую большую погрешность, средние значения $P_{\text{hzo}}/P_{\text{php}}$ и $P_{\text{pzo}}/P_{\text{php}}$ несущественно отличаются от (10) и (11).

Лакруа с соавторами [5] проанализировали в общей сложности 56 водоемов разной глубины и разного трофического статуса, расположенных в северном полушарии (от 0° до $74^\circ 42'$ с.ш.). Водоемы были поделены на две группы: мелкие ($D_{\text{mean}} < 6$ м, $D_{\text{max}} < 10$ м) и глубокие. Было отмечено, что отношение годовой продукции общего зоопланктона (P_{zpl}) к годовой продукции фитопланктона в мелких водоемах увеличивается от 0.07 ± 0.031 до 0.29 ± 0.044 в направлении от эвтрофных озер к ультраолиготрофным, в глубоких озерах снижение было менее выражено из-за отсутствия в этой группе эвтрофных объектов. В итоге было сделано заключение, что эффективность трансформации первичной продукции зоопланктоном следует рассматривать как убывающую функцию трофности водоема.

По [5], эффективность переноса первичной продукции в продукцию нехищного зоопланктона составляет 0.11 ± 0.02 , что статистически не отличается от формулы (10). Соотношение хищного и нехищного зоопланктона ($P_{\text{pzo}}/P_{\text{hzo}}$) в среднем составило 0.174 ± 0.027 , что очень близко к моему результату (0.191 ± 0.004). Как и ожидалось, соотношение $P_{\text{pzo}}/P_{\text{hzo}}$ не зависит от величины продукции фитопланктона.

Бактерии – важный компонент планктонного сообщества, связывающий растворенное органическое вещество разного генезиса с организмами трофической сети. Дериваты фитопланктона – один из источников РОВ для бактерий. Механизм возникновения дериватов может быть разным: хищничество, отмирание клеток водорослей, вирусный лизис и экскреция. Терригенное РОВ, включая гуминовые соединения, также участвует в метаболизме бактерий и биотическом потоке энергии в трофической сети.

В полигуменных и олиготрофных озерах и водохранилищах бореальной зоны, где дыхание гетеротрофного планктона превышает первичную продукцию, аллохтонное РОВ, трансформированное

в бактериальную продукцию, в значительной степени замещает продукцию фотосинтезирующих организмов в питании консументов. Вследствие этого отношения продукции гетеротрофного планктона и планктоноядных рыб к продукции фитопланктона, используемые для оценки эффективности переноса энергии в трофической сети, нередко получаются в разной степени завышенными.

Бактериопланктон, утилизирующий аллохтонное РОВ, – дополнительный источник энергии для зоопланктона, который, в свою очередь, служит пищевым объектом для планктоноядных рыб. Следовательно, для прогнозирования общей биологической продуктивности и продукции рыбного сообщества надо, как настаивал Г.Г. Винберг [19], учитывать продукцию не только автотрофного планктона, но и той части гетеротрофного бактериопланктона, которая специализируется на утилизации РОВ, поступающего в водоем извне. Ю.И. Сорокин [20] ввел для этого случая термин “продукция первопищи”, означающий продукцию фитопланктона в сумме с продукцией бактериопланктона за счет ассимиляции им аллохтонного РОВ.

В направлении от олиготрофных к эвтрофным водам продукция фитопланктона становится избыточной по отношению к продукции бактериопланктона, отношение $P_{\text{бцр}}/P_{\text{рп}}$ часто <1 . На гиперэвтрофном участке трофической шкалы возможно бактерицидное воздействие фитопланктона при массовом его развитии. В направлении олиготрофных вод продукция бактерий не обеспечивается первичной продукцией, отношение $P_{\text{бцр}}/P_{\text{рп}}$ часто >1 . Следовательно, в олиготрофных, как и в более продуктивных гумозных водах возрастает роль аллохтонного РОВ, «следы» которого прослеживаются не только в гетеротрофных бактериях, но и в последующих трофических звеньях – зоопланктоне и планктоноядных рыбах.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова М.Б. Продукция планктонных ракообразных. Л.: ЗИН АН СССР, 1985. 222 с.
2. Трифонова И.С., Афанасьева А.Л., Макарецва Е.С., Бардинский Д.С. Соотношение фито- и зоопланктона в разнотипных озерах Карельского перешейка // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. Т. 18. № 2 (2). С. 515–519.
3. Уманская М.В., Быкова С.В., Горбунов М.Ю., Краснова Е.С., Мухортова О.В., Сабитова Р.З., Тарасова Н.Г., Жариков В.В. Структура сообщества планктона озера Кандры-Куль летом 2010 и 2012 гг. // Известия Самарского научного центра РАН. 2018. Т. 20. № 2. С. 45–54.
4. Coveney M., Cronberg G., Enely M., Larsen K., Olofsson L. Phytoplankton, Zooplankton and Bacteria: Standing Crop and Production Relationships in a Eutrophic Lake // Oikos. 1977. V. 29. № 1. P. 5–21.
5. Lacroix G., Lescher-Moutoué F., Bertelo A. Biomass and production of plankton in shallow and deep lakes: are there general patterns? // Annales de Limnologie. 1999. V. 35. № 2. P. 111–122.
6. Havens K. E., Beaver J. R. Zooplankton to phytoplankton biomass ratios in shallow Florida lakes: an evaluation of seasonality and hypotheses about factors controlling variability // Hydrobiologia. 2013. V. 703. № 1. P. 177–187.
7. Бондаренко Н.А., Русанов И.И., Черницына С.М., Шубенкова О.В., Захаренко А.С., Погодаева Т.В., Пименов Н.В., Земская Т.И. Структура и продукционный потенциал летнего фитопланктона озера Байкал в современный период // Водные ресурсы. 2022. Т. 49. № 1. С. 66–76.
8. Бульон В.В. Система оценки и прогнозирования биопроductивности экосистем озерного типа // Водные ресурсы. 2020. Т. 47. № 3. С. 302–311.
9. Гидробиологические исследования на реке Тюп и Тюпском заливе озера Иссык-Куль / под ред. Г.Г. Винберга. Л.: ЗИН АН СССР, 1977. 144 с.
10. Гидроэкологический мониторинг зоны влияния Бурейского гидроузла / под ред. С.Е. Сиротского. Хабаровск: ИВЭП ДВО РАН, 2007. 273 с.
11. Гидроэкологический мониторинг зоны влияния Зейского гидроузла / под ред. С.Е. Сиротского. Хабаровск: ИВЭП ДВО РАН, 2010. 354 с.
12. Многолетние изменения биологических сообществ мезотрофного озера в условиях климатических флуктуаций и эвтрофирования / под ред. И.С. Трифоновой. СПб: ЛЕМА. 246 с.
13. Nyamweya C.S., Nyaboke H.M., Aura C.M., Mwanjyi K.N., Mlaponi E., Odoli C.O., Njiru J.M. Lake Victoria's bounty: A case for riparian countries' blue economic investment // Frontiers in Environmental Science. 2022. P. 1–6.
14. Bootsma H.A., Hecky R.E. A comparative introduction to the biology and limnology of the African Great Lakes // Journal of Great Lakes Research. V. 29. Sup. 2. P. 3–18.
15. Darchambeau F., Sarmiento H., Descy J.-P. Primary production in a tropical large lake: The role of phytoplankton composition // Science of the Total Environment. 2014. V. 473–474. P. 178–188.
16. Håkanson L., Boulion V.V. The Lake Foodweb – modelling predation and abiotic/biotic interactions. Leiden: Backhuys Publishers, 2002. 344 p.
17. Productivity problems of freshwaters / ed. Z. Kajak, A. Hillbricht-Ilkowska. Warszawa-Krakow: Polish Scientific Publishers, 1972. 918 с.
18. Бульон В.В. Первичная продукция и рыбопродуктивность: моделирование и прогноз // Биология внутренних вод. 2006. № 1. С. 48–56.

19. Биологическая продуктивность северных озер. 1. Озера Криво и Круглое / под ред. Г.Г. Винберга. Л.: Наука. 1975. 228 с.
20. Сорокин Ю.И. Первичная продукция морей и океанов // Общая экология. Биоценология. Гидробиология. Т. 1. М.: Наука, 1973. С. 7–46.

RELATIONSHIP BETWEEN PHYTOPLANKTON, HETEROTROPHIC PLANKTON, AND PLANKTIVOROUS FISH PRODUCTIONS IN DIFFERENT WATER BODIES

V. V. Boulion

Zoological Institute RAS, St. Petersburg, Russian Federation

E-mail: vboulion@mail.ru

Presented by Academician of the RAS O. N. Pugachov

On the example of 14 lake-type water bodies distributed over different latitudes of the northern hemisphere, it was shown that the efficiency of phytoplankton production transformation through heterotrophic bacterioplankton and non-predatory zooplankton to predatory zooplankton and planktivorous fish increases in the direction from eutrophic to oligotrophic water bodies. The highest ratios between autotrophic and heterotrophic organism production were found for lakes and reservoirs, where the contribution of allochthonous substances to the total energy flow is relatively high. Bacterioplankton utilizing allochthonous DOM is an additional source of energy for zooplankton, which, in turn, serves as a food object for planktivorous fish. Therefore, to predict the total biological productivity and production of the fish community, it is necessary to take into account the production of not only autotrophic plankton, but also that part of heterotrophic bacterioplankton that specializes in the utilization of DOM entering the water body from outside.

Keywords: lakes and reservoirs, phytoplankton production, production of heterotrophic organisms, energy transformation

УДК 581.1

ВЛИЯНИЕ СОЛЕННОСТИ СРЕДЫ НА РАЗМНОЖЕНИЕ И ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ МИКРОВОДОРОСЛИ *NITZSCHIA CF. THERMALOIDES*

© 2024 г. Н. С. Репкина^{1,*}, В. П. Воронин¹, О. И. Давидович²,
Н. А. Давидович², С. А. Мурзина^{1,**}

Представлено академиком РАН Н.Н. Немовой

Поступило 19.09.2023 г.

После доработки 05.10.2023 г.

Принято к публикации 06.10.2023 г.

Вид *Nitzschia cf. thermaloides* обнаружен в водоемах грязевых вулканов восточного Крыма. Установлено, что данный вид имеет широкие границы галотолерантности, в частности он способен к вегетативному размножению в пределах 0–110‰ солености среды. Впервые проанализировано влияние солености среды на жирнокислотный состав микроводоросли *Nitzschia cf. thermaloides*. Вне зависимости от солености, количественное и качественное содержание жирных кислот не изменялось, что свидетельствует о способности поддерживать стабильную уплотненную структуру мембраны, что, вероятно, отчасти обуславливает адаптацию данного вида к засолению. Состав жирных кислот преимущественно представлен насыщенными жирными кислотами, что позволяет рассматривать данный вид в качестве потенциально «полезного» объекта для биотехнологии в качестве источника насыщенных жирных кислот или альтернативного сырья для биотоплива.

Ключевые слова: микроводоросли, липиды, жирные кислоты, засоление, устойчивость

DOI: 10.31857/S2686738924010029, **EDN:** LATNFG

ВВЕДЕНИЕ

Микроводоросли способны синтезировать целый набор различных ценных макромолекул, таких как белки, липиды и другие биоактивные компоненты. В клетках микроводорослей идентифицирован широкий спектр полярных и нейтральных липидов [1]. Кроме того, в структуру их липидов

входят разнообразные жирнокислотные компоненты с насыщенными и ненасыщенными, линейными и разветвленными углеводородными цепями [2]. Повышенное внимание исследователей уже долгое время удерживают именно полиненасыщенные жирные кислоты (ЖК) с длинной цепью (C_n , где n более 20) ввиду их особой физиологической роли в организме, однако последние годы широко реализуются подходы анализа полного спектра ЖК и их соотношений, обсуждения их значимости и потенциала, в том числе в реализации адаптивных реакций живых систем. Учитывая возможность поддержания микроводорослей в культуре, синтез целевых компонентов, в том числе липидной природы, можно регулировать – усиливать/снижать за счет модификаций условий среды. Микроводоросли широко применяются в пищевой промышленности, фармакологии, косметологии, одним из отдельных направлений рассматриваются манипуляции с составом липидов и ЖК, как возможность получения требуемых композиций. Фундаментальная значимость изучения липидов и ЖК микроводорослей состоит в получении новых и дополнительных сведений о реализации эколого-биохимических меха-

¹ Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

² Карадагская научная станция им. Т.И. Вяземского – природный заповедник Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского Российской академии наук», Феодосия, Россия

*E-mail: nrt9@yandex.ru

**E-mail: murzina.svetlana@gmail.com

низмов адаптации живых систем в изменяющихся условиях среды.

Одноклеточные водоросли представлены шестью отделами, включая отдел Диатомовые (Bacillariophyta), отличительной особенностью которых является наличие кремнеземного панциря. Представители диатомовых водорослей доминируют в фитопланктоне количественно и по видовому разнообразию, являясь ключевым звеном пищевой цепи в водных экосистемах, а благодаря способности к фиксации CO_2 являются первичными продуцентами примерно 20% всего органического вещества планеты, играют значительную роль в биосфере, участвуя в биогеохимических циклах круговорота веществ [3]. Диатомовые водоросли в целом – космополиты, они обитают в соленых и пресных водоемах, почвах, а также во льду и термальных источниках [3, 4]. Учитывая их высокую адаптивную резистентность к широкому спектру изменяющихся условий, они представляют особый интерес для изучения механизмов адаптации не только водорослей, но и других живых организмов.

Работ, посвященных роли липидов и жирных кислот в механизмах и стратегиях адаптации диатомовых к изменениям разных факторов среды, крайне мало, и эти исследования проводились в периоды с широким временным разрывом. Большая часть исследований состава липидов и ЖК ограничивается определением содержания триацилглицеринов (ТАГ), депо среднецепочечных жирных кислот, и оценкой их структуры и состава, так как именно это показатель значим среди таковых при анализе сырья для производства биотоплива; высокое содержание ТАГ такой структуры делает биотопливо менее вязким [4].

Несмотря на то что диатомовые водоросли представлены огромным количеством видов и интерес к ним только растет, особенно последнее десятилетие, в настоящее время достаточно хорошо изучены (используются в качестве модельных объектов) всего лишь несколько видов, среди них центрическая *Thalassiosira pseudonana* Hasle & Heimdal и пеннатная *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin.

Целью данной работы явилось изучение влияния солености среды на воспроизводство и жирнокислотный состав микроводоросли *Nitzschia cf. thermaloides*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб проведен в районе грязевых вулканов Булганакского сопочного поля, Республика Крым. Выделенные клоновые культуры содержали в модифицированной питательной среде ESAW [5] с разным уровнем солености (0–110‰). Скорость размножения (делений в сутки) оценивали соглас-

но модели экспоненциального роста численности [6]. Далее 5 мл среды, содержащей клетки микроводоросли, осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 5 мин и сразу фиксировали в 10 мл смеси хлороформ–метанол (1:1). В работе были использованы материалы Научно-образовательного центра коллективного пользования ФИЦ ИнБЮМ «Коллекция диатомовых водорослей Мирового океана».

Экстракты общих липидов подвергали кислотному метилированию для придания свойств летучести жирным кислотам. Для определения состава полученной смеси метиловых эфиров жирных кислот (МЭЖК) проводили их разделение на ГХ с моноквадрольным масс-селективным детектором «Маэстро- α МС» (Сайтегра, Россия). Фракционирование осуществлялось в течение 32 мин при градиентном термостатировании ($t_{\text{нач}} = 140\text{ }^\circ\text{C}$ – удержание 5 мин; увеличение t со $140\text{ }^\circ\text{C}$ до $240\text{ }^\circ\text{C}$ со скоростью $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$; $t_{\text{кон}} = 240\text{ }^\circ\text{C}$ – удержание 2 мин) на капиллярной колонке HP-88 $60\text{ м} \times 0.25\text{ мм} \times 0,20\text{ мкм}$ (Agilent Technologies, США) с использованием гелия в качестве подвижной фазы. Детектирование МЭЖК осуществлялось в режиме SIM/SCAN: режим SIM – для регистрации ЖК, входящих в состав аналитических стандартов (Supelco 37, Sigma-Aldrich, США) по заданным значениям m/z ; режим SCAN – для поиска и идентификации уникальных ЖК компонентов в диапазоне $50\text{--}400\text{ }m/z$. Полученные данные анализировались с использованием ПО «Маэстро Аналитик v. 1.025» и библиотекой NIST. Количественный расчет ЖК проводили методом внешнего стандарта (градуировки) с использованием аналитической смеси Supelco 37 (Sigma-Aldrich, США) для построения калибровочной кривой. Аналитические исследования проведены на базе лаборатории экологической биохимии ИБ КарНЦ РАН и с использованием оборудования ЦКП КарНЦ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что *N. cf. thermaloides* выживает в широком диапазоне солености от 0 до 110‰. В частности, клоны *N. cf. thermaloides* продемонстрировали широкую толерантность в отношении солености. Клетки водоросли были способны вегетативно размножаться в среде с соленостью от 0 до 110‰. Процесс полового воспроизведения происходил в более узком диапазоне от 6 до 54‰ и оптимальная соленость для полового воспроизведения и вегетативного роста составляла 30‰ (табл. 1).

Так, например, в экспериментах показано, что *Nitzschia palea* (Kützinger) W. Smith [7], встречающаяся преимущественно в пресных водах, сохраняла жиз-

неспособность при заметном осолонении. В данном случае диапазон солёности, в котором поддерживалась репродуктивная способность, был уже (0–17‰), при этом наблюдали 100% гибель клеток в среде с солёностью 36‰, иными словами, можно ожидать, что *N. palea* выживет, например, при попадании в Чёрное море, однако океаническая солёность окажется для нее губительной. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с клонами этого вида, выделенными из европейской популяции [8].

Процессы деления водоросли *N. cf. thermaloides*, как в оптимальных условиях, так и при действии разной солёности среды, описаны впервые. Однако стоит отметить, что полученные данные свидетельствуют о достаточно широком диапазоне толерантности данного вида к изменению солёности.

Анализ жирных кислот, показал, что *N. cf. thermaloides* преимущественно содержит насыщенные жирные кислоты (НЖК) (табл. 2). Профиль НЖК в порядке убывания: 16:0, 18:0, 22:0, 20:0, 14:0, 15:0. При изменении солёности среды их качественный состав не меняется, а их количественное содержание слабо варьирует. Известно, что высокое содержание НЖК также характерно для некоторых видов диатомовых, в частности *Nitzschia* sp., *Nanofrustulum shiloi* (J.J. Lee, Reimer & McEnery) Round, Hallsteinsen & Paasche [9], *Phaeodactylum tricornutum* [10] и др.

Установлено, что у *N. cf. thermaloides* среди НЖК доминирует пальмитиновая кислота, 16:0, содержание которой в клетках наибольшее при солёности 110‰ и 50‰ и наименьшее при солёности в 20‰ (табл. 2). Наибольшее содержание 16:0 среди НЖК

Таблица 1. Темп деления (дел.·сут⁻¹) *Nitzschia cf. thermaloides* при разной солёности среды

Солёность, ‰	0	4	10	18	30	48	68	96	110
Темп делений, дел.·сут ⁻¹	0.10 ± 0.07	0.27 ± 0.16	0.14 ± 0.57	0.38 ± 0.15	0.72 ± 0.14	0.35 ± 0.07	0.12 ± 0.18	0.18 ± 0.28	0,30±0,25

В таблице представлены средние арифметические значения ± стандартные ошибки среднего

Таблица 2. Качественный и количественный профиль (мкг/мл) *Nitzschia cf. thermaloides*, при разной солёности среды (0–110‰)

Жирные кислоты и другие идентифицированные компоненты	Солёность среды, ‰				
	0	20	30	50	110
Миристиновая кислота, 14:0	6.54	6.23	6.47	6.61	6.65
Пентадекановая кислота, 15:0	3.5	3.46	3.49	3.49	3.49
Пальмитиновая кислота, 16:0	36.87	25.06	31.85	38.84	38.96
Стеариновая кислота, 18:0	21.78	15.8	19.48	22.94	22.94
Арахидиновая кислота, 20:0	8.67	8.6	8.65	8.66	8.66
Бегеновая кислота, 22:0	9.69	9.62	9.64	9.66	9.65
Олеиновая кислота, cis 18:1(n-9)	8.55	LPQ	8.27	8.47	LPQ
Пальмитоолеиновая кислота, cis16:1(n-9)	+		+	+	+
Эйкозеновая кислота, cis20:1(n-9)	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ
11-Эйкозеновая кислота, cis20:1(n-11)					+
Цитоолеиновая кислота, cis22:1(n-11)	+			+	+
Нервоновая кислота, cis24:1(n-9)	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ	LPQ
2,4-ди-трет-бутилфенол 2,4-DTBP	+	+	+	+	+
2-этоксиэтанол (этилцеллозолов) 2-ENMIP	+	+	+	+	+

“+” – идентифицированный компонент не рассчитан количественно в связи с его отсутствием в смеси Supelco37.

LPQ – концентрация ниже предела количественного определения

отмечено и у других видов *Nitzschia*, таких как *N. lecointei* Van Heurck [11] и *Nitzschia sp.* [12]. Известно также, что повышение содержания 16:0 у некоторых видов микроводорослей связывают с изменением концентрации металлов в среде [13]. На основании этого предполагается, что 16:0 участвует в процессах формирования рафтов в биомембране, а также в «заякоривании» мембраносвязанных белков в стресс-индуцированных условиях. Однако для подтверждения работы данного механизма адаптации необходимо проведение дальнейших исследований. Второй по количественному содержанию НЖК была стеариновая кислота, 18:0, динамика содержания которой в клетках была сходной с 16:0, а именно наименьшее содержание отмечено при солености 20‰, а ее повышение при 0, 50‰ и 110‰ (табл. 2). Доминирование этих двух ЖК отмечено и у *Nitzschia sp.* [12].

Сведения о влиянии солености на жирнокислотный состав представителей рода *Nitzschia* практически отсутствуют. Известно, что у *N. lecointei* при изменении солености среды состав жирных кислот изменяется незначительно и преимущественно представлен НЖК [11], что согласуется с полученными нами данными. Поддержание НЖК на высоком уровне отмечено у диатомовых при изменении минерального питания [9,10]. Известно, что реакция разных видов микроводорослей на засоление неоднозначна, однако преимущественно в этих условиях вне оптимальных значений, происходит увеличение содержания НЖК, что также обсуждается в обзоре Sajjadi et al 2018 [13]. Вероятно, компенсаторные перестройки в условиях стресса заключаются в повышении количества НЖК преимущественно за счет 16:0. Можно предположить, что поддержание «уплотненной» (ригидной) структуры биомембраны является одной из адаптивных реакций ввиду обеспечения избирательной проницаемости клетки и ее компартментов, поддерживающих их устойчивость к засолению и широкие границы толерантности.

Установлены следовые количества 2,4-ди-трет-бутилфенола (2,4-ДТБФ) и 2-этоксиэтанола (2-ЕНМФ) (табл. 2), вторичных метаболитов, обладающих аутоксичными свойствами. Регистрируемая детектором интенсивность этих веществ у исследуемого вида стабильно выше в некоторых образцах при 110‰, 50‰ и 20‰. Полученный результат может иметь особое значение для отслеживания реакции отдельных компонентов экосистемы в ответ на изменение условий среды (в частности солености).

В рамках настоящей работы установлено, что *N. cf. thermaloides* выживает в широком диапазоне солености от 0 до 110‰, при котором клетки водоросли способны вегетативно размножаться. При

этом половое воспроизведение наблюдалось в диапазоне от 6 до 54‰, а оптимальная соленость для полового размножения и вегетативного роста составляла 30‰. В ходе работы впервые был проанализирован состав жирных кислот микроводоросли *N. cf. thermaloides*. В исследуемом диапазоне солености среды жирнокислотный профиль представлен преимущественно насыщенными жирными кислотами. Наибольший процент от общего количества насыщенных жирных кислот приходится на пальмитиновую кислоту. Вероятно, низкая вариабельность жирнокислотного состава обеспечивает стабильное поддержание структуры мембраны в изменяющихся условиях и успешную адаптацию данного вида. Более того, *N. cf. thermaloides* может быть рекомендована для использования в биотехнологии в качестве источника насыщенных жирных кислот и потенциального кандидата для производства биотоплива, а учитывая следовые содержания соединений, обладающих аутоксичным действием, важен контроль ее распространения с точки зрения экотоксикологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания FMEN-2022-0006, FMEN-2023-0010, а также № 121032300019-0.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu Q., Li H., Xiao Y. et al. A state-of-the-art review on the synthetic mechanisms, production technologies, and practical application of polyunsaturated fatty acids from microalgae // *Algal Research*. 2021. V. 55. P. 102281.
2. Lopez P.J., Deslés J., Allen A.E., Bowler C. Prospects in diatom research. 2005. *Current Opinion in Biotechnology*. V. 16. P. 180–186.
3. Bhattacharjya R., Tiwari A., Marella T.K. et al. New paradigm in diatom omics and genetic manipulation // *Biores. Tech*. 2021. V. 325. P. 124708.
4. Jaramillo-Madrid A.C., Ashworth J., Fabris M., Ralph P.J. Phytosterol biosynthesis and production by diatoms (Bacillariophyceae) // *Phytochem*. 2019. V. 163. P. 46–57.
5. Полякова С.Л., Давидович О.И., Подунай Ю.А., Давидович Н.А. Модификация среды ESAW, используемой для культивирования морских диатомовых водорослей // *Морской биологический журнал*. 2018. Т. 3 (2). С. 73–78.
6. Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M. Measuring growth rates in microalgal cultures In: *Algal culturing techniques* / ed. by R.A. Andersen. Elsevier Academic Press, New York. 2005. P. 269–286.

7. Bagmet V.B., Abdullin Sh.R., Kuluev B.R. et al. The effect of salinity on the reproduction rate of *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith (Bacillariophyta) // Clones. 2017. V. 48. P. 223–225.
8. Trobajo R., Rovira L., Mann D.G., Cox E.J. Effects of salinity on growth and on valve morphology of five estuarine diatoms // Phycol. Res. 2011. V. 59. P. 83–90.
9. Sahin M.S., Khazi M.I., Demirel Z., Dalay M.C. Variation in growth, fucoxanthin, fatty acids profile and lipid content of marine diatoms *Nitzschia* sp. and *Nanofrustulum shiloi* in response to nitrogen and iron // Biocat. Agricult. Biotech. 2019. V. 17. P. 390–398.
10. Yodsuwan N., Sawayama S., Sirisansaneeyakul S. Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Agriculture and Natural Resources. 2017. V. 51. P. 190–197.
11. Tortensson A., Jiménez C., Nilsson A.K., Wulff A. Elevated temperature and decreased salinity both affect the biochemical composition of the Antarctic sea-ice diatom *Nitzschia leicoi*, but not increased pCO₂ // Polar Biol. 2019. V. 42. P. 2149–2164.
12. Al-Naimi S., Al-Muftan A., Das P. et al. Biocrude oil and high-value metabolite production potential of the *Nitzschia* sp. // Biomass Conver. Bioref. 2021.
13. Sajjadi B., Chen W-Y., Raman A.A.A. et al. Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition // Renew. Sustain. Energy Rev. 2018. V. 97. P. 200–232.

THE EFFECT OF SALINITY ON REPRODUCTION AND FATTY ACIDS PROFILE OF THE DIATOM MICROALGAE *NITZSCHIA* CF. *THERMALOIDES*

N. S. Repkina^{a,*}, V. P. Voronin^a, O. I. Davidovich^b, N. A. Davidovich^b, S. A. Murzina^{a,##}

^a*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation*

^b*T.I. Vyazemsky Karadag Scientific Station – Nature Reserve of the Russian Academy of Sciences –
Branch of A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of the Russian Academy of Sciences,
Feodosiya, Russian Federation*

^{*}*E-mail: nrt9@yandex.ru*

^{##}*E-mail: murzina.svetlana@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS N.N. Nemova

The *Nitzschia* cf. *thermaloides* was found in reservoirs of mud volcanoes in eastern Crimea. It was determined that this species has wide spectrum of halotolerance; in particular, it is capable of vegetative reproduction within the range of 0–110‰ salinity of the substrate. For the first time, the effect of salinity on the fatty acid composition of the microalga *Nitzschia* cf. *thermaloides* was studied. Regardless of salinity, the quantitative and qualitative content of fatty acids did not change, which indicates the ability to maintain a stable compacted membrane structure, which probably partly determines the adaptation of this species to salinity. The composition of fatty acids is mainly represented by saturated fatty acids, which allows us to consider this species as a potentially “useful” object for biotechnology as a source of saturated fatty acids or an alternative raw material for biofuel.

Keywords: microalgae, lipids, fatty acids, salinity, tolerance

УДК 592 + 57.04 + 591.48 + 591.14 + 576.8

НОВЫЙ ТИП ЖЕЛЕЗ ОБНАРУЖЕН У ЦЕСТОД: НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫЕ НЕЙРОНЫ ВЫДЕЛЯЮТ СЕКРЕТ В ОРГАНИЗМ ХОЗЯИНА-РЫБЫ

© 2024 г. Н. М. Бисерова^{1, *}, И. А. Кутырев², академик РАН В. В. Малахов¹

Поступило 05.08.2023 г.

После доработки 02.10.2023 г.

Принято к публикации 04.10.2023 г.

При исследовании ультраструктуры нервной системы у плероцеркоидов пяти видов цестод, паразитов рыб, в тегументе обнаружены свободные окончания периферических нейросекреторных нейронов, выделяющих медиаторы в хозяина. Экспериментально показано усиление секреции под воздействием сыворотки крови хозяина-рыбы. В организме цестод нейросекреторные нейроны (НН) образуют контакты паракринового типа вблизи мембран клеток фронтальных желез, тегумента и мышц, выполняя функцию эндокринных желез. Одновременно НН функционируют как экзокринные железы и выделяют наружу так называемые манипуляционные факторы, которые влияют на физиологию хозяина.

Ключевые слова: ленточные черви, нервная система, манипуляционные факторы, секретом, железы, экзокринная секреция, нейросекреция, паразито-хозяинные взаимодействия

DOI: 10.31857/S2686738924010039, EDN: LAGDLV

Цестоды (ленточные черви) – глубоко специализированные паразиты животных и человека. Питание паразитов происходит через синцитиальную покровную ткань – тегумент. Известно, что через тегумент паразиты выделяют сложную смесь экскреторно-секреторных продуктов, обобщенно называемых «секретомом» [1, 2, 3]. Тегумент пронизан терминальными отростками фронтальных желез и свободными нервными окончаниями, отделенными от мембраны тегумента системой специализированных контактов. Фронтальные железы описаны в сколке у представителей разных отрядов цестод, кроме циклофиллид [4–7]. Установлено, что фронтальные железы цестод осуществляют секрецию эккринным способом под контролем нейронов мозга [8]. Сенсорные нервные окончания, пронизывающие тегумент, характеризуются наличием рудиментарной реснички, базального тельца, корешка и других структур в расширенной части дендрита [9]. У ряда видов цестод обнаружены свободные окончания, не имеющие следов реснички, кинетосомы и корешка, но отделенных

системой специализированных контактов от мембраны тегумента [10–13]. Строение и функция таких окончаний остаются неизвестными.

Задача настоящей работы – изучить ультраструктуру свободных терминалей в тегументе у плероцеркоидов цестод с целью установления их происхождения и функционального значения.

Материалом для работы послужили плероцеркоиды пяти видов цестод, представителей отрядов *Diphyllobothriidea* и *Bothriocephallidea* (табл. 1).

Для ультраструктурных исследований использовали методы трансмиссионной электронной микроскопии, модифицированные для изучения цестод [8, 12, 13]. Для изучения изменения секреторной активности с поверхности свободных терминалей у *D. dendriticus* и *L. interrupta* были проведены эксперименты по разработанной ранее методике [3].

1. Ультраструктура свободных терминалей в тегументе.

В тегументе пяти видов плероцеркоидов мы обнаружили тонкие трубчатые свободные окончания, имеющие небольшое чашевидное дистальное расширение, содержащее везикулы (рис. 1). Везикулы выходят через поверхностную мембрану в полость поры в тегументе и затем во внешнюю среду – ткань хозяина. Мембрана чашевидных окончаний отделена от тегументальной мембраны узким кольцом септированного контакта, подостланного одним

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской Академии наук, Улан-Удэ, Россия

*E-mail: nbiserova@yandex.ru

слабо выраженным электронно-плотным опорным кольцом со стороны окончания. У всех изученных видов в окончаниях не было найдено ресничек, кинетосом и корешков; митохондрии отсутствовали как в чашевидном расширении, так и в базальной части отростка, связанного с перикарионом. Кроме того, чашевидные окончания у всех видов имели вдвое меньший диаметр апикального расширения (450–600 нм), по сравнению с типичными сенсорными окончаниями или с терминалями фронтальных желез.

У плероцеркоидов *T. nodulosus* каждое окончание соединено с поверхностью тела индивидуальной порой; они содержат светлые везикулы 100–120 нм и отдельные микротрубочки. У инкапсулированных в печени окуняя личинок эти терминали заполнены везикулами, выделяющимися на поверхность тегумента. В плероцеркоидах, извлеченных из капсулы хозяина, свободные чашевидные окончания обнаруживали пустыми, без пузырьков.

У плероцеркоидов *P. phocarum* чашевидные окончания встречаются как поодиночке, так и группами. В тегументе ботрии *P. phocarum* наблюдали от 5 до 6 тонких терминалей с плотными везикулами диаметром 90 нм, ответвляющихся от одного дендритного отростка и оканчивающихся в одну общую пору. Важно отметить, что чаша окончания может содержать или не содержать везикулы.

У плероцеркоида *D. ditremus* чашевидные окончания располагаются парами, содержат светлые округлые везикулы диаметром 100 нм и иногда элек-

тронноплотные везикулы 84 нм. Везикулы выделяются на поверхность тегумента через узкую пору.

У плероцеркоидов *D. dendriticus* по 2–3 чашевидных окончания с плотными везикулами диаметром 123 нм открываются в общую пору, связанную с внешней средой. Строение поры отличается от вышеописанных отсутствием микротрихий, уплотнением наружной мембраны тегумента и большим диаметром, достигающим 3 мкм. Как и у остальных изученных видов, терминали на апикальной поверхности имеют тонкое опорное кольцо и кольцевой септированный контакт, связывающий их с мембраной тегумента; содержат отдельные микротрубочки и везикулы.

У *L. alternans* чашевидные терминали обнаружены в тегументе сколекса и теле плероцеркоида. В одну пору в тегументе открывается по 4 терминали, содержат короткие микротрубочки и круглые плотные везикулы диаметром 90–94 нм, которые выделяются в полость поры (рис. 1в–д). В субтегументе широкие одиночные дендриты с круглыми электронноплотными везикулами при подходе к базальной мембране тегумента разветвляются на несколько свободных окончаний, открывающихся в общую пору в дистальной цитоплазме.

Таким образом, у всех изученных видов чашевидные окончания имеют сходное строение и выделяют в ткани хозяина секреторные везикулы размером 100–120 нм по типу экзокринных желез. В отличие от сенсорных окончаний в тегументе изученных цестод, чашевидные окончания отличает малый диа-

Таблица 1. Список исследованных видов

№	Вид паразита	Вид хозяина	Место вылова	Локализация в хозяине
1	<i>Triaenophorus nodulosus</i> (Pallas, 1781)	<i>Perca fluviatilis</i> Linnaeus, 1758	Рыбинское водохранилище	В печени в капсулах
2	<i>Pyromicocephalus phocarum</i> (Fabricius, 1780) Monticelli, 1890	<i>Gadus morhua marisalbi</i> Derjugin, 1920	Белое море, район ББС МГУ	В печени в капсулах
3	<i>Dibothriocephalus ditremus</i> (Creplin, 1825) Lühe, 1899	<i>Oncorhynchus nerka</i> (Walbaum, 1792)	оз. Кроноцкое, Камчатка	В капсулах на пищеводе, желудке, пилорических придатках
4	<i>Dibothriocephalus dendriticus</i> (Nitzsch, 1824) Lühe, 1899	<i>Coregonus migratorius</i> (Georgi, 1775)	Оз. Байкал, Кабанский район, Республика Бурятия	В капсулах на пищеводе, желудке, пилорических придатках
5	<i>Ligula alternans</i> (Rudolphi, 1810)	<i>Carassius gibelio</i> (Bloch, 1782) Linnaeus, 1758	Оз. Никиткино, Еравнинский район, Республика Бурятия	В брюшной полости

метр, одно слабо развитое опорное кольцо, выделение секреторных везикул на поверхность тегумента. От протоков фронтальных желез их отличает ультраструктура терминалей без периферических микротрубочек, а так же секреторный материал в виде маленьких везикул.

2. Ультраструктура нейросекреторных нейронов (рис. 1, б, е-з).

В области субтегумента и кортикальной паренхимы у всех изученных видов встречаются периферические нейросекреторные нейроны (НН). Тела НН имеют вытянутую неправильную форму с несколькими нейритами, заполненными круглыми электронноплотными нейросекреторными везикулами/гранулами (НСГ). Диаметр НСГ варьирует от 90 до 140 нм. Отростки НН не содержат митохондрий и периферических микротрубочек, в отличие от протоков фронтальных желез. В отличие от дендритов и аксонов нейронов ЦНС, цитоплазма

нейросекреторных отростков (НСО) плотная, гранулированная, содержит рибосомы. У *D. dendriticus* число НСО в зоне субтегумента составляет 9–10 шт. на 500 мкм².

Отростки НН часто проходят вдоль миофибрилл кольцевой и продольной мускулатуры покровов, иногда образуя зоны тесного сближения. В зоне контакта образуются небольшие варикозы, в которых, наряду с НСГ, встречаются скопления круглых светлых везикул. Выделение секреторного материала происходит паракриновым способом в межклеточное пространство рядом с миофибриллой. Пресинаптическое уплотнение и Т-образная складка мембраны, маркирующая синаптический контакт, отсутствуют.

Нами впервые обнаружено, что у всех изученных видов цестод отростки НН вступают в контакт с отростками клеток фронтальных желез, укрепленных периферическими микротрубочками. Диаметр НСГ

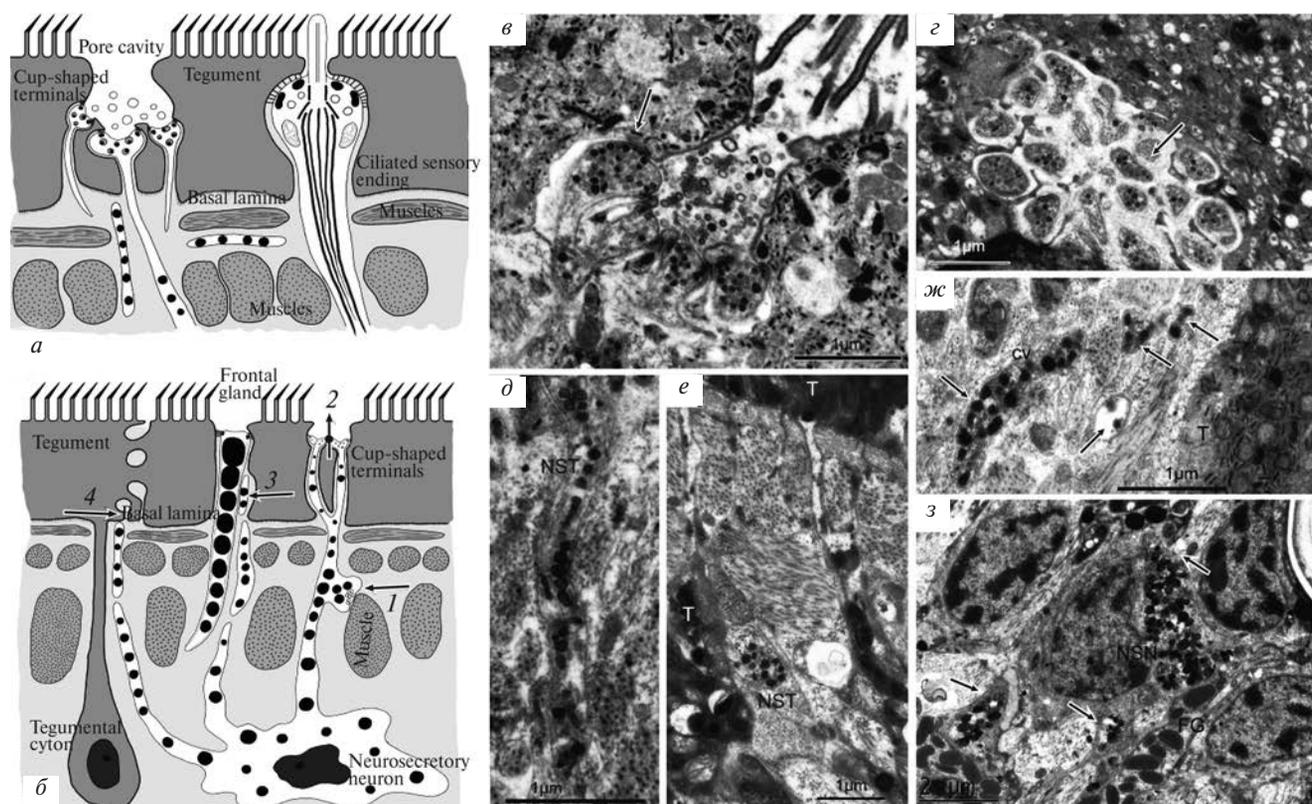


Рис. 1. Свободные терминали в тегументе и нейросекреторные нейроны (НН). а – схема строения ресничных и чашевидных окончаний нейронов в тегументе цестод. б – схема экзо- и эндокринной секреции периферическими НН: 1 – нейромышечный паракриновый контакт; 2 – экзокринная секреция на поверхность тегумента; 3 – контакт с фронтальными железами паракринового типа; 4 – выделение секрета в зоне базальной пластинки тегумента. в, з, д – *L. alternans*: группа чашевидных окончаний (стрелки) с секреторными везикулами в тегументе (в, з) и продольный срез (д) нейросекреторной терминали (NST), входящей в тегумент. е – *P. phocarum*: NST в контакте с тегументальным отростком (Т). ж – *D. dendriticus*: паракриновый контакт NST с мышцами под тегументом (стрелки); св, светлые везикулы. з – *P. phocarum*: нейросекреторный нейрон (NSN) в контакте с отростками фронтальных желез (FG) и мышцами (стрелки).

в зоне контакта составляет в среднем 140–160 нм. У плероцеркоидов *D. ditremus* контакты НСО с терминалями фронтальных желез выявлены непосредственно в терминальной поре секреторного протока в тегументе (рис. 1, б). В зоне контакта диаметр НСГ варьирует от 90 до 130 нм. Таким образом, отростки НН могут проникать в дистальную цитоплазму тегумента вместе с протоками фронтальных желез и высвобождать нейроактивные вещества в ткани хозяина. Вместе с тем у *P. phocarum*, *D. dendriticus*, *L. alternans* мы наблюдали НСО, которые пронизывают тегумент и содержат электронноплотные везикулы (90 нм), высвобождая секрет в полость поры. Чашевидные окончания в тегументе этих цестод являются отростками нейросекреторных нейронов. Таким образом, часть периферических НН выделяет секрет наружу в организм хозяина, выступая в роли экзокринных желез.

3. Эксперименты по изучению секреторной активности с использованием сыворотки крови хозяина.

Червей инкубировали в течение 3, 6, 12 и 24 ч. У *D. dendriticus* через 3 ч инкубации происходит истощение везикул в чашевидных окончаниях, уменьшение диаметра окончаний и увеличение диаметра гранул в НН. После 6 часов инкубации происходит увеличение секреции и числа окончаний в одной поре до 3–4 шт, после 12 ч инкубации наблюдаются признаки истощения и сужения чаши окончания, а после 24 ч инкубации наблюдаются деформации терминалей в тегументе. Таким образом, у *D. dendriticus* максимальную нейросекрецию наблюдали после 6 ч инкубации и истощение к 24 ч.

У *L. alternans* после 3 ч инкубации происходит усиление секреции с поверхности чашевидных окончаний, увеличение числа плотных везикул до 20 шт. в каждом окончании и числа НСО в зоне базальной пластинки и мускулатуры тегумента, где происходит высвобождение секрета паракриновым способом. После 6 ч инкубации продолжается интенсивная секреция везикул; увеличено число (4–5 шт.) и диаметр окончаний в поре. НСО многочисленны вблизи базальной пластинки и мышц тегумента, а базальная мембрана тегумента формирует многочисленные вакуоли, заполненные фибриллярным матриксом, которые перемещаются к апикальной мембране и выделяют содержимое наружу. После 24 ч инкубации диаметр окончаний уменьшается, но число НСО в зоне субтегумента и их наполненность гранулами увеличивается, при этом часть отростков направлена к базальной мембране. Таким образом, у *L. alternans* усиление секреции и числа НСО происходит, начиная с 3 ч инкубации, а адаптация к нагрузке – к 24 ч.

Свободные терминали без признаков цилиарного и корешкового аппарата описаны у некоторых видов цестод [6, 10–13]. У всех изученных видов они характеризуются вогнутой формой апикальной чаши с одним опорным кольцом, при этом, как следует из результатов настоящей работы, диаметр чаши в два и более раз меньше, чем у ресничных и безресничных сенсорных окончаний. Возникает вопрос, служат ли чашевидные свободные окончания в качестве чувствительных дендритов или связаны с нейросекрецией манипуляционных молекул в ткани хозяина? В сколексе разных видов цестод обнаружены две популяции НН, одна из которых связана с ЦНС, а другая с ПНС [8, 14–18]. Наши данные показали, что у пяти видов цестод НН, связанные с ПНС, имеют отростки, выделяющие секрет паракриновым способом в межклеточное пространство вблизи мембран мышечных клеток, клеток фронтальных желез, тегумента и на поверхности тегумента в ткани хозяина. Вопрос о наличии у цестод эндокринных желез является предметом дискуссии [15, 16]. По результатам нашего исследования, нейросекреторные нейроны ПНС цестод могут выполнять как функцию эндокринных желез, выделяя секрет в межклеточное пространство, так и функцию экзокринных желез, выделяющих секрет на поверхность тегумента. Увеличение секреции под воздействием сыворотки крови хозяина свидетельствует о важной экзосекреторной функции НН, которые представляют новый тип желез у цестод. Нейросекрет из свободных терминалей цестод, попадая в организм рыбы, может быть манипуляционным фактором, воздействующим на эндокринную систему позвоночного хозяина.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования проведены при поддержке Российского научного фонда, грант 23-24-00118.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berger C. S., Laroche J., Maaroufi H., et al. The parasite *Schistocephalus solidus* secretes proteins with putative host manipulation functions // *Parasites Vectors*. 2021. V. 14. P. 436.

2. Talarico M., Seifert F., Lange J., et al. Specific manipulation or systemic impairment? Behavioural changes of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus* // Behav. Ecol. Sociobiol. 2017. V. 71. P. 1–10.
3. Kutyrev I.A., Biserova N.M., Mazur O.E., et al. Experimental study of ultrastructural mechanisms and kinetics of tegumental secretion in cestodes parasitizing fish (Cestoda: Diphylobothriidea) // J. Fish Dis. 2021. V. 44 (8). P. 1237–1254.
4. Kuperman B.I., Davydov V.G. The fine structure of frontal glands in adult Cestodes // Int. J. Parasitol. 1982. V. 12 (4). P. 285–293.
5. McCullough J.S., Fairweather I. The fine structure and possible functions of scolex gland cells in *Trilocularia acanthiaevulgaris* (Cestoda, Tetraphyllidea) // Parasitol. Res. 1989. V. 75. P. 575–582.
6. Brunanská M., Fagerholm H.P., Gustafsson M.K.S. Ultrastructure studies of *Proteocephalus longicollis* (Cestoda, Proteocephalidea): transmission electron microscopy of scolex glands // Parasitol. Res. 2000. V. 86. P. 717–723.
7. Mustafina A.R., Biserova N.M. *Pyramicocephalus phocarum* (Cestoda: Diphylobothriidea): the ultrastructure of the tegument, glands, and sensory organs // Invertebrate Zoology. 2017. V. 14 (2). P. 154–161.
8. Biserova N.M., Mustafina A.R., Raikova O.I. The neuroglandular brain of the *Pyramicocephalus phocarum* plerocercoid (Cestoda, Diphylobothriidea): immunocytochemical and ultrastructural study // Zoology (Jena). 2022. V. 152. P. 1–17.
9. Webb R.A., Davey K.G. Ciliated sensory receptors of the unactivated metacestode of *Hymenolepis microstoma* // Tissue and Cell. 1974. V. 6 (4). P. 587–598.
10. Fairweather I., Threadgold L.T. *Hymenolepis nana*: the fine structure of the adult nervous system // Parasitology. 1983. V. 86 (1). P. 89–103.
11. Okino T., Hatsushika R. Ultrastructure studies on the papillae and the nonciliated sensory receptors of adult *Spirometra erinacei* (Cestoda, Pseudophyllidea) // Parasitol. Res. 1994. V. 80. P. 454–458.
12. Biserova N.M., Gordeev I.I., Korneva J.V. Where are the sensory organs of *Nybelinia surmenicola* (Trypanorhyncha)? A comparative analysis with *Parachristianella* sp. and other trypanorhynchean cestodes // Parasitol. Res. 2016. V. 115. P. 131–141.
13. Kutyrev I.A., Biserova N.M., Olennikov D.N., et al. Prostaglandins E₂ and D₂-regulators of host immunity in the model parasite *Diphylobothrium dendriticum*: An immunocytochemical and biochemical study // Mol. Biochem. Parasitol. 2017. V. 212. P. 33–45.
14. Webb R.A. Evidence for neurosecretory cells in the cestode *Hymenolepis microstoma* // Can. J. Zool. 1977. V. 55 (10). P. 1726–1733.
15. Specian R.D., Lumsden R.D., Ubelaker J.E., et al. A unicellular endocrine gland in cestodes // J. Parasitol. 1979. V. 65 (4). P. 569–578.
16. Gustafsson M.K.S., Wikgren M.C. Release of neurosecretory material by protrusions of bounding membranes extending through the axolemma in *Diphylobothrium dendriticum* (Cestoda) // Cell Tissue Res. 1981. V. 220. P. 473–479.
17. Liu B., Wakuri H., Mutoh K., et al. Ultrastructural study of neurosecretory cells in the nervous system in the cestode (*Taenia hydatigena*) // Okajimas Folia Anat. Jpn. 1996. V. 73 (4). P. 195–204.
18. Terenina N.B., Poddubnaya L.G., Tolstenkov O.O., et al. An immunocytochemical, histochemical and ultrastructural study of the nervous system of the tapeworm *Cyathocephalus truncatus* (Cestoda, Spathebothriidea) // Parasitol. Res. 2009. V. 104. P. 267–275.

NEW TYPE OF GLAND DISCOVERED IN CESTODES: NEUROSECRETORY NEURONS RELEASE A SECRET INTO THE FISH HOST

N. M. Biserova^{a, *}, I. A. Kutyrev^b, Academician of the RAS V. V. Malakhov^a

^aLomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^bInstitute of General and Experimental Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Russian Federation

[#]E-mail: nbiserova@yandex.ru

In 5 species of cestode plerocercoids parasitizing fish, free endings of peripheral neurosecretory neurons were found in the tegument in the ultrastructural study. These free terminals secreted vesicles on the tegument surface and into the host body. An increase in secretion under the influence of the blood serum of a fish host has been experimentally shown. In the body of cestodes, neurosecretory neurons (NN) form paracrine-type contacts near the cell membranes of the frontal glands, tegument, and muscles, performing the function of endocrine glands. Simultaneously, NN function as exocrine glands and secrete so-called manipulative factors that influence the physiology of the host.

Keywords: tapeworms, nervous system, manipulation factors, secretome, glands, exocrine secretion, neurosecretion, parasite-host interactions

УДК 593.99

АНАТОМИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ И МЕХАНИЗМ ПИТАНИЯ *QUATUORALISIA MALAKHOVI* (HEMICHORDATA, TORQUARATORIDAE)

© 2024 г. Академик РАН В. В. Малахов, А. И. Лукиных, О. В. Ежова*

Поступило 11.09.2023 г.

После доработки 10.10.2023 г.

Принято к публикации 11.10.2023 г.

Проведено анатомическое исследование пищеварительной системы глубоководного кишечнодышащего *Quatuoralisia malakhovi*. Показано, что латеральные губы воротника свернуты таким образом, что образуют ресничную борозду, ведущую во внутренний канал, по которому собранные частицы детрита поступают в латеральные глоточные каналы. Размер отобранных частиц находится в диапазоне от 1–6 мкм до 100–200 мкм, что соответствует питанию остатками планктонных диатомовых водорослей. Указана роль фекального шнура как якоря, удерживающего на дне сильно обводненное желеобразное тело Torquaratoridae во время питания.

Ключевые слова: кишечнодышащие, глубоководные Enteropneusta, морфология, пищеварительный тракт, фекальные шнуры, Берингово море

DOI: 10.31857/S2686738924010042, **EDN:** LAAAXM

Начиная с 60-х годов прошлого века на фотографиях дна в разных районах Мирового океана на батимальных и абиссальных глубинах были отмечены загадочные структуры в виде правильных спиралей и синусоид [1]. Только в 2005 году стало понятным, что эти загадочные структуры представляют собой фекальные шнуры представителей новой группы глубоководных кишечнодышащих – семейства Torquaratoridae [2]. Как оказалось, Torquaratoridae – обильная видами группа, имеющая всеветное распространение [3–7]. Биология Torquaratoridae изучена слабо. В отличие от мелководных кишечнодышащих, торквараториды ведут не роющий, а эпибентосный образ жизни. Остается непонятным, каким образом Torquaratoridae отбирают из осадка частицы детрита. Цель настоящей работы – изучить анатомию пищеварительной системы и механизм питания *Quatuoralisia malakhovi* Ezhova et Lukinykh, 2022.

Материал для настоящей работы был собран 18 июня 2018 года в 82-м рейсе НИС “Академик М.А. Лаврентьев” в Командорской котловине Берингова моря (массив Вулканологов) при трале-

нии на станции LV 82–9 с координатами 55.3451–55.3466N, 167.2750–167.2752E в диапазоне глубин 1957–1933 м. Экземпляры *Q. malakhovi* были собраны с применением подводного телеуправляемого аппарата “Команч 18” и зафиксированы для гистологического исследования в 8%-ном растворе формалина, приготовленном на морской воде. Отмывка от фиксатора и дегидратация материала проводилась по стандартной методике в спиртах восходящей концентрации. Подготовленные для гистологического исследования фрагменты были залиты в парапластовые блоки и разложены с помощью микротомы Leica RM 2125 на серии гистологических срезов толщиной 10 мкм. Срезы были окрашены гематоксилином Караччи и спиртовым раствором эозина. Некоторые детали строения пищеварительной системы *Q. malakhovi* были изучены с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Материал для СЭМ был дегидратирован ацетоном по стандартной методике, высушен в критической точке с использованием CO₂ (HCP-2 Critical Point Dryer, Hitachi, 1980) и напылен смесью золото-палладий (EIKO IB-3 Ion Coater, 1980), после чего изучен с помощью СЭМ JSM-6380LA (JEOL, 2005).

Как и у всех полухордовых, тело *Q. malakhovi* разделяется на три отдела: хоботок, воротник и длинное туловище (рис. 1). Внешняя морфология *Q. malakhovi* детально описана в предыдущей публи-

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

*E-mail: olga_ejova@mail.ru

кации [8]. Рот *Q. malakhovi* находится на брюшной стороне между хоботом и воротником (рис. 2, *mo*). Воротник имеет симметричные ушковидные разрастания – латеральные воротниковые губы (рис. 1, 2, *lp*). Согласно прижизненным наблюдениям *in situ* *Q. malakhovi* ведет эпибентосный образ жизни, передвигаясь по поверхности осадка на уплощенной вентральной стороне. При этом концы латеральных воротниковых губ, погруженных в верхний слой осадка, оставляют хорошо различимые борозды (рис. 1, *fs*). Латеральные воротниковые губы, как и все тело *Q. malakhovi*, одеты ресничным покровным эпителием, имеющим в своем составе многочисленные одноклеточные слизистые железы [8]. Латеральные воротниковые губы свернуты таким образом, что вдоль передне-вентрального края губы проходит ресничная борозда (рис. 2, *cg*), ведущая во внутренний канал губы (рис. 2, *icl*). На поперечных срезах фиксированных экземпляров ресничная борозда вместе с внутренним каналом образуют характерный грибообразный контур (рис. 2, *l*). Ширина ресничной борозды колеблется на разных срезах от 0 до 200 мкм.

В туловище *Q. malakhovi* можно выделить три подотдела: бранхиогенитальный, печеночный и кишечный (рис. 2). Бранхиогенитальный подотдел несет симметричные ряды жаберных пор, которые скрыты завернутыми на дорсальную сторону латеральными крыльями. В пищеварительном тракте бранхиогенитальному подотделу соответствует

жаберная глотка (рис. 2, 2). У *Q. malakhovi* нет буккальной полости, и ротовое отверстие ведет непосредственно в жаберную глотку. Вдоль всего тела *Q. malakhovi* по брюшной стороне проходит мидвентральная борозда (рис. 2, *myf*). Она глубоко вдается внутрь тела, в результате чего на протяжении всего пищеварительного тракта проходит мидвентральный гребень, делящий полость глотки и последующих отделов кишечника на левую и правую половины (рис. 2, *mvr*).

Вдоль дорсальной стороны жаберной глотки тянутся два симметричных ряда жаберных щелей, разделенных жаберными перегородками. Первичные перегородки формируют дорсо-латеральные стенки жаберной глотки, а вторичные перегородки свободно свисают в полость жаберной глотки, почти достигая ее вентральной стенки (рис. 2, 2). Полость глотки подразделяется парабранхиальными гребнями (рис. 2, *pbr*) на центральную зону и два симметричных периферических глоточных канала (рис. 2, 2). Эпителий нижней стороны парабранхиальных гребней и гастродермис дна глотки сближены и на некоторых срезах соприкасаются, так что периферические глоточные каналы оказываются частично изолированными от центральной зоны глотки. В задней части глотки высота парабранхиальных гребней уменьшается, периферические глоточные каналы объединяются, формируя короткий пищевод, который переходит в печеночный отдел кишечника.

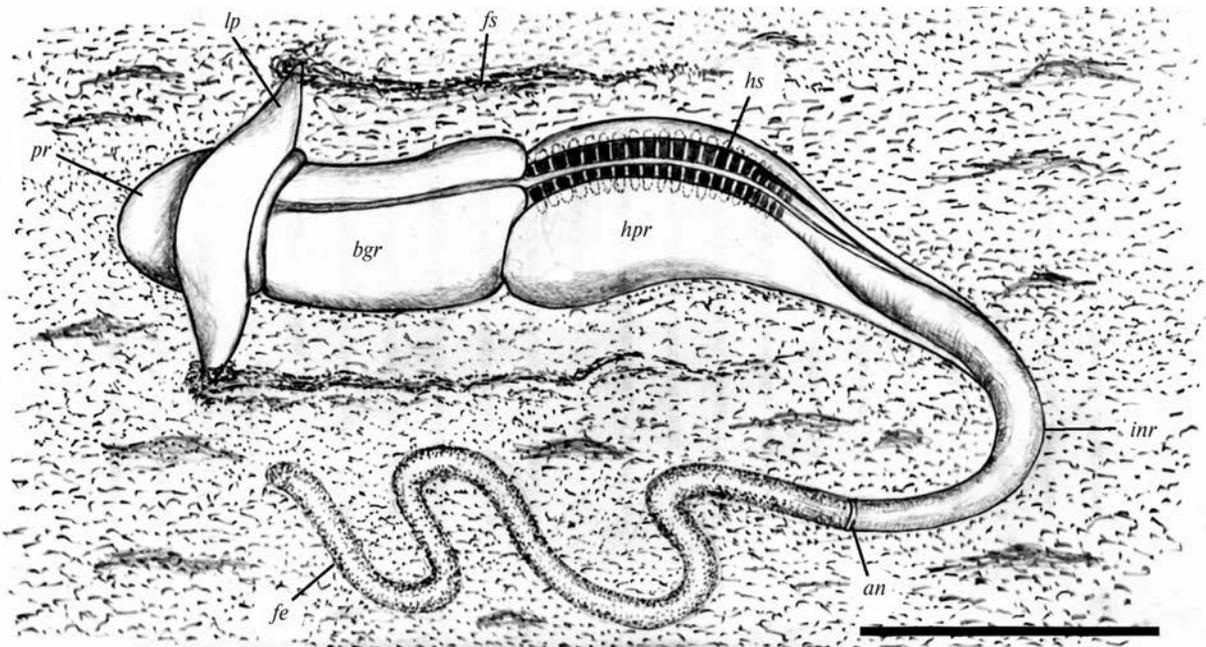


Рис. 1. Питающаяся *Quatuoralisia malakhovi* на поверхности осадка; рисунок на основе подводных фотографий. Масштаб: 5 см. *an* – анус; *bgr* – бранхиогенитальный подотдел туловища; *fe* – фекальный шнур; *fs* – борозды в осадке, оставляемые латеральными воротниковыми губами; *hpr* – печеночный подотдел туловища; *hs* – печеночные дивертикулы; *inr* – кишечный подотдел туловища; *lp* – латеральные воротниковые губы; *pr* – хобот.

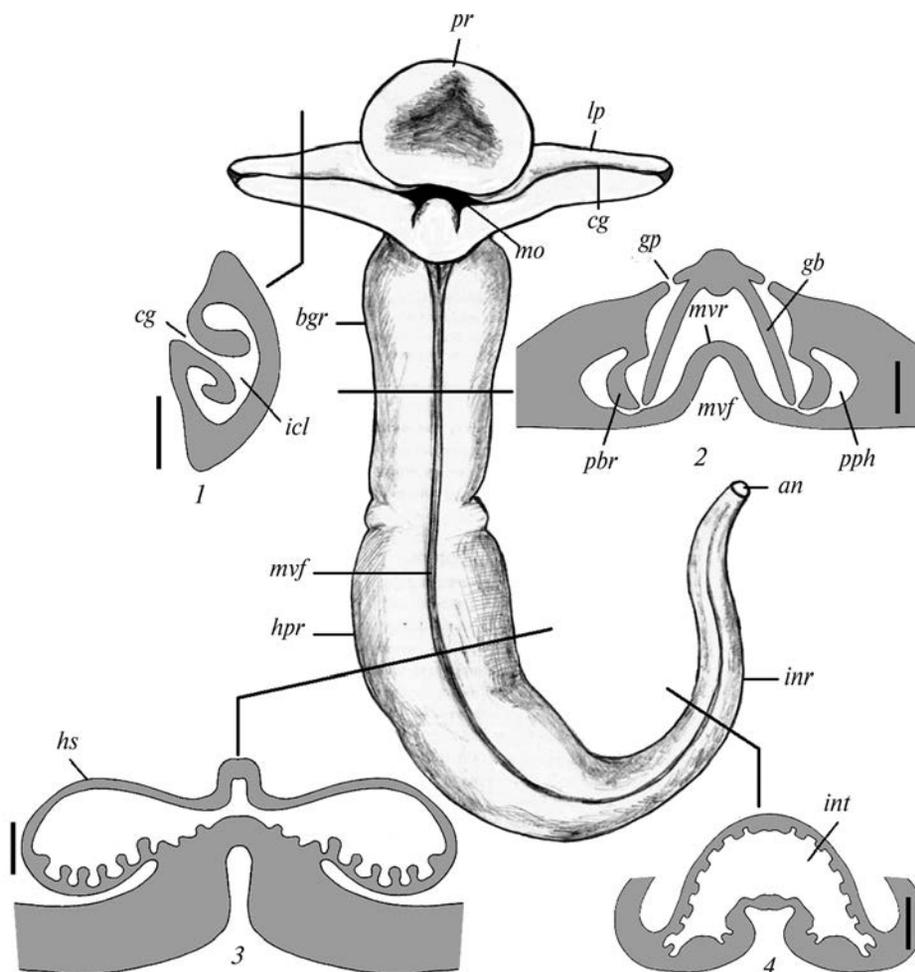


Рис. 2. Внешний вид *Quatuoralisia malakhovi* с вентральной стороны и схемы поперечных срезов на соответствующих уровнях (1 – через латеральную воротниковую губу, 2 – через бранхиогенитальный подотдел туловища, 3 – через печеночный подотдел туловища, 4 – через кишечный подотдел туловища). Масштаб: 1 мм. *cg* – ресничная борозда на латеральных воротниковых губах; *gb* – жаберные перегородки; *gp* – жаберные поры; *icl* – внутренний канал в латеральных воротниковых губах; *int* – кишка; *pph* – периферические глоточные каналы; *mo* – рот; *mvf* – мидвентральная борозда; *mvr* – мидвентральный гребень; *pbr* – парабранхиальные гребни. Остальные обозначения на рис. 1.

Печеночный подотдел туловища резко обособлен от бранхиогенитального поперечной бороздой на поверхности латеральных крыльев (рис. 1). Ему соответствует печеночный отдел пищеварительного тракта. На спинной стороне печеночного отдела располагаются метамерные печеночные дивертикулы буро-зеленого цвета (рис. 1, *hs*). В печеночные дивертикулы заходят симметричные выросты кишечника. Гастродермис вентральной стенки этих кишечных выростов образует многочисленные складки (рис. 2, 3).

Печеночный отдел пищеварительного тракта без резкой границы переходит в кишечный отдел (рис. 2, 4). Стенка кишечника складчатая (рис. 2, *int*) и способна сильно растягиваться. Как правило, полость кишечника заполнена фекальными массами, кото-

рые продолжают в плотный фекальный шнур, тянущийся за ползущим по дну животным (рис. 1, *fê*).

Большинство кишечноресничных – роющие животные. Многие из них заглатывают грунт, переваривая содержащийся в нем детрит и мелкие организмы. Другие виды имеют длинный хобот, который животные высовывают из норки и собирают частицы детрита за счет муко-цилиарного механизма. У таких форм на хоботке имеется дорсальная бороздка, по которой частицы детрита двигаются к основанию хобота и с помощью подковообразного ресничного органа транспортируются ко рту [9–11]. У *Torquaratoridae* хобот невелик, а ресничный орган у них отсутствует, зато развиты латеральные воротниковые губы, которые являются основным органом суспензионного питания. У *Q.*

malakhovi латеральные губы свернуты так, что по их вентральной поверхности, обращенной к осадку, проходит ресничная борозда, ведущая во внутренний ресничный канал. Подобные борозды можно видеть на латеральных губах других торквараторид [2–5]. При движении животного латеральные губы вспахивают поверхностный слой осадка, при этом мелкие частицы осадка загоняются биением ресничек губного покровного эпителия в борозду и по внутреннему ресничному каналу транспортируются ко рту. Кроме *Q. malakhovi* строение латеральных губ изучено на срезах только у *Yoda demiankooopi* [5]. Судя по срезам, у *Q. malakhovi* ширина ресничной борозды, через которую частицы детрита попадают во внутренний канал воротниковой губы, не превышает 200 мкм (см. выше). У *Y. demiankooopi* эта ширина также составляет около 200 мкм [5]. Именно эта ширина определяет верхний предел размера отбираемых частиц детрита.

У представителей семейств *Harrimaniidae* и *Ptychoderidae* в глотке имеются симметричные парабранхиальные гребни, расположенные в парафронтальной плоскости, которые подразделяют глотку на дорсальную дыхательную и вентральную пищеварительную части [12–14]. Глотка *Q. malakhovi* и других *Torquaratoridae* уплощена во фронтальной плоскости, и парабранхиальные гребни расположены в парасагиттальных плоскостях, в результате чего у них в глотке имеется не один вентральный, а два латеральных канала [3–5] – периферические глоточные каналы. Как можно предполагать, собранные латеральными воротниковыми губами частицы осадка поступают непосредственно в периферические каналы глотки.

Реснички на жаберных перегородках обеспечивают фильтрацию воды, выходящей через жаберные отверстия. Через жаберные щели *Balanoglossus gigas* не могут проходить частицы крупнее 1–2 мкм [11]. У *Harrimania planctophilis* верхний предел размера частиц, свободно проходящих через жаберные поры, составляет 5,8 мкм [15]. С учетом этого можно предположить, что размер частиц, отбираемых *Torquaratoridae*, лежит в диапазоне от 1–6 мкм до 100–200 мкм. В содержимом кишечника *Q. malakhovi* обнаружены преимущественно остатки планктонных диатомовых водорослей родов *Thalassiosira*, *Coscinodiscus*, *Actinocyclus*, *Chaetoceros* и других, которые укладываются в этот диапазон [16].

У многих представителей семейств *Spengelidae*, *Ptychoderidae* и *Torquaratoridae* дорсальная часть гастродермиса печеночного отдела формирует печеночные дивертикулы [2, 4, 13, 14]. Гастродермис кишечника в печеночном подотделе содержит многочисленные пищеварительные вакуоли, что свидетельствует об интенсивном внутриклеточном переваривании [17–19].

Склеенный слизью плотный фекальный шнур *Torquaratoridae* не разрушается после того, как выходит из ануса. Как видно на подводных фотографиях, длина спирального или причудливо извитого фекального шнура может в несколько раз превосходить длину самого червя [1–6]. При полном опорожнении кишечника торквараториды всплывают над дном и могут перемещаться благодаря подводным течениям [4, 6, 20]. Таким образом, фекальный шнур служит якорем, который удерживает сильно обводненное желеобразное тело *Torquaratoridae* на дне во время питания.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Национальному научному центру морской биологии им. А.В. Жирмунского (ННЦМБ) ДВО РАН за организацию и проведение 82 рейса НИС “Академик М.А. Лаврентьев”, а также ФАНО России за финансирование этой экспедиции. Особая благодарность пилотам и техникам, обеспечившим в рейсах работы с применением ТПА “Команч 18”. Материал для исследования передан музеем ННЦМБ ДВО РАН. Авторы глубоко признательны Е.М. Крыловой, С.В. Галкину и А.В. Гебруку (Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН) за любезное сопровождение материала для исследования. Авторы благодарны рецензенту представленной работы за ценные замечания и рекомендации. Все гистологические работы осуществлены в студенческой лаборатории эволюционной морфологии животных (www.evolmorph.ru) кафедры зоологии беспозвоночных биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Коллекции серий гистологических срезов хранятся там же. Исследование с помощью СЭМ осуществлено в ЦКП “Электронная микроскопия в науках о жизни” МГУ им. М.В. Ломоносова.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФ, соглашение 23-14-00047.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

У авторов нет финансовых или каких-либо иных конфликтов интересов. Все авторы прочли финальную версию рукописи.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bourne D. W., Heezen B. C. A Wandering enteropneust from the abyssal Pacific, and the distribution of “spiral” tracks on the sea floor // *Science*. 1965. V. 150. № 3692. P. 60–63.

2. Holland N. D., Clague D. A., Gordon D. P., et al. 'Lophenteropneust' hypothesis refuted by collection and photos of new deep-sea hemichordates // Nature. 2005. V. 434. P. 374–376.
3. Holland N. D., Jones W. J., Jacob E., et al. A new deep-sea species of epibenthic acorn worm (Hemichordata, Enteropneusta) // Zoosystema. 2009. V. 31. № 2. P. 333–346.
4. Holland N. D., Kuhnz L. A., Osborn K. J. Morphology of a new deep-sea acorn worm (class Enteropneusta, phylum Hemichordata): A part-time demersal drifter with externalized ovaries // J. Morph. 2012. V. 273. № 7. P. 661–671.
5. Holland N. D., Hiley A. S., Rouse G. W. A new species of deep-sea torquaratorid enteropneust (Hemichordata): A sequential hermaphrodite with exceptionally wide lips // Invert. Biol. 2022. V. 141. e12379.
6. Osborn K. J., Kuhnz L. A., Priede I. G., et al. Diversification of acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) revealed in the deep sea // Proc. Roy. Soc. (ser. B). 2012. V. 279. № 1733. P. 646–1654.
7. Priede I. G., Osborn K. J., Gebruk A. V., et al. Observations on torquaratorid acorn worms (Hemichordata, Enteropneusta) from the North Atlantic with descriptions of a new genus and three new species // Invert. Biol. 2012. V. 131. P. 244–257.
8. Ezhova O. V., Lukinykh A. I., Galkin S. V., et al. Deep-sea acorn worms (Enteropneusta) from the Bering Sea with the description of a new genus and a new species of Torquaratoridae dominating soft-bottom communities // Deep Sea Res. II. 2022. V. 195. P. 105014.
9. Barrington E. J. W. Observations on feeding and digestion in *Glossobalanus minutes* // Q. J. Microsc. Sci. 1940. V. 82. P. 227–260.
10. Burdon-Jones C. Observations on the enteropneust *Protoglossus koehleri* (Caullery & Mesnil) // Proc. Zool. Soc. London. 1956. V. 127. № 1. P. 35–58.
11. Burdon-Jones C. The feeding mechanism of *Balanoglossus gigas* // Bol. Fac. Filos. Cienc. Letr. Univ. S. Paulo. 1962. V. 24. № 261. P. 255–280.
12. Spengel J. Die Enteropneusten des Golfes von Neapel. Fauna und Flora des Golfes von Neapel und der angrenzenden Meeres-Abschnitte. Berlin: Herausgegeben von der Zoologischen Station zu Neapel. 1893. 756 S.
13. Horst van der C. J. Hemichordata. Bronn's Klass. Ordn. Tierreichs. 1939. Abt. 4. B. 4. № 2. P. 1–737.
14. Hyman L. H. The Invertebrates: small coelomate groups. New York: McGraw-Hill Book Co. 1959. V. 5. 783 p.
15. Cameron C. B. Particle retention and flow in the pharynx of the enteropneust worm *Harrimania planktophilus*: the filter feeding pharynx may have evolved prior to the chordates // Biol. Bull. (Woods Hole). 2002. V. 202. P. 192–200.
16. Ежова О. В., Трухан М. А., Лукиных А. И. и др. Особенности питания глубоководного кишечнодышащего (Hemichordata, Enteropneusta, Torquaratoridae) из Берингова моря // Доклады Российской Академии Наук. Науки о жизни. 2021. Т. 500. № 5. С. 432–436.
17. Benito J., Fernández I., Pardos F. Fine structure of the hepatic sacculations of *Glossobalanus minutes* (Enteropneusta, Hemichordata) // Acta Zool. (Stockh.). 1993. V. 74. P. 77–86.
18. Bridges T. S., Woodwick K. H. Comparative morphology and function of hepatic caeca in four enteropneusts // Acta Zool. (Stockholm). 1994. V. 75. № 4. P. 371–378.
19. Benito J., Pardos F. Hemichordata. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates. New York: WileyLiss Inc. 1997. V. 15. P. 15–101.
20. Smith K. L. J., Holland N. D., Ruhl H. A. Enteropneust production of spiral fecal trails on the deep-sea floor observed with time-lapse photography // Deep Sea Res. I. 2005. V. 52. P. 1228–1240.

ANATOMY OF DIGESTIVE SYSTEM AND FEEDING MECHANISM OF *QUATUORALISIA MALAKHOVI* (HEMICHORDATA, TORQUARATORIDAE)

Academician of the RAS V. V. Malakhov, A. I. Lukinykh, O. V. Ezhova[#]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]*E-mail: olga_ejova@mail.ru*

An anatomical study of the digestive system of the deep-sea enteropneust *Quatuoralisia malakhovi* was carried out. It is shown that the lateral collar lips are twisted in such a way that they form a ciliary groove leading to an internal channel through which the collected detritus particles are transferred to the peripheral pharyngeal channels. The size of the selected particles ranges from 1–6 μm to 100–200 μm, which corresponds to feeding on the remains of planktonic diatoms. The importance of the faecal cord as an anchor holding the heavily watered jelly-like body of Torquaratoridae at the sea floor during feeding is noted.

Keywords: acorn worms, deep-sea Enteropneusta, morphology, digestive tract, faecal cords, Bering sea

УДК 599.742.2: [591.471+591.13]: [550.424:546.027](470.5)

ПИТАНИЕ МАЛОГО ПЕЩЕРНОГО МЕДВЕДЯ (MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE, *URSUS (SPELAEARCTOS) ROSSICUS* BORISSAK, 1930) УРАЛА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА ИЗОТОПОВ ^{13}C И ^{15}N В КОЛЛАГЕНЕ КОСТЕЙ

© 2024 г. П. А. Косинцев^{1,*}, К. Ю. Коновалова¹, Г. В. Симонова²

Представлено академиком РАН В. В. Рожновым

Поступило 14.09.2023 г.

После доработки 24.10.2023 г.

Принято к публикации 27.10.2023 г.

Проведен анализ данных о содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей малого пещерного медведя (*Ursus (S.) rossicus* Borissak, 1930) из местонахождений Среднего и Южного Урала. Кости датируются межледниковьем (МИС 5) и ледниковьем (МИС 3). Изучены кости самцов и самок в возрасте 3 лет, 4 лет и старше 4 лет. Изучены половые, географические и хронологические различия в содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N . Показаны заметные половые, географические и хронологические различия между выборками. На Среднем Урале в межледниковье самки вели более хищный образ жизни, чем самцы, а при переходе к ледниковью у самцов и самок произошло сближение трофических ниш за счет увеличения растительности. Самцы в межледниковье на Южном Урале они вели более хищный образ жизни, чем на Среднем Урале. На Южном Урале при этом переходе масштаб изменений значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ соответствует масштабу различий между трофическими уровнями.

Ключевые слова: *Ursus rossicus*, малый пещерный медведь, поздний плейстоцен, Урал, стабильные изотопы, ^{13}C , ^{15}N , коллаген, питание

DOI: 10.31857/S2686738924010059, EDN: KVRAXU

Содержания изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене субфоссильных костей млекопитающих широко используется для изучения питания животных в прошлом [1, 2]. Для вымерших видов это основной метод реконструкции их питания [3]. Среди последних, один из самых больших массивов данных по содержанию изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей получен для больших пещерных медведей (*Ursus (Spelaearctos) spelaeus* s.l.) Западной и Центральной Европы [4, 5]. Данные о содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей малого пещерного медведя (*U. (S.) rossicus* Borissak, 1930) с территории Европы отсутствуют, а с территории Урала получены из одного местонахождения [6, 7].

Анализ морфологических данных и ядерной ДНК показал, что на Урале в позднем плейстоцене обитал малый пещерный медведь (*U. (S.) rossicus* Borissak, 1930), который морфологически и гене-

тически сильно отличается от больших пещерных медведей (*U. (S.) spelaeus* s.l.) [8, 9].

Получены данные о содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей скелета малого пещерного медведя из 8 новых местонахождений. На Среднем Урале это пещеры Махневская Ледяная (59°26'N 57°41'E), Двойная (59°06'N 57°31'E), Кизеловская (59°05'N 57°36'E), Виашер (59°05'N 57°37'E), Геологов 1 (58°46'N 57°43'E) и Динамитная (58°41'N 57°37'E). По составу фауны и палинологическим данным отложения пещеры Махневская Ледяная датируются оптимумом микулинского межледниковья (морская изотопная стадия (МИС) 5e, 130–115 тыс.л.н.) [10]. На основании данных о составе фауны, отложения пещеры Двойная датированы микулинским межледниковьем (МИС 5, 130–76 тыс.л.н.). По костям малого пещерного медведя из пещеры Кизеловская получены радиоуглеродные даты: > 48500 BP, no.?.; 46250 ± 700 BP, OxA-19565; 31870 ± 190 BP, OxA-16960; 36390 ± 270 BP, OxA-16964; 39040 ± 330 BP, OxA-19566; 35330 ± 220 BP, OxA-19561; 35110 ± 230 BP, OxA-19562; 34610 ± 230 BP, OxA-19567; 32940 ± 190 BP, OxA-19564; 32630 ± 180 BP, OxA-19563 [9, 11], что соответствует МИС 3 (57–29 тыс.л.н.). Выборки из пещер Виашер, Гео-

¹ Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

² Институт мониторинга климатических и экологических систем СО РАН, Томск, Россия

*E-mail: kpa@ipae.uran.ru

логов 1 и Динамитная по составу сопутствующей фауны датированы МИС 3 (57–29 тыс.л.н.).

На Южном Урале новые данные по изотопам получены по костям из 2 пещер: Барсучий Дол (55°09'N 57°15'E) и Сикияз-Тамак 22 (55°11'N 58°36'E). Отложения первой пещеры по составу фауны датированы оптимумом микулинского межледниковья [12], а второй – всем микулинским межледниковьем. Используются опубликованные данные по изотопам из пещеры Иманай (53°02'N, 56°26'E) [6, 7], отложения которой датируются МИС 3 [7]. Во всех пещерах накопление костей медведей происходило в результате гибели животных во время зимней спячки [13], то есть они относятся к одному тафономическому типу. Таким образом, на Среднем и Южном Урале имеются данные о содержании изотопов ¹³C и ¹⁵N в коллагене костей малого пещерного медведя для двух климатических периодов позднего плейстоцена – межледникового (МИС 5) и ледникового (МИС 3).

Для анализа взяты 4 черепа, 2 ребра, 2 плечевых, 1 лучевая, 1 локтевая, 7 бедренных и 14 больших берцовых костей. Определение пола и возраста особей, которым принадлежали кости, проведено на основании анализа их размеров, состояния эпифизов (приросли – не приросли) и зубной системы [14–17]. В выборках есть кости самцов и самок в возрасте

3+ и 4+ года (полузрелые, subadultus) и старше 4+ лет (взрослые, adultus) (табл. 1). Все особи являются половозрелыми и в дальнейшем рассматриваются как одна выборка. Каждая кость принадлежит отдельной особи. Опубликованные данные из пещеры Иманай приведены без указания пола [6, 7].

Определение изотопного состава углерода ($\delta^{13}\text{C}$) и азота ($\delta^{15}\text{N}$) в коллагене костей проведено методом изотопной масс-спектрометрии с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия), оснащенного элементным анализатором Flash 2000 (приборы предоставлены центром коллективного пользования ТомЦКП СО РАН) по стандартной методике. В качестве международного стандарта углерода принят «венский» эквивалент белемнита ReeDee формации (VPDB). В качестве международного стандарта азота принят газообразный N₂ атмосферного воздуха. Лабораторные рабочие газы сравнения CO₂ и N₂ калибровали по международному стандартному образцу МАГАТЭ – IAEA-600 Caffeine. Абсолютная погрешность измерений трех последовательных измерений анализируемых образцов для $\delta^{13}\text{C}$ не превышала $\pm 0.2\%$, а для $\delta^{15}\text{N}$ не превышала $\pm 0.4\%$.

Значения изотопного состава углерода и азота в коллагене костей малого пещерного медведя представлены в таблице 1.

Таблица 1. Значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей малого пещерного медведя (*U. (S.) rossicus*) Урала

Хронопериод	Пол ¹	n	$\delta^{13}\text{C}$, ‰			$\delta^{15}\text{N}$, ‰		
			Min	Max	M \pm sd	Min	Max	M \pm sd
Средний Урал								
МИС 5 130 – 76 т.л.н. ²	♂	4	-24,6	-22,6	-23.3 \pm 0.89	6.1	7.1	6.6 \pm 0.44
	♀	7	-23.9	-22.4	-22.9 \pm 0.51	5.8	10.1	7.6 \pm 1.37
	♂, ♀	11 ³	-24,6	-22,4	-23.1 \pm 0.66	5.8	10.1	7.3 \pm 1.20
МИС 3 57 – 29 т.л.н.	♂	8	-23.5	-22.5	-22.9 \pm 0.39	1.8	6.3	5.2 \pm 1.69
	♀	7	-24.3	-22.4	-23.2 \pm 0.63	3.1	8.3	5.4 \pm 2.01
	♂, ♀	15 ³	-24.3	-22.4	-23.1 \pm 0.51	1.8	8.3	5.3 \pm 1.78
Южный Урал								
МИС 5 130 – 76 т.л.н.	♂	4	-23.5	-22.3	-22.8 \pm 0.54	5.6	12.5	7,9 \pm 3.14
	♀	1	23.1			10.2		
	♂, ♀	5 ³	-23.5	-22.3	-22.9 \pm 0.48	5.6	12.5	8.4 \pm 2.90
МИС 3 57 – 29 т.л.н.	?	16 ⁴	-25.6	-19.3	-22.3 \pm 1.93	3.2	8.1	5.4 \pm 1.34
	?	5 ⁵	-20.8	-22.8	-21.3 \pm 0.46	3.1	8.8	4.9 \pm 2.32
	?	21 ³	-25.6	-19.3	-22.1 \pm 1.74	3.1	8.8	5.2 \pm 1.57

¹ ♂ – самцы, ♀ – самки, ? – пол не определен.

² т.л.н. – тысяч лет назад.

³ Объединенная выборка.

⁴ Силаев, Паршукова, Гимранов и др., 2020.

⁵ Gimranov, Bocherens, Kavcik-Graumann et al., 2022.

Задача работы – сравнение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей самок и самцов малого пещерного медведя в межледниковый и ледниковый периоды позднего плейстоцена на Среднем и Южном Урале.

Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в группах самцов и самок на Среднем Урале в межледниковье различаются на 0.6‰ и на 1.0‰, в ледниковье – на 0.3‰ и 0.2‰ соответственно (табл. 1). Различия средних значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ межледникового и ледникового времени между самцами составляют 0.4‰ и 1.4‰, между самками – 0.3‰ и 2.2‰. Между объединенными выборками самцов и самок в значениях $\delta^{13}\text{C}$ различий нет, а значения $\delta^{15}\text{N}$ различаются на 2.0‰. На Южном Урале различия значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ можно оценить только для объединенных выборок самцов и самок межледниковья и ледниковья (табл. 1). Эти различия составляют для $\delta^{13}\text{C}$ 0.8‰, для $\delta^{15}\text{N}$ – 3.2‰ (табл. 1). Географические различия значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в межледниковье между самцами Среднего и Южного Урала составляли 0.5‰ и 1.3‰, а между объединенными выборками самцов и самок – соответственно 0.2‰ и 1.1‰. В ледниковье различия значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ между объединенными выборками самцов и самок малого пещерного медведя Среднего и Южного Урала составляли соответственно 1.0‰ и 0.1‰.

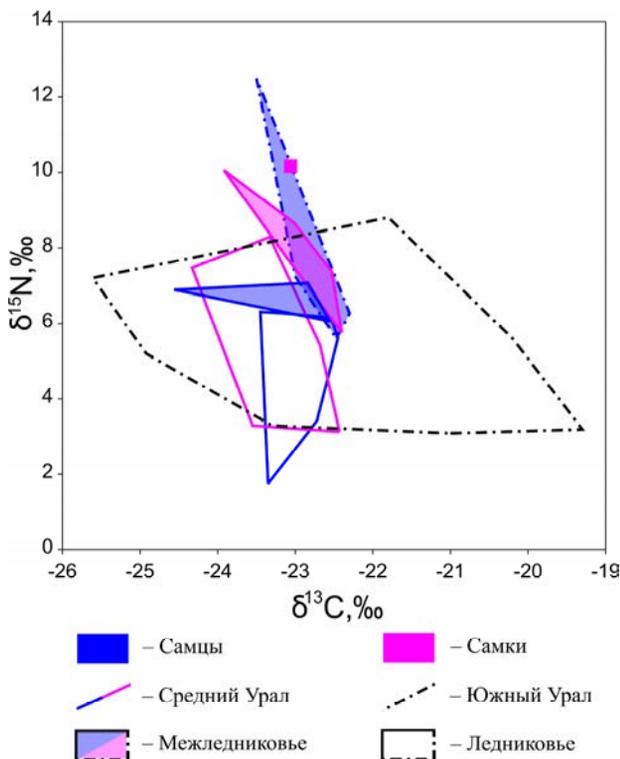


Рис. 1. Распределение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ (‰) в коллагене костей скелета самцов (синий цвет) и самок (розовый цвет) малого пещерного медведя (*U. S. rossicus*) Среднего и Южного Урала.

Различия значений $\delta^{13}\text{C}$ между всеми выборками относительно небольшие и не превышают 1.0‰. Различия значений $\delta^{15}\text{N}$ между выборками больше. Половые различия значений $\delta^{15}\text{N}$ в межледниковье и в ледниковье на Среднем Урале не превышают 1.0‰. Географические различия значений $\delta^{15}\text{N}$ между самцами в межледниковье составляют 1.3‰. Хронологические различия значений $\delta^{15}\text{N}$ между медведями межледникового и ледникового времени значительно больше. Они составляют от 1.4‰ между самцами на Среднем Урале до 3.2‰ между медведями Южного Урала (табл. 1).

Анализ распределения значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ показывает, что на Среднем Урале в межледниковье они почти не перекрываются у самцов и самок, а также у самок и самцов межледниковья и ледниковья (рис. 1). Практически не перекрываются значения распределений у самцов Среднего и Южного Урала в межледниковье. Распределения значений значительно перекрываются у самцов и самок Среднего Урала в ледниковье и они почти полностью лежат в области значений медведей Южного Урала в ледниковье (рис. 1). Следует отметить большое изменение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ у медведей Южного Урала в ледниковье, вследствие чего в их распределение попадает большинство значений для медведей Урала как ледниковья, так и межледниковья (рис. 1).

Отмеченные выше различия в распределении значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ указывают на различия в питании половых, хронологических и географических групп малого пещерного медведя на Урале. На Среднем Урале в межледниковье самки отличались от самцов большими значениями $\delta^{15}\text{N}$. В это же время самцы на Южном Урале имели более высокие значения $\delta^{15}\text{N}$, чем на Среднем (рис. 1). При переходе от межледниковья к ледниковью у самцов и самок на Среднем Урале уменьшаются значения $\delta^{15}\text{N}$. Это же наблюдается и у медведей на Южном Урале (рис. 1). Таким образом, половые, хронологические и географические изменения обусловлены главным образом изменением значений $\delta^{15}\text{N}$.

Величина $\delta^{15}\text{N}$ в основном определяется количеством потребляемых животным белков [18, 19], в данном случае, долей мяса в диете. Отмеченные выше особенности величин $\delta^{15}\text{N}$ в половых, хронологических и географических группах малого пещерного медведя на Урале отражают разную степень хищничества. В межледниковье на Среднем Урале самки вели более хищный образ жизни, чем самцы, а самцы на Южном Урале были большими хищниками, чем на Среднем Урале. При переходе к ледниковью, у медведей на Среднем и Южном Урале происходит трофический сдвиг в сторону большей растительности. На Среднем Урале трофический сдвиг произошел и у самцов и у самок.

Аналогичная тенденция прослеживается и на Южном Урале.

Различия средней величины $\delta^{13}\text{C}$ между половыми, хронологическими и географическими группами, как отмечено выше, не превышают 1.0‰. Различия средних значений $\delta^{15}\text{N}$ в большинстве случаев не превышают 2.2‰ и только в одном случае составляют 3.2‰ (табл. 1). Отнесение выборок к разным трофическим уровням предложено проводить при различиях значений $\delta^{13}\text{C}$ от 0 до 2‰ и значений $\delta^{15}\text{N}$ от 3 до 5‰ [3]. Различия средних значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ между объединенными выборками самцов и самок межледниковья и ледниковья на Южном Урале составляют 0.8‰ и 3.2‰ (табл. 1). Таким образом, различия между этими выборками соответствуют различию между разными трофическими уровнями. Возможно, при переходе от межледниковья к ледниковью популяция малого пещерного медведя Южного Урала перешла с высокого трофического уровня на более низкий трофический уровень.

Полученные данные по содержанию $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей малого пещерного медведя Среднего и Южного Урала показывают заметные половые, географические и хронологические различия между выборками. На Среднем Урале в межледниковье самки вели более хищный образ жизни, чем самцы, а при переходе к ледниковью у самцов и самок произошло сближение трофических ниш за счет увеличения растениеядности. У самцов в межледниковье наблюдаются географические различия в питании – на Южном Урале они вели более хищный образ жизни, чем на Среднем Урале. При переходе от межледниковья к ледниковью на Среднем и Южном Урале наблюдается общее направление изменений у самцов и самок – увеличение растениеядности. На Южном Урале при этом переходе масштаб изменений значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ соответствует масштабу различий между трофическими уровнями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность музею Института экологии растений и животных УрО РАН за предоставленные для исследования образцы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-01025.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. DeNiro M.J. Postmortem preservation and alteration of *in vivo* bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction // Nature. 1985. V. 317. № 31. P. 806–809.
2. DeNiro M.J., Epstein S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals // Geochimica et Cosmochimica Acta. 1978. V. 42. № 5. P. 495–506.
3. Bocherens H., Drucker D. Trophic level isotopic enrichment of carbon and nitrogen in bone collagen: case studies from recent and ancient terrestrial ecosystems // International J. of Osteoarchaeol. 2003. V. 13. № 1/2. P. 46–53.
4. Bocherens H. Isotopic insights on cave bear palaeodiet // Historical Biology. 2019. V. 31. № 4. P. 410–421.
5. Косинцев П. А., Симонова Г. В., Коновалова К. Ю. Первые данные о питании уральского пещерного медведя (Mammalia, Carnivora, Ursidae, *Ursus (spelaeartcos) kanivetz* Verestchagin, 1973) по результатам анализа изотопов ^{13}C и ^{15}N // Доклады Российской академии наук. Науки о жизни. 2023. Т. 510. № 1. С. 288–291.
6. Силаев В. И., Паршукова М. Н., Гимранов Д. О. и др. Минералого-геохимические особенности пещерной фоссилизации ископаемых костей на примере пещеры Иманай (Южный Урал) // Вестник Пермского университета. Геология. 2020. Т. 19. № 4. С. 323–358.
7. Gimranov D., Bocherens H., Kavcik-Graumann N. et al. The cave bears from Imanay Cave (Southern Urals, Russia) // Historical Biology. 2022. P. 1–9.
8. Vereschagin N., Baryshnikov G. Small cave bear *Ursus (Speleartcos) rossicus uralensis* from the Kizel Cave in the Ural (Russia) // Geoloski zborn. 2000. № 15. P. 53–66.
9. Barlow A., Pajmans J. L. A., Federica A., et al. Middle Pleistocene genome calibrates a revised evolutionary history of extinct cave bears // Current Biology. 2021. V. 31. № 8. P. 1771–1779.
10. Fadeeva T. V., Kosintsev P. A., Lapteva E. G. et al. Makhnevskaya Ledyanaya Cave (Middle Urals, Russia): Biostratigraphical reconstruction // Quaternary International. 2020. V. 546. P. 135–151.
11. Pacher M., Stuart A. J. Extinction chronology and palaeobiology of the cave bear (*Ursus spelaeus*) // Boreas. 2008 V. 38. P. 189–206.
12. Kosintsev P. A., Yakovlev A. G., Plasteeva N. A., et al. Mammalian fauna of the late pleistocene from the Barsuchiy Dol cave (Southern Urals) // Russian Journal of Theriology. 2022. V. 21. № 2. P. 180–191.
13. Гимранов Д. О., Косинцев П. А. Пещерные медведи (*Ursus spelaeus sensu lato*) Урала // Палеонтологический журнал. 2022. № 1. С. 97–106.
14. Воробьев А. А. Размеры длинных трубчатых костей большого пещерного медведя Среднего Урала // Современные проблемы популяционной, исторической и прикладной экологии: Материалы конференции молодых ученых; 23–27 апреля 2001. Екатеринбург, 2001. С. 38–41.
15. Воробьев А. А. Этапы постнатального онтогенеза скелета большого пещерного медведя // Биота горных

- территорий: История и соврем. состояние: Материалы конференции молодых ученых; 15–19 апреля 2002 г. Екатеринбург: Академкнига, 2002. С. 22–28.
16. Косинцев П.А., Воробьев А.А. Биология большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus* Ros. et Hein.) на Урале // Мамонт и его окружение: 200 лет изучения / под ред. Ю.А. Розанова. М.: Геос, 2001. С. 266–278.
 17. Fosse P., Cregut-Bonnoure E. Ontogeny/growth of (sub) modern brown bear (*Ursus arctos*) skeleton: A guideline to appraise seasonality for cave bear (*Ursus spelaeus*) sites? // Quaternary International. 2014. V. 339–340. P. 275–288
 18. Chisholm B.S. Variation in Diet Reconstructions Based on Stable Carbon Isotopic Evidence // The Chemistry of Prehistoric Human Bone. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. P. 10–37.
 19. Bocherens H., Billiou D., Patou-Mathis M., Bonjean D., Otte M., Mariotti A. Paleobiological implications of the isotopic signatures (^{13}C , ^{15}N) of fossil mammal collagen in Scladina Cave [Sclayn, Belgium] // Quaternary Research. 1997. V. 48. № 3. P. 370–380.

NUTRITION OF THE SMALL CAVE BEAR (MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE, *URSUS (SPELAEARCTOS) ROSSICUS* Borissak, 1930) IN THE URALS ACCORDING TO THE RESULTS OF THE ANALYSIS OF ^{13}C AND ^{15}N ISOTOPES IN BONE COLLAGEN

P. A. Kosintsev^{a, #}, K. Yu. Konovalova^{a, b}, G. V. Simonova^b

^a*Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation*

^b*Institute of Monitoring of Climatic and Ecological Systems Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

[#]*E-mail: kpa@ipae.uran.ru*

Presented by Academician of the RAS V.V. Rozhnov

An analysis of data on the content of ^{13}C and ^{15}N isotopes in the collagen of the bones of the small cave bear (*Ursus (S.) rossicus* Borissak, 1930) from localities in the Middle and Southern Urals was carried out. The bones date from the Interglacial (MIS 5) and Glacial (MIS 3) periods. The bones of males and females aged 3 years, 4 years and older than 4 years were studied. Sexual, geographical and chronological differences in the content of ^{13}C and ^{15}N isotopes were studied. Notable gender, geographic, and chronological differences between samples are shown. In the Middle Urals, during the interglacial period, females led a more predatory lifestyle than males, and during the transition to the glacial period, the trophic niches of males and females converged due to an increase in herbivory. During the interglacial period in the Southern Urals, males led a more predatory lifestyle than in the Middle Urals. In the Southern Urals, during this transition, the scale of changes in $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ values corresponds to the scale of differences between trophic levels.

Keywords: *Ursus rossicus*, small cave bear, Late Pleistocene, Ural, stable isotope, ^{13}C , ^{15}N , collagen, nutrition

УДК 602.6

УВЕЛИЧЕНИЕ ПРОДУКЦИИ ГЛИКОПРОТЕИНОВЫХ ГОРМОНОВ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ СНО ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ БЕТА-ЦЕПЕЙ

© 2024 г. М. В. Синегубова*, Д. Э. Колесов, Л. К. Даянова,
И. И. Воробьев, Н. А. Орлова

Представлено академиком РАН В.О. Поповым

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 13.10.2023 г.

Принято к публикации 13.10.2023 г.

Исследовано влияние гетерологичных сигнальных пептидов у β -цепей гликопротеиновых гормонов на биосинтез данных гормонов в транзистентно трансфицированной культуре клеток яичника китайского хомячка СНО S. При замене природных сигнальных пептидов β -цепей на гетерологичный сигнальный пептид человеческого сывороточного альбумина продуктивность клеток была увеличена в 2–2.5 раза для лютеинизирующего гормона человека, хорионического гонадотропина человека, тиреотропного гормона человека, но не фолликулостимулирующего гормона человека. Для сигнального пептида азуроцидина человека и сигнального пептида α -цепи гликопротеиновых гормонов человека не наблюдалось достоверного увеличения продуктивности клеток. Использованный подход позволяет быстро оценивать влияние гетерологичных сигнальных пептидов на биосинтез гетеродимерных белков различных классов.

Ключевые слова: гликопротеиновые гормоны, сигнальные пептиды, клетки яичника китайского хомячка, транзистентная экспрессия

DOI: 10.31857/S2686738924010067, EDN: KUZBCS

Семейство гликопротеиновых гормонов млекопитающих включает в себя несколько аденогипофизарных гормонов, в том числе тиреотропный гормон (ТТГ), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), используемых в медицинских целях, а также хорионический гонадотропин человека (ХГч), вырабатываемый преимущественно плацентой. Все гликопротеиновые гормоны состоят из двух гликозилированных субъединиц – α (общей для всего семейства) и β (специфической) – и оказывают свое физиологическое действие только в виде гетеродимера.

Превращение пре- α и пре- β -субъединиц, содержащих сигнальные последовательности, в их зрелые формы включает два события: отщепление сигнального пептида (происходит котрансляционно [1]) и гликозилирование (происходит как ко-, так

и посттрансляционно [2]). Свертывание и сборка субъединиц гормона происходят в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Для ЛГ было прямо продемонстрировано, что сворачивание β -субъединицы требует обязательного присутствия в эндоплазматическом ретикулуме α -субъединицы, которая действует как шаперон [3]. Весьма вероятно, что все гликопротеиновые гормоны *in vivo* проходят через фолдинг β -цепей в комплексе с α -цепью, однако доказать это утверждение строгим образом для других гормонов не представляется возможным, поскольку *in vitro* β -цепи могут фолдироваться и секретироваться клетками независимо от α -цепи [4].

Поскольку в современной клинической практике все гликопротеиновые гормоны используются в рекомбинантной форме, повышение удельной продуктивности секретирующих их клеток, в первую очередь клеток яичника китайского хомячка СНО, остается актуальной задачей. Одной из известных лимитирующих стадий классического пути секреции белков является ко-трансляционная транслокация синтезируемых полипептидов в ЭР. Показано, что различные сигнальные последовательности могут увеличивать скорость прохождения

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

*E-mail: mvsineg@gmail.com

этой стадии, что приводит, в свою очередь, к увеличению секреции белка [5]. По-видимому, для белков разных классов не существует универсально эффективного сигнального пептида [6]. Более того, для клеток СНО было показано, что нативный сигнальный пептид не обязательно наиболее эффективен [5, 7, 8]. В частности, Кобер (Kober) и соавторы продемонстрировали увеличение уровня секреции клетками СНО модельных белков (антитела и Fc-слитого белка) с гетерологичными сигнальными последовательностями – препро-белка человеческого сывороточного альбумина и препро-белка азуроцидина [9]. Также активно ведутся исследования неприродных (синтетических) сигнальных пептидов для увеличения уровня экспрессии рекомбинантных белков [10, 11]. Замена нативных сигнальных пептидов на гетерологичные позволила увеличить титр рекомбинантных антител [12], однако для гликопротеиновых гормонов данный вопрос остается совершенно неисследованным.

Ранее нами было обнаружено, что при экспрессии генов субъединиц ФСГ в клетках СНО в составе

трицистронной плазмиды клетки преимущественно секретируют свободную α-субъединицу, а не гетеродимерный гормон [4]. Накопление в культуральной среде больших количеств свободной α-субъединицы было прекращено путем повторной трансфекции клеток плазмидой, кодирующей ген β-субъединицы ФСГ и дополнительный селекционный маркер [4].

Такой способ балансировки уровней биосинтеза субъединиц гормонов требует очень большого времени на получение линий-продуцентов и, по-видимому, не позволяет отбирать наиболее продуктивные клоны клеток из-за независимого распределения уровней экспрессии генов субъединиц гормонов в разных индивидуальных клетках. Мы предположили, что скорости биосинтеза β-субъединиц гликопротеиновых гормонов могут быть понижены их природными неоптимальными сигнальными пептидами, в таком случае замена этих пептидов на более эффективные может привести к повышению уровня биосинтеза гетеродимерных гормонов.

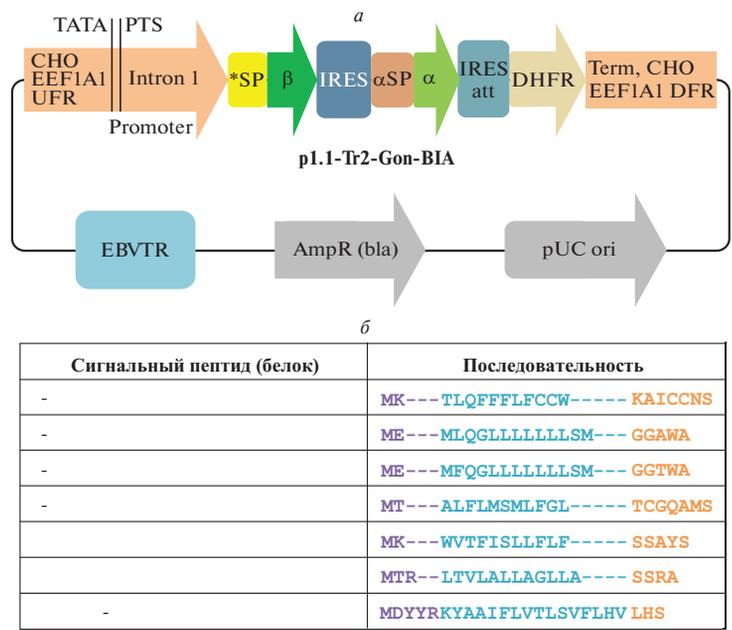


Рис. 1. Карта трицистронных экспрессионных плазмид, кодирующих цепи гликопротеиновых гормонов, и последовательности сигнальных пептидов. (а) Карта плазмид, обозначения: pUC origin – область начала репликации плазмиды pUC; bla – открытая рамка считывания бета-лактамазы; EBVTR – участок терминального повтора вируса Эпштейн-Барр человека; CHO EEF1A1 UFR и CHO EEF1A1 DFR – районы, фланкирующие ген EEF1A1 китайского хомячка, содержат промотор, интрон, терминатор и сигнал полиаденилирования гена EEF1A1; TATA – TATA-бокс; PTS – предполагаемая точка начала транскрипции; IRES – природный внутренний сайт связывания рибосом EMCV дикого типа; IRES att – аттенюированный внутренний сайт связывания рибосом; *SP – варьируемый сигнальный пептид β-цепи; β – ОПС β-цепи соответствующего гормона; αSP – сигнальный пептид α-цепи гликопротеиновых гормонов; α – ОПС α-цепи; DHFR – ОПС дигидрофолатредуктазы мыши. (а) Последовательности сигнальных пептидов, фиолетовым шрифтом выделена N-область по данным алгоритма SignalP 6.0, голубым шрифтом – Н-область, оранжевым – С-область.

Для выявления более эффективных сигнальных пептидов β -субъединиц гормонов были использованы плазмиды p1.1-Tr2-Gon BIA на основе ранее разработанной нами векторной плазмиды p1.1-Tr2 [13,14], кодирующие β -субъединицы гормонов в первом цистроне трицистронной матрицы, одинаковую для всех случаев α -субъединицу гормонов во втором цистроне и селекционный маркер дигидрофолатредуктазу (DHFR) в третьем цистроне, т.е. схему β -цепь-IRES- α -цепь-IRESatt-DHFR (рис. 1). Для каждой β -цепи кодировали четыре разных сигнальных пептида: нативный сигнальный пептид β -цепи соответствующего гормона (НСП), а также гетерологичные для β -цепи сигнальные пептиды – азурицидин (Азу), человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), общей для гликопротеиновых гормонов α -цепи (аСП).

Получение кодирующих последовательностей с природными сигнальным пептидами для ФСГ человека описано в [4], для ЛГ – в [15], в слу-

чае ХГЧ и ТТГ использовали синтетические гены β -цепей, полученные при обратной трансляции последовательностей NP_000728 и NP_000540.2 соответственно. Синтетические последовательности « β -цепь-IRES- α -цепь» клонировали в экспрессионные векторы по сайтам рестрикции *AbsI-NheI*. Для замены сигнальных пептидов β -цепей проводили step-out ПЦР, используя пары длинных адапторных праймеров, в которых закодирован сигнальный пептид и синтетическая последовательность Козак, и общий для каждой β -цепи обратный праймер. Продукты ПЦР субклонировали в Т-вектор, секвенировали и переносили в экспрессионные плазмиды по сайтам *AbsI-SpeI/NheI*, заменяя нативную β -цепь. Вероятность корректного процессинга всех выбранных сигнальных пептидов в комбинации с соответствующими субъединицами, рассчитанная при помощи биоинформатического сервиса SignalP 6.0 [16], составила более 95% во всех случаях; таким образом, для всех 16 плазмид

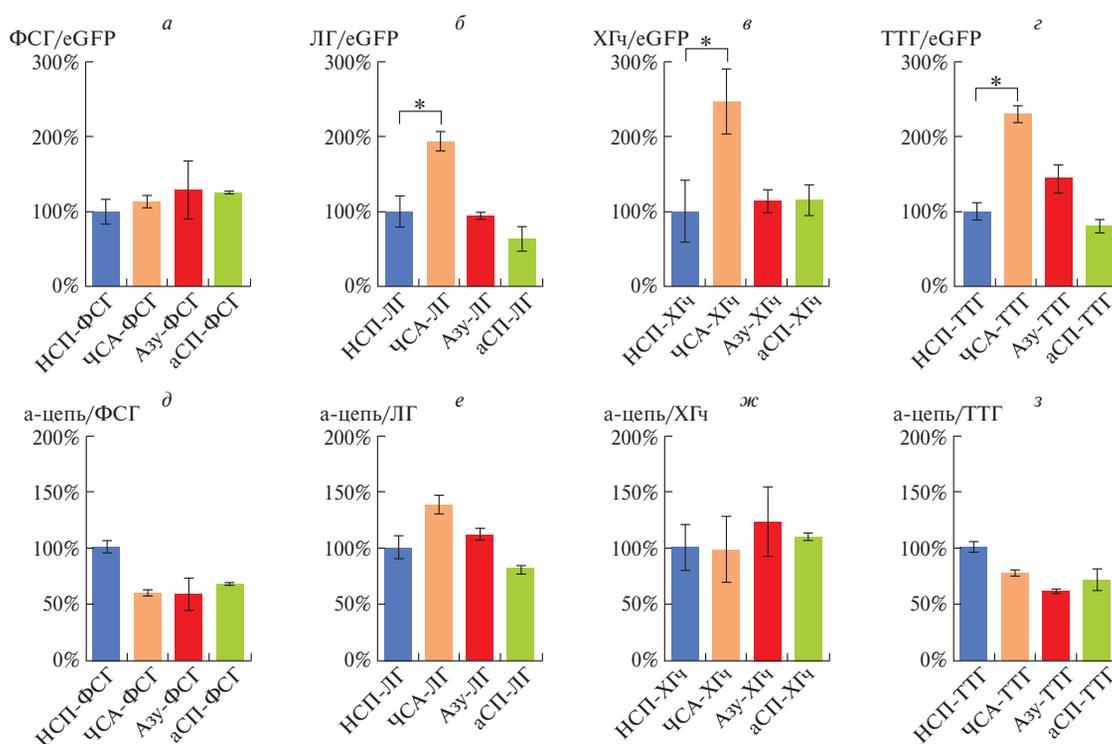


Рис. 2. Титр гликопротеиновых гормонов, секретируемых транзитивно трансфицированной культурой клеток СНО, при варьировании сигнальных пептидов их β -цепей. (а – г) Концентрация гетеродимерной формы гормонов (по данным ИФА), нормализованная на уровень зеленого флуоресцентного белка eGFP в лизате клеток. (д – з) Титр секретируемой α -цепи с нативным сигнальным пептидом (оценка методом ИФА), нормализованный на титр гетеродимерной формы гормона. Представлен средний результат трех независимых биологических повторов, два повтора в ИФА для каждого образца, значения для контрольного пептида НСП приняты за 100%, * – $p < 0,05$, однофакторный дисперсионный анализ, критерий Тьюки. Сокращения: ФСГ – фолликулостимулирующий гормон; ЛГ – лютеинизирующий гормон; ХГЧ – хорионический гонадотропин человека; ТТГ – тиреотропный гормон; НСП – нативный сигнальный пептид β -цепи соответствующего гормона; ЧСА – человеческий сывороточный альбумин; Азу – азурицидин; аСП – сигнальный пептид α -цепи гликопротеиновых гормонов.

ожидалось получение гетеродимерных гормонов в культуральной среде после трансфекции клеток CHO. Полученные плазмиды смешивали в фосфатно-солевом буфере в соотношении 95:5 с контрольной плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок eGFP (pEGFP-N2, Clontech, США, Addgene #6081–1), и трансфицировали при помощи липосомального реагента GenJect39 (Molecula, Россия) в клетки CHO S, трансфекцию вели в трех биологических повторностях. Через 3 дня после трансфекции в культуральной среде методом ИФА измеряли концентрации гетеродимерных гормонов (использованные антитела: конъюгат моноклональных антител против α -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #XF1*, моноклональные антитела против β -субъединицы ЛГ #XL1, моноклональные антитела против β -субъединицы ФСГ #XF2, моноклональные антитела против β -субъединицы ТТГ #ХТВ1, моноклональные антитела против β -субъединицы ХГЧ #ХН51, все производства ООО ХЕМА, Россия) и суммарные концентрации α -субъединиц (использованные антитела: конъюгат моноклонального антитела против α -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #K003/1*, моноклональные антитела против α -субъединицы гликопротеиновых гормонов с пероксидазой хрена #K003, все производства ООО Диатех, Россия). Также собирали клетки, лизировали их и измеряли интенсивности флуоресценции eGFP в лизате для нормализации данных. Для всех конструкций наблюдали секрецию гетеродимерных форм гормонов в культуральную среду (рис. 2).

Для всех гормонов, кроме ФСГ, при замене нативных сигнальных пептидов β -цепей на гетерологичный сигнальный пептид ЧСА наблюдали статистически достоверное увеличение уровня секреции гетеродимерных гормонов в 2–2,5 раза. Одновременно с этим для ФСГ и ТТГ, но не для ЛГ и ХГч, фиксировали падение относительного уровня секреции всех форм α -субъединицы при замене нативных сигнальных пептидов у β -субъединицы на гетерологичные. Мы предполагаем, что для гормонов ЛГ и ХГч, обладающих высокгомологичными β -субъединицами, происходит удерживание свободной α -субъединицы в ЭПР до связывания с фолдируемой β -субъединицей, и при увеличении количества β -субъединиц в ЭПР можно наблюдать увеличение уровней секреции гетеродимерных гормонов, но не падение уровней секреции свободных α -субъединиц.

Использованный нами подход демонстрирует, что для большинства гликопротеиновых гормонов возможно увеличение продуктивности клеток за счет повышения эффективности трансляции и транслокации в ЭПР β -субъединиц гормонов при

помощи соединения их в рамке с гетерологичными сигнальными пептидами, среди которых наиболее значимый подъем продуктивности обеспечивается сигнальным пептидом ЧСА. Полученные методом транзientной трансфекции данные могут быть в дальнейшем уточнены для стабильно трансфицированных клеточных популяций при большей удельной продуктивности клеток

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jackson R. C., Blobel G. Post-translational processing of full-length presecretory proteins with canine pancreatic signal peptidase // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1980. V. 343. P. 391–404.
2. Weintraub B. D., Stannard B. S., Linnekin D., Marshall M. Relationship of glycosylation to de novo thyroid-stimulating hormone biosynthesis and secretion by mouse pituitary tumor cells // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. P. 5715–5723.
3. Bernard M. P., Lin W., Kholodovych V., Moyle W. R. Human lutropin (hLH) and choriogonadotropin (CG) are assembled by different pathways: a model of hLH assembly // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 14360–14369.
4. Orlova N. A., Kovnir S. V., Khodak Y. A., Polzikov M. A., Nikitina V. A., Skryabin K. G., Vorobiev I. I. High-level expression of biologically active human follicle stimulating hormone in the Chinese hamster ovary cell line by a pair of tricistronic and monocistronic vectors // *PLoS One.* 2019. V. 14. e0219434.
5. Zhang L., Leng Q., Mixson A. J. Alteration in the IL-2 signal peptide affects secretion of proteins in vitro and in vivo // *J. Gene Med.* 2005. V. 7. P. 354–365.
6. Kapp K., Schrempf S., Lemberg M. K., Dobberstein B. Post-Targeting Functions of Signal Peptides. In: *Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience (2000–2013).*
7. Knappskog S., Ravneberg H., Gjerdrum C., Tröbe C., Stern B., Pryme I. F. The level of synthesis and secretion of *Gaussia princeps* luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide // *J. Biotechnol.* 2007. V. 128. P. 705–715.
8. Tan N. S., Ho B., Ding J. L. Engineering a novel secretion signal for cross-host recombinant protein expression // *Protein Eng. Des. Sel.* 2002. V. 15. P. 337–345.
9. Kober L., Zehe C., Bode J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. V. 110. P. 1164–1173.
10. Yu X., Conyne M., Lake M. R., Walter K. A., Min J. In silico high throughput mutagenesis and screening of signal peptides to mitigate N-terminal heterogeneity of recombinant monoclonal antibodies // *MAbs.* 2022. V. 14.

11. Park J.H., Lee H.M., Jin E.J., Lee E.J., Kang Y.J., Kim S., Yoo S.S., Lee G.M., Kim Y.G. Development of an in vitro screening system for synthetic signal peptide in mammalian cell-based protein production // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022. V. 106. P. 3571–3582,
12. Haryadi R., Ho S., Kok Y.J., Pu H.X., Zheng L., Pereira N.A., Li B., Bi X., Goh L.T., Yang Y., et al. Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells // *PLoS One* 2015. V. 10. e0116878.
13. Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells // *BMC Biotechnol.* 2014. V. 14. P. 56.
14. Sinegubova M., Orlova N., Vorobiev I. Promoter from Chinese hamster elongation factor-1a gene and Epstein-Barr virus terminal repeats concatemer fragment maintain stable high-level expression of recombinant proteins // *Peer J.* 2023. V. 11. e16287.
15. Orlova N.A., Kovnir S.V., Khodak Y.A., Polzikov M.A., Vorobiev I.I. Recombinant human luteinizing hormone for the treatment of infertility: the generation of producer cell lines // *Obstet. Gynecol. Reprod.* 2017. V. 11. P. 33–42.
16. Teufel F., Almagro Armenteros J.J., Johansen A.R., Gíslason M.H., Pihl S.I., Tsirigos K.D., Winther O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat. Biotechnol.* 2022. V. 40. P. 1023.

ENHANCING HUMAN GLYCOPROTEIN HORMONES PRODUCTION IN CHO CELLS USING HETEROLOGOUS BETA-CHAIN SIGNAL PEPTIDES

M. V. Sinegubova[#], D. E. Kolesov, L. K. Dayanova, I. I. Vorobiev, N. A. Orlova

*The Federal State Institution “Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences”, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: mvsineg@gmail.com*

Presented by Academician of the RAS V.O. Popov

We studied the influence of heterologous signal peptides in the β -chains of glycoprotein hormones on the biosynthesis of these hormones in a transiently transfected culture of Chinese hamster ovary cells CHO S. When replacing the natural signal peptides of the β -chains with the heterologous signal peptide of human serum albumin, cell productivity was increased by 2–2.5 times for human luteinizing hormone, human chorionic gonadotropin, human thyroid-stimulating hormone, but not for human follicle-stimulating hormone. No significant increase in cell productivity was observed for human azurocidin signal peptide and human glycoprotein hormone α -chain signal peptide. The used approach allows quick assessing the effect of heterologous signal peptides on the biosynthesis of heterodimeric proteins of various classes.

Keywords: glycoprotein hormones, signal peptides, Chinese hamster ovary cells, transient expression.

УДК 576.53

ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ И ПРОЛИФЕРАЦИИ В КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА С ИЗМЕНЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ИЗОФОРМ МИОЗИНА 1С

© 2024 г. Е. С. Соломатина¹, Е. Н. Нишкамаева¹, А. В. Ковалева^{1,2}, А. В. Творогова³,
Д. М. Поташникова¹, А. А. Саидова^{1,2,*}

Представлено академиком РАН С.Г. Георгиевой

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принято к публикации 17.10.2023 г.

Миозин 1С – мономерный миозиновый мотор с укороченным хвостовым доменом. Такие белки представляют собой медленные «сенсоры натяжения». Три изоформы миозина 1С отличаются по коротким N-концевым последовательностям, функциональные отличия для них не описаны. Изоформа А миозина 1С была описана как диагностический маркер рака предстательной железы, однако ее роль в опухолевой трансформации остается неизвестной. Исходя из данных о функциях миозина 1С, нами была выдвинута гипотеза о потенциальном участии изоформ миозина 1С в поддержании опухолевого фенотипа клеток рака простаты. Мы показали, что снижение уровня экспрессии изоформы С миозина 1С приводит к повышению пролиферативной активности опухолевых клеток предстательной железы. ключевые слова: миозин 1С, изоформы, рак предстательной железы, пролиферация.

Принятые сокращения: NLS – сигнал ядерной локализации; PH – домен гомологии плекстрина, TH1 – домен хвостовой гомологии, NM1 – первый ядерный миозин, B-WICH – хроматин-ремоделирующий комплекс B-WICH, FBS – эмбриональная сыворотка теленка, TMRE – тетраметилродамин, этиловый эфир.

Ключевые слова: миозин 1С, изоформы, рак предстательной железы, пролиферация

DOI: 10.31857/S2686738924010075, **EDN:** I KUIVJF

ВВЕДЕНИЕ

Миозин 1С является первым мономерным миозином, изолированным из тканей млекопитающих и характеризующимся наличием типичной для миозиновых моторов трехдоменной структуры с характерными для данного класса миозинов отличиями, определяющими его специальные функции. N-концевой моторный домен этого белка (“головка”) способен к связыванию актина и АТФ, причем скорость гидролиза АТФ является довольно низкой, в результате чего данный тип миозинов вы-

полняет в клетке функцию сенсора натяжения [1]. Участок тяжелой цепи, с которым ассоциированы легкие цепи (“шейка”), содержит регуляторные домены, способные связывать кальмодулин, кальций и деацетилазу гистонов, а также содержит сигнал ядерной локализации. С-концевой домен (“хвост”) включает в себя домен гомологии плекстрина (PH), домен гомологии хвоста (TH1) и обеспечивает специальные функции миозинов [2].

В клетке миозин 1С представлен тремя изоформами, различающимися только своими N-терминальными участками: по сравнению с наиболее короткой изоформой С, изоформа В содержит дополнительные 16 аминокислот, а изоформа А – 35, 10 из которых для изоформ А и В являются общими [3]. Несмотря на высокий уровень структурной гомологии и наличие NLS-последовательности в общем для всех трех изоформ участке, эти белки характеризуются различным ядерно-цитоплазматическим соотношением: изоформа С преимущественно локализуется в цитоплазме; для изоформ А и В характерна преимущественно ядерная лока-

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

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

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, Россия

*E-mail: saidova@mail.bio.msu.ru

лизация, причем изоформа В в первую очередь локализуется в нуклеоплазме и ядрышке, в то время как изоформа А в ядрышке не локализуется, но ассоциирована с ядерными спеклами [4,5].

Большая часть функциональных исследований направлена на изучение общей фракции миозина 1С вне зависимости от принадлежности к определенной изоформе. Так как данный белок способен взаимодействовать и с липидами, и с актином, миозин 1С обеспечивает непосредственное взаимодействие и генерацию механической силы между актиновыми микрофиламентами и фосфоинозитолом клеточной мембраны через РН домен, участвуя в целом ряде внутриклеточных процессов. Так, миозин 1С участвует в поддержании положения Е-кадгерина в клеточных контактах [6]. Также снижение уровня экспрессии миозина 1С приводит к нарушению образования плотных контактов и клеточной миграции подоцитов [7]. В нейронах миозин 1С участвует в образовании ламеллоподий, ограничивая их протрузию и регуляции ретроградного тока актина [8]. В адипоцитах миозин 1С ускоряет экзоцитоз везикул, содержащих переносчик глюкозы GLUT4, стимулируя транспорт глюкозы в адипоциты [9]. Наиболее полно функции миозина 1С изучены на модели сенсорных клеток внутреннего уха, где этот белок участвует в быстром закрытии катион-селективных каналов [10].

Изоформа А миозина 1С является тканеспецифичной и характерна для нормальной ткани почек, надпочечников, поджелудочной железы и яичников [11], тогда как остальные изоформы экспрессируются на сходном уровне во всех тканях и органах. Было предложено использовать эту изоформу как опухолеспецифичный маркер, так как ее гиперэкспрессия характерна для клеток рака простаты и опухолевой ткани простаты модельных мышей линии TRAMP [11]. При анализе экспрессии изоформы А в клеточных линиях рака простаты было показано, что методом ПЦР в реальном времени возможно детектировать повышение уровня экспрессии мРНК данной изоформы даже в образцах с малым количеством клеток или в образцах с большим количеством стромального компонента [12]. Кроме того, уровень экспрессии изоформы А достоверно повышен в клинических образцах рака простаты и позволяет отличить не только опухолевый процесс от реактивной доброкачественной гиперпла-

зии простаты, но и стадии опухоли между собой, что открывает новые перспективы в использовании ее в качестве диагностического и прогностического маркера [13]. В настоящей работе мы предположили, что экзогенное изменение уровня экспрессии миозина 1С может влиять на баланс параметров гибели клеточных линий рака простаты. Для проверки этой гипотезы мы получили модельные клеточные линии рака простаты с индуцибельной экспрессией изоформ А и С миозина 1С (модель повышенной экспрессии) и использовали миРНК к изоформам А и С миозина 1С (модель сниженной экспрессии). На модельных клеточных линиях PC-3 и LNCaP с повышенной и сниженной экспрессией изоформ миозина 1С мы проанализировали пролиферативную активность клеток с использованием маркера Ki-67 и спонтанную клеточную гибель с помощью маркера аннексина V и потенциал-зависимого красителя TMRE.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии

Линии клеток рака простаты человека PC-3 (CRL-1435) и LNCaP (CRL-1740) были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клетки культивировали в среде DMEM: F12 (1:1) с добавлением 10% фетальной сыворотки теленка (HyClone, США), 0.01 г/л гентамицина, 0.3% амфотерицина В и 584 г/л L-глутамин (ПанЭко, Россия). Пассирование проводили раз в три дня в соотношении 1:5 с использованием 0.05% раствора трипсина-ЭДТА (“ПанЭко”, Россия).

Транфекция миРНК

С помощью онлайн-инструмента <https://gnaidesigner.thermofisher.com/gnaixpress/> были написаны миРНК для нокдауна изоформы А и для нокдауна всех трех изоформ миозина 1С. Последовательности миРНК приведены в табл. 1, синтез и отжиг последовательностей был проведен в “ДНК-Синтез” (Россия). Транфекцию миРНК проводили с использованием трансфецирующего агента Turbofect (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкциям производителя, концентрация миРНК составила 200 пкмоль/мкл, для трансфек-

Таблица 1. Последовательности миРНК для нокдауна изоформ миозина 1С

Изоформа миозина 1С	Последовательность
siMYO1CA	AUGAACCACGCGGAUGAUCUCCdTdT
siMYO1CC	CCUAUCGCCGCAAUACGAAGCdTdT

пии использовали среду knock-out DMEM (Thermo Fisher Scientific, США). Физиологические эффекты в клетках изучали после 92 ч воздействия. Клетки снимали с помощью 0.05% раствора трипсина-ЭДТА и культуральной среды, центрифугировали при 750 g в течение 5 минут. В ходе любого эксперимента часть клеток отбирали для дальнейшей верификации подавления экспрессии.

Выделение РНК и ПЦР в реальном времени

Для определения уровня экспрессии изоформ миозина 1С из сухих осадков клеток РС-3 была выделена тотальная РНК с использованием коммерческого набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) по рекомендациям производителя. Измерение концентрации РНК и оценку ее качества проводили на спектрофотометре NanoPhotometer (Implen, Германия).

В реакцию обратной транскрипции, проводимую с помощью коммерческого набора MMLV RT kit для синтеза кДНК (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя, брали по 1 мкг РНК. При проведении ПЦР в реальном времени использовался неспецифичный ДНК-интеркалятор SYBR Green I (набор реагентов iTaq, Bio-Rad, США). Рабочая концентрация каждого праймера составила 10 пмоль. Для каждой пары праймеров ставили три технические повторности. Праймеры для ПЦР в реальном времени были синтезированы в ООО “Евроген” (Россия), последовательности приведены в табл. 2, праймеры для референтных генов описаны в статье [12]. Первичный анализ результатов ПЦР в реальном времени проводился по описанной методике [14].

Получение стабильных клеточных линий с индуцибельной экспрессией изоформ миозина 1С

На матрице РНК, выделенной из клеток РС-3 тризольным методом, была получена кДНК с помощью обратной транскриптазы (Maxima Reverse Transcriptase, Thermo Fisher Scientific, США). Последовательности поднимали на матрице кДНК с помощью Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB,

США). Для дальнейшего лигирования в праймеры были добавлены последовательности сайтов рестрикции *XhoI* и *NheI*. Лигирование полученных последовательностей во вспомогательный вектор pBlu2SKM (далее – pSK) провели по сайту *EcoRV*. Реакцию лигирования в pSK ставили в соотношении 1:3 (50 нг вектора + по 150 нг вставок) с использованием Rapid DNA Ligation Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Трансформация осуществлялась в *E. coli* – *XL1* – *Blue* методом электропорации. Оценка лигирования проводилась с помощью пробных рестрикций плазмид по сайту рестрикции *Hind III*. Отобранные на основании пробных рестрикций клоны очищали на колонках HiPure Gel DNA Mini Kit (Magen, КНР). Целостность сайтов рестрикции *XhoI* и *NheI*, а также отсутствие точечных мутаций подтверждали секвенированием по Сэнгеру, осуществленному ЗАО “Евроген” (Россия). С полученных векторов был поднят ПЦР-продукт размером в 5kb с помощью Invitrogen Platinum SuperFi II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. С использованием NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB, США) из двух дополнительных фрагментов был собран вектор pSLIK – Flag со вставками изоформ А и С миозина 1С размером 15.5 kb. Трансформация осуществлялась в *Sbt1 E. coli* методом электропорации. Оценка клонов проводилась с помощью пробных рестрикций плазмид по сайтам рестрикции *BamHI* и *NdeI*. Lentivirusные частицы с собирали с использованием плазмид pSLIK(Flag) -MYO1C-iso A/C и вспомогательных плазмид VSV-G и pCMV-dR8.2 в клетках культуры НЕК293Т. Кондиционированную среду после трансфекции отбирали каждые 24 ч в течение трех суток, после центрифугирования супернатанты фильтровали через фильтр в 0.22 мкм. Стабильные линии отбирали с помощью селективного антибиотика G418 (Thermo Fisher Scientific, США) с рабочей концентрацией 0.0005 г/мл. Верификация увеличения уровня экспрессии данных генов проводилась методом Вестерн-блот анализа. Физиологические эффекты в клетках изучали после 72 часов индукции экспрессии при добавлении доксициклина в концентрации 0.001 мг/мл.

Таблица 2. Праймеры для ПЦР в реальном времени

Изоформа миозина 1С	Нуклеотидная последовательность праймера 5' – 3'	Температура отжига, °С
А	for: GCTCGAGGCGCTGCAAGTGGAGCTGG	65
	rev: CGCTAGCTCACCGAGAATTCAGCCGTGG	
С	for: GTACAGCGTGCGGACAATAAGC	62
	rev: CCTTGGTGATGAGCAGCTCC	

Вестерн-блот анализ

Клетки снимали 0.05% раствором трипси-на-ЭДТА и центрифугировали при 750 g в течение 5 мин, супернатант удаляли, эппендорфы с клеточными осадками помещали на лед. Клетки лизировали, добавляя 100 мкл RIPA буфера с PIS, RNIS II и RNIS III (Merck, США). Образцы инкубировали на льду в течение 30 мин, после чего центрифугировали в течение 20 мин при +4 °C на 12000 g. Белки разделяли с помощью электрофореза в 7.5% в полиакриламидном геле, перед нанесением образцы инкубировали 15 мин при 98 °C. Перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Thermo Fisher Scientific, США) проводили при 80 мА в течение 70 мин. После переноса инкубировали мембрану в течение 30 минут в 5% растворе молока (Nonfat Dry Milk, Cell Signaling, США). Далее мембрану инкубировали в течение 8 часов при +4 °C в растворе первичных антител к пептиду FLAG (клон M2, Sigma, США) или к тотальному миозину 1C (клон EPR14771, Abscam, США) в 5% растворе молока и затем инкубировали со вторыми антителами anti-mouse IgG (клон 7076, Cell Signaling, США) Для проявления использовали Pierce™ ECL Western Blotting (Thermo Fisher Scientific, США)

Анализ клеточного цикла

Анализ клеточного цикла проводился методом проточной цитометрии при стандартном окрашивании йодидом пропидия (Amresco, США), как было описано ранее [15]. При записи данных использовался прибор FACSAria SORP с ПО FACSDiva 6.2 (BD Biosciences, США).

Анализ пролиферативного потенциала

Анализ пролиферативного потенциала проводился методом проточной цитометрии при окрашивании на маркер пролиферирующих клеток Ki-67. Собранную суспензию клеток фиксировали 1% параформальдегидом (Merck, США) 10 минут при комнатной температуре, отмывали 1 раз PBS, пермеабелизировали 1-кратным раствором Perm II (BD Biosciences, США) согласно рекомендациям производителя. После отмывки PBS клетки окрашивали анти-Ki-67-FITC антителами (клон B56, (BD Biosciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Полигон Ki-67+ клеток в препарате выделяли при сравнении с негативным контролем – неокрашенной суспензией тех же клеток.

Анализ клеточной гибели

Спонтанную клеточную гибель оценивали методом проточной цитометрии при окрашивании потенциал-зависимым красителем TMRE (Thermo

Fisher Scientific, США) и аннексином V-FITC (BioLegend, США) для выявления экстернализованного фосфатидилсерина. Протокол совместного окрашивания TMRE и аннексином V был описан ранее [16]. При записи и анализе данных использовался прибор FACSAria SORP с ПО FACSDiva 6.2.

Анализ и представление данных

Данные проточной цитометрии анализировали в программе Diva 6.2.1 (BD Biosciences, США). При анализе данных субпопуляции, соответствующие разным фазам клеточного цикла, выделялись автоматически при помощи ПО ModFit LT 3.3. Построение графиков и анализ проводились в программе GraphPad Prism 8. Для статистического анализа различий использовали критерий Краскела-Уоллиса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии изоформ миозина 1C в модельных клеточных линиях

Оценка эффективности воздействия миРНК к изоформам миозина 1C проводилась методом ПЦР в реальном времени. Использование миРНК к изоформе А позволило снизить уровень экспрессии этой изоформы в клетках РС-3 в 2.9 раза, тогда как уровень экспрессии изоформы С относительно контроля значимо не изменился (рис. 1, а), что говорит о специфичности миРНК к изоформе А. Использование миРНК к изоформе С позволило снизить уровень экспрессии изоформы А в 4.2 раза, уровень экспрессии изоформы С снизился в 4.6 раза, так как миРНК к изоформе С подавляет экспрессию как более короткой изоформы С, так и более длинной изоформы А.

Подтверждение эффективности индуцированного доксициклином повышения экспрессии изоформ миозина 1C в модельных клеточных линиях LNCaP было проведено методом Вестерн-блоттинга (рис. 1, б). В работе мы получили клеточные линии LNCaP с индуцируемой экспрессией изоформы А или изоформы С, слитых с меткой FLAG. С использованием антител к FLAG-метке мы детектировали специфичное повышение уровня экспрессии как изоформы А, так и изоформы С миозина 1C при добавлении доксициклина. Далее для удобства линии обозначили следующим образом: линия РС-3 с нокдауном изоформы А – si_MYO1C_isoA, линия с нокдауном изоформы С миозина 1C – si_MYO1C_isoC, линия LNCaP с индуцибельной гиперэкспрессией изоформы А – FLAG-Myo1C-isoA, линия с индуцибельной гиперэкспрессией изоформы С – FLAG-Myo1C-isoC.

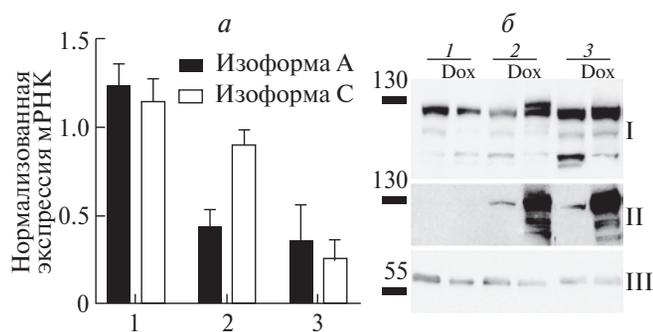


Рис. 1. Экспрессия изоформ миозина 1С в модельных клеточных линиях. *a* – уровень экспрессии мРНК изоформ А и С миозина 1С в контроле (1), при добавлении миРНК к изоформе А миозина 1С (2) и при добавлении миРНК к изоформе С миозина 1С (3). Показаны средние и стандартные отклонения, данные нормализованы по референтным генам *YWHAZ*, *GAPDH* и *HPRT1*; приведено 5 независимых экспериментов. *б* – экспрессия изоформ А и С миозина 1С в клетках LNCaP в контроле и при добавлении доксициклина (Dox). I – окрашивание антителами к пан-миозину 1С, II – окрашивание антителами к метке FLAG, III – окрашивание антителами к α -тубулину; 1 – контроль, 2 – линия FLAG-Myo1C-isoA, 3 – линия FLAG-Myo1C-isoC.

Основные параметры клеточной линии PC-3 в норме и при сниженной экспрессии миозина 1С

Оценка основных параметров пролиферации и клеточной гибели в модельной клеточной линии рака предстательной железы PC-3 и ее модификациях проводилась методом проточной цитометрии. Для оценки распределения по фазам клеточного цикла было проведено стандартное окрашивание йодидом пропидия. Оценка распределения по фа-

зам клеточного цикла позволила выявить достоверные различия между исходной культурой PC-3 и при подавлении изоформы С: количество клеток в G0/G1 фазе было достоверно снижено, а количество клеток в S фазе было достоверно повышено в линии *si_MYO1C_isoC*. При нокдауне изоформы А в линии *si_MYO1C_isoA* мы детектировали достоверное увеличение популяции sub G1, включающей в себя гиподиплоидные клетки и апоптотические клетки с деградировавшей ДНК (рис. 2, *a*).

Для анализа пролиферативного потенциала клеточной линии PC-3 и ее модификаций было проведено окрашивание на маркер пролиферирующих клеток Ki-67 (рис. 2, *б*).

В контрольной культуре PC-3 Ki-67+ клетки составили $2.93 \pm 1.07\%$; в культуре *si_MYO1C_isoC* – $6.10 \pm 0.46\%$; в культуре PC-3 *si_MYO1C_isoA* – $3.28 \pm 0.21\%$. Процент пролиферирующих клеток был достоверно повышен в клетках с нокдауном изоформы С по сравнению с нокдауном изоформы А. Анализ спонтанной клеточной гибели (рис. 2, *в*) показал, что процент живых клеток с высокой интенсивностью флуоресценции TMRE и без окрашивания аннексином V составлял $85.20 \pm 11.01\%$ для контрольной культуры PC-3; $75.80 \pm 4.00\%$ для линии *si_MYO1C_isoC* и $76.40 \pm 1.41\%$ для линии *si_MYO1C_isoA*. Различия в представленности всех выделяемых популяций живых и гибнущих клеток не были достоверны. Таким образом, нокдаун миозина 1С и отдельно его изоформы А не влияет на процесс спонтанной клеточной гибели в культуре PC-3. Однако нокдаун изоформы С миозина 1С активирует пролиферативную активность клеток PC-3: больше клеток по сравнению с контролем входят в S фазу и больше клеток несут маркер Ki-67 по сравнению с нокдауном отдельной изоформы А.

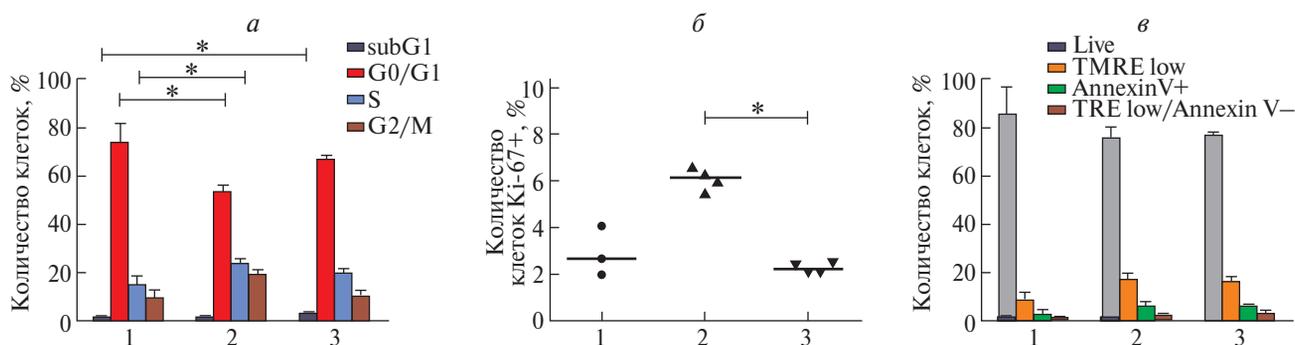


Рис. 2. Основные параметры пролиферации и клеточной гибели в клеточной линии рака простаты PC-3 в контроле (1), при подавлении экспрессии изоформы А миозина 1С (2) и при подавлении экспрессии изоформы С миозина 1С (3). *a* – гистограммы распределения клеток по клеточному циклу. *б* – представленность Ki-67+ клеток в образцах. *в* – гистограммы распределения клеток по стадиям клеточной гибели. Приведено 3 независимых эксперимента, * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, тест Краскелла-Уоллиса, пост-тест Данна.

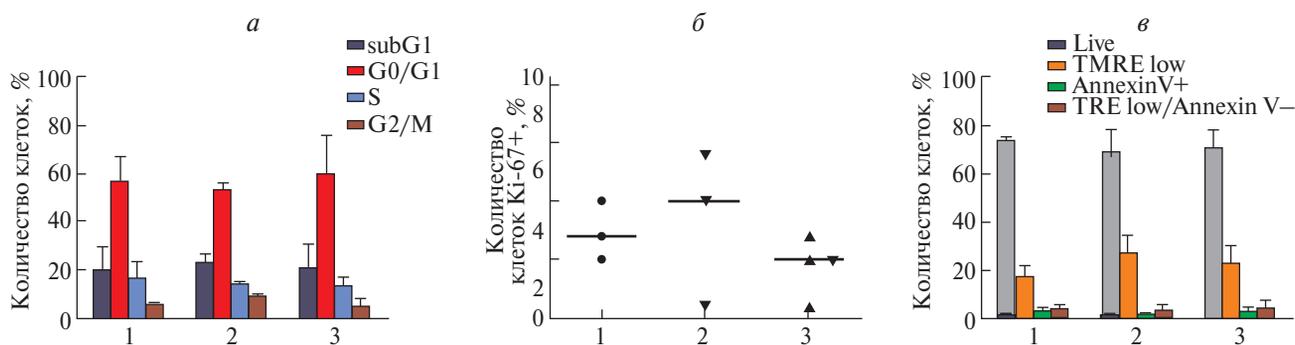


Рис. 3. Основные параметры пролиферации и клеточной гибели в клеточной линии рака простаты LNCaP 3 в контроле (1), при гиперэкспрессии изоформы А миозина 1С (2) и при гиперэкспрессии изоформы С миозина 1С (3). *a* – гистограммы распределения клеток по клеточному циклу. *б* – представленность Ki-67+ клеток в образцах. *в* – гистограммы распределения клеток по стадиям клеточной гибели. Приведено 3 независимых эксперимента, * – достоверные различия между группами, $p < 0.05$, тест Краскелла–Уоллиса, пост-тест Данна.

Основные параметры клеточной линии LNCaP в норме и при индуцированной экспрессии миозина 1С.

Оценка основных параметров пролиферации и клеточной гибели в линии рака предстательной железы LNCaP и ее модификациях проводилась методом проточной цитометрии. Окрашивание йодидом пропидия на распределение по фазам клеточного цикла не показало достоверных различий между исходной культурой LNCaP и ее модификациями (рис. 3, *a*).

Количество Ki-67+ клеток составило $0.73 \pm 0.25\%$ для контрольной культуры LNCaP; $0.83 \pm 0.67\%$ – для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoC; $0.43 \pm 0.31\%$ – для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoA. Достоверных различий в количестве пролиферирующих клеток между экспериментом и контролем обнаружено не было (рис. 3, *б*). Анализ спонтанной клеточной гибели в контрольной культуре LNCaP и ее модификациях (рис. 3, *в*) показал, что процент живых клеток составил $74.47 \pm 0.90\%$ в контроле, $69.07 \pm 9.66\%$ для культуры LNCaP FLAG-Myo1C-isoC и $70.90 \pm 6.99\%$ для линии FLAG-Myo1C-isoA. Различия в представленности всех выделяемых популяций живых и гибнущих клеток не были достоверны. Таким образом, индуцированная экспрессия изоформ миозина 1С не влияет на процессы клеточной пролиферации и спонтанной клеточной гибели в культуре LNCaP.

Мы показали, что изменение уровня экспрессии миозина 1С как в большую, так и в меньшую сторону не влияет на процент спонтанно гибнущих клеток в линиях рака простаты. На данный момент известно небольшое количество работ, посвященных связи миозина 1С и различных вариантов клеточной гибели. Так, отсутствие функционального миозина 1С приводит к нарушению процесса аутофагии; этот процесс, по всей видимости, связан

с участием миозина 1С в правильном функционировании везикулярного компартмента клетки [17].

Неконтролируемая пролиферация клеток является одним из основных признаков онкотрансформации [18]; при этом для разных подтипов рака простаты и опухолей в целом индукция пролиферативной активности может происходить разными способами. Известно, что увеличение пролиферативной активности может достигаться за счет повышения экспрессии рецепторов факторов роста или презентации рецепторов на поверхности клетки; за счет мутаций, которые приводят к конститутивной активации сигнальных путей факторов роста; из-за нарушения механизмов, контролирующих пролиферацию, а также за счет изменений, затрагивающих нарушения процесса контактного торможения [19]. Поскольку миозин 1С участвует в регуляции везикулярного транспорта и экзоцитозе трансмембранных белков, он может оказывать влияние на презентацию рецепторов факторов роста на поверхности клетки [20]. Кроме того, миозин 1С участвует в создании и поддержании межклеточной адгезии, а значит, подавление его экспрессии может привести к нарушению контактного торможения эпителиальных клеток [6].

Мы показали, что снижение уровня экспрессии изоформы С миозина 1С ведет к повышению пролиферативной активности клеток культуры РС-3, при этом достоверно больше клеток оказывается в S – фазе клеточного цикла. В то же время нокдаун только изоформы А не влияет на пролиферативную активность, однако приводит к достоверно большому накоплению клеток в sub-G1 фазе, что свидетельствует о важности этой изоформы для выживания опухолевых клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Проточный флуориметр-сортер FACS Aria SORP входит в список приборов Программы развития МГУ.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 22-24-00714).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greenberg M., Lin T., Goldman Y., et al. Myosin IC generates power over a range of loads via a new tension-sensing mechanism // PNAS. 2012. E2433–40.
2. Bond L., Brandstaetter H., Kendrick-Jones J., et al. Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways // Cellular signalling. 2013. V. 25. P. 229–235.
3. Ihnatovych I., Migocka-Patrzalek M., Dukh M., et al. Identification and characterization of a novel myosin 1c isoform that localizes to the nucleus // Cytoskeleton. 2012. V. 69. P. 555–565.
4. Pestic-Dragovich L., Stojiljkovic L., Philimonenko A., et al. A myosin I isoform in the nucleus // Science. 2000. V. 290. P. 337–341.
5. Schwab R., Ihnatovych I., Yunus S., et al. Identification of signals that facilitate isoform specific nucleolar localization of myosin IC. // Exp Cell Res. 2013. V. 319. P. 1111–1112.
6. Tokuo H, Coluccio LM. Myosin-1c regulates the dynamic stability of E-cadherin-based cell-cell contacts in polarized Madin-Darby canine kidney cells. // Mol Biol Cell. 2013. V. 24. P. 2820–2833.
7. Arif E., Wager M., Johstone D. et al. Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Neph1 to the podocyte membrane // Molecular and cellular biology. 2011. V. 31. P. 2134–2150.
8. Diefenbach T., Latham Vol., Yimlamay D. et al. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone // J Cell Biol. 2002. V. 158. P. 1207–1217.
9. Bose A., Robida S., Furciitti P. et al. Unconventional myosin Myo1c promotes membrane fusion in a regulated exocytic pathway // Mol Cell Biol. 2004. V. 24. P. 5447–5458.
10. Stauffer E., Scarborough J., Hirono M. et al. Fast adaptation in vestibular hair cells requires myosin-1c activity // Neuron. 2005. V. 47. P. 541–553.
11. Ihnatovych I., Sielski N., Hofmann W. Selective expression of myosin IC Isoform A in mouse and human cell lines and mouse prostate cancer tissues // PlosOne. 2014. V. 9. P. e108609.
12. Saidova A., Potashnikova D., Tvorogova A. et al. Specific and reliable detection of Myosin 1C isoform A by RTqPCR in prostate cancer cells // Peer J. 2018. V. 6. P. e5970.
13. Saidova A., Potashnikova D., Tvorogova A. et al. Myosin 1C isoform A is a novel candidate diagnostic marker for prostate cancer // Plos One. 2021. V. 16. P. e0251961.
14. Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // Genome Biol. 2002. V. 3. P. research0034.1.
15. Potashnikova D., Golyshv S., Penin A. et al. FACS Isolation of Viable Cells in Different Cell Cycle Stages from Asynchronous Culture for RNA Sequencing // Methods Mol Biol. 2018. V. 1745. P. 315–335.
16. Potashnikova D., Saidova A., Tvorogova A. et al. Non-linear Dose Response of Lymphocyte Cell Lines to Microtubule Inhibitors // Front Pharmacol. 2019. V. 10. P. 436.
17. Brandstaetter H., Kishi-Itakura C., Tumbarello D., et al. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion // Autophagy. 2014. V. 10. P. 2310–2323.
18. Hanahan D., Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. V. 144. P. 646–674.
19. Ouderkirk J., Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis // Cytoskeleton. 2014. V. 71. P. 447–463.
20. Tiwari A., Jung J., Inamdar S. et al. The myosin motor Myo1c is required for VEGFR2 delivery to the cell surface and for angiogenic signaling // Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013. V. 304. P. H687–H696.

PARAMETERS OF CELL DEATH AND PROLIFERATION OF PROSTATE CANCER CELLS WITH ALTERED EXPRESSION OF MYOSIN 1C ISOFORMS

**E. S. Solomatina^a, E. N. Nishkomaeva^a, A. V. Kovaleva^{a,b}, A. V. Tvorogova^c,
D. M. Potashnikova^a, A. A. Saidova^{a,b,#}**

^a*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Lomonosov Moscow State University. Faculty of Biology, Moscow, Russian Federation*

^c*A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology MSU, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: saidova@mail.bio.msu.ru*

Presented by Academician of the RAS S.G. Georgiava

Myosin 1C is a monomeric myosin motor with a truncated tail domain. Such motors are referred as slow “tension sensors”. Three isoforms of myosin 1C differ in short N-termed amino acid sequences, the functional differences between isoforms have not been elucidated. Myosin 1C isoform A has been described as a diagnostic marker for prostate cancer, but its role in tumor transformation remains unknown. Based on data on the functions of myosin 1C, we hypothesized the potential role of myosin 1C isoforms in maintaining the tumor phenotype of prostate cancer cells. In our work, we showed that a decrease in the expression level of myosin 1C isoform C leads to an increase in the proliferative activity of prostate tumor cells.

Keywords: myosin 1C, isoforms, prostate cancer, proliferation

УДК 577.218

КОМПЛЕКС TREX-2-ORC *D. MELANOGASTER* УЧАСТВУЕТ В ЯДЕРНОМ ЭКСПОРТЕ МРНК ГИСТОНОВ

© 2024 г. М. М. Куршакова*, Ю. А. Якушева, академик РАН С. Г. Георгиева

Поступило 09.10.2023 г.

После доработки 17.10.2023 г.

Принято к публикации 21.10.2023 г.

Белковый комплекс TREX-2-ORC *D. melanogaster* необходим для экспорта большей части синтезирующихся молекул поли(А)-содержащей мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Однако, роль данного комплекса в экспорте других групп РНК остается неизвестным. Нами показано, что TREX-2-ORC участвует в ядерном экспорте мРНК гистонов: он ассоциирован с мРНК частицами гистонов, связывается с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области и участвует в экспорте мРНК гистонов из ядра в цитоплазму.

Ключевые слова: TREX-2, ORC, TREX-2-ORC, Xmas-2, PCID2, ENY2, экспорт мРНК, мРНК гистонов

DOI: 10.31857/S2686738924010089, **EDN:** I KTUYXA

Экспрессия генов состоит из нескольких этапов: синтез мРНК, формирование зрелой мРНК частицы и экспорт мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры. Экспортный рецептор NXF1 рекрутируется на мРНК через адаптерные белки, которые могут связываться с мРНК во время транскрипции, сплайсинга, формирования 3'-конца, внутриядерного транспорта мРНК к ядерным порам. NXF1 образует гетеродимер с белком p15 (гетеродимер Mex67-Mtr2 в дрожжах). Гетеродимер рецептора ядерного экспорта обеспечивает транслокацию мРНК через ядерную пору, взаимодействуя с нуклеопоринами, содержащими FG-повторы.

Одним из ключевых регуляторов экспорта мРНК является белковый комплекс TREX-2. Гомологичные TREX-2 комплексы были охарактеризованы у многих эукариот, в том числе у дрожжей и у человека. TREX-2 способен связываться с мРНК, ассоциируется с ядерными порами и необходим для экспорта мРНК в различных организмах [1–7]. Комплекс TREX-2 *D. melanogaster* состоит из белков Xmas-2, PCID2, ENY2, Sem1p [8]. Белок Xmas-2 служит платформой для сборки комплекса, с ним взаимодействуют остальные белки. Ранее в нашей

группе был очищен общий комплекс TREX-2 с белками ORC (Origin Recognition Complex) и показана роль ORC субъединиц в экспорте мРНК из ядра [9]. ORC комплекс был впервые описан у почкующихся дрожжей как комплекс, который связывается с ориджинами репликации и участвует в привлечении комплекса Mcm2–7. Впоследствии гомологичные комплексы были обнаружены и у других организмов [10]. Однако было обнаружено, что у высших эукариот ORC комплекс и его отдельные субъединицы выполняют множество различных функций, не связанных с репликацией, в частности, показано взаимодействие белков ORC с различными РНК [11]. В нашей группе было показано, что белки ORC взаимодействуют с мРНК частицами и это взаимодействие опосредовано комплексом TREX-2. Было показано, что субъединицы ORC взаимодействуют с рецептором экспорта NXF1 и необходимы для связывания NXF1 с мРНК частицей. Нокдаун компонентов ORC, так же как нокдаун компонентов TREX-2, приводит к нарушению экспорта поли(А)-содержащей РНК (мРНК) из ядра. Таким образом, было показано, что белковый комплекс TREX-2-ORC *D. melanogaster* привлекает экспортный рецептор NXF1 в состав мРНК частиц и является ключевым участником экспорта основной части синтезирующихся молекул мРНК [9]. В данной работе была поставлена задача исследовать участие TREX-2-ORC в экспорте неполиаденилируемых мРНК, кодируемых генами репликационно-зависимых гистонов.

Институт Молекулярной Биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской Академии Наук, Москва, Россия

*E-mail: kursha@mail.ru

мРНК репликационно-зависимых генов гистонов синтезируются в начале S фазы клеточного цикла и являются единственными мРНК эукариот, которые не подвергаются полиаденилированию [12]. В дальнейшем для краткости мы будем именовать их просто мРНК гистонов. Пре-мРНК гистонов не содержат интронов, их созревание включает в себя только экспирование и эндонуклеолитическое расщепление 3'-конца. На 3'-конце пре-мРНК гистонов содержат шпилечную структуру и HDE-элемент, которые направляют сборку специфического аппарата процессинга [13]. Со шпилькой связывается белок SLBP (stem-loop binding protein). С HDE-последовательностью ассоциируется 5'-конец U7 мРНК, которая образует U7 мРНК вместе с белковым комплексом, состоящим из белков слайсосомы Sm, в котором два белка SmD1 и SmD2 заменены на белки Lsm10 и Lsm11. У млекопитающих белок Lsm11 взаимодействует своим протяженным N-концом с N-концевой областью белка FLASH. Общая поверхность FLASH с Lsm11 привлекает на U7 мРНК комплекс процессинга HCC (histone cleavage complex), содержащий факторы Symplekin, CPSF73, CPSF100, CPSF160, WRD33, Cst64. Расщепление пре-мРНК гистонов осуществляется эндонуклеазой CPSF73 на расстоянии 4–5 нуклеотидов от шпильки. После расщепления зрелые мРНК гистонов быстро экспортируются из ядра в цитоплазму. Несмотря на специфическое строение мРНК гистонов было показано, что они также экспортируются при помощи рецептора NXF1 [14,15]. В данной работе мы показали, что комплекс TREX-2-ORC, ассоциирован с мРНК частицами гистонов, связывается с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области и участвует в экспорте мРНК.

TREX-2-ORC комплекс ассоциирован с мРНК частицами гистонов

Была поставлена задача исследовать взаимодействие комплекса TREX-2-ORC с мРНК частицами гистонов. Ранее в очищенном общем TREX-2-ORC комплексе были найдены ORC субъединицы Orc1, Orc3, Orc4, Orc5, Orc6 [9]. Взаимодействие комплекса с мРНК гистонов было протестировано для TREX-2 субъединиц Xmas-2, PCID2, ENY2 и для ORC белков Orc3, Orc5, Orc6. Для этого был применен метод соосаждения РНП частиц антителами (RIP) из ядерного экстракта S2 клеток. Антитела к белкам – компонентам TREX-2 и ORC эффективно осаждали мРНК генов гистонов *H2A* и *H3* (рис. 1, а), что указывает на взаимодействие комплекса TREX-2-ORC с мРНК частицами данных гистонов. Аналогичные данные были получены для мРНК *H4* и *H2B*. В качестве положительного

контроля показано взаимодействие TREX-2-ORC с поли(А)-содержащей мРНК β -тубулина, которое было продемонстрировано ранее [9].

Далее взаимодействие было подтверждено с помощью альтернативного подхода: мРНК частицы, содержащие транскрипт гена *H3*, выделяли из ядерного экстракта S2 клеток при помощи биотинилированного антисмыслового РНК-зонда к мРНК гистона *H3* (рис. 1, б). Антисмысловый РНК-зонд специфически ассоциируется с соответствующей эндогенной РНК в экстракте, осаждая РНП частицу. Связавшие с РНК-зондом мРНК частицы осаждали из экстракта при помощи стрептавидин-агарозы, белки мРНК анализировали при помощи Вестерн-блот анализа с антителами к компонентам TREX-2 и ORC. В качестве отрицательного контроля проводили осаждение с антисмысловой последовательностью к РНК белка YFP (K-). Субъединицы комплексов TREX-2 и ORC, белки Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, а также факторы процессинга CPSF73, CPSF100 соосаждались с *H3* мРНК, но отсутствовали в отрицательном контроле. Таким образом, комплекс TREX-2-ORC способен ассоциироваться с мРНК частицами гистонов.

TREX-2-ORC ассоциируется с мРНК H3 в 3'-концевой части кодирующей области

С целью локализовать участок мРНК *H3*, с которым ассоциируется TREX-2-ORC, биотинилированные смысловые РНК-зонды, соответствующие различным участкам последовательности РНК *H3* инкубировали с ядерным экстрактом S2 клеток и далее определяли связавшиеся с РНК-зондами белки. Зонды соответствовали полноразмерному (*H3*), N- и C-концевым участкам кодирующей области длиной 411 нт (CDS1: 1–204 нт и CDS2: 204–411 нт, соответственно) и 3'-нетранслируемой области пре-мРНК *H3* (3'UTR: 412–595 нт) (рис. 1в). Белки Xmas-2, PCID2, Orc3 и Orc6 преимущественно ассоциировались с CDS2 последовательностью. Используемые в качестве контрольных факторы процессинга CPSF73, CPSF100 ассоциировались с 3'UTR зондом, в котором содержатся шпилечная структура и HDE-элемент, направляющие сборку аппарата процессинга, что подтверждает специфичность выявленных взаимодействий. ENY2 соосаждался как с CDS2, так и с 3'UTR РНК-зондом, что можно объяснить свойством ENY2 привлекаться в различные белковые комплексы. Белки не взаимодействовали с контрольным РНК-зондом. Таким образом, белки TREX-2-ORC комплекса ассоциируются с кодирующей последовательностью РНК гистона *H3* в 3'-концевой части кодирующей области.

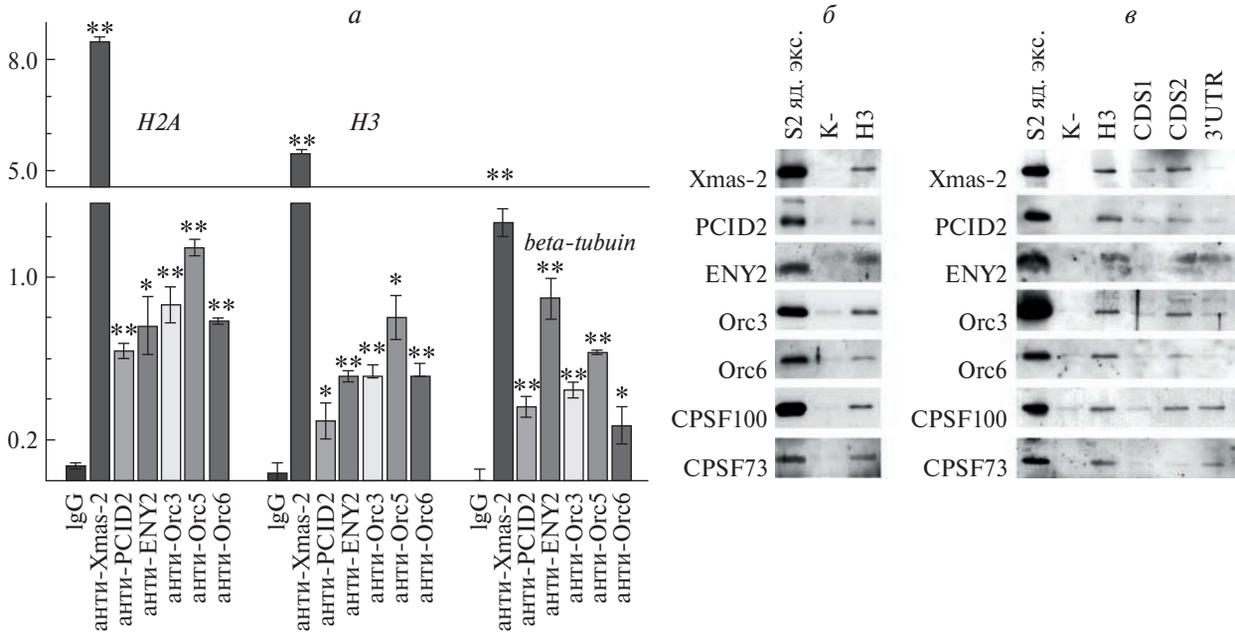


Рис.1. TREX-2-ORC ассоциирован с мРНК гистонов. (а) Результаты иммуноосаждения мРНК частиц генов *H2A*, *H3* и *β-tubulin* антителами к субъединицам TREX-2-ORC, в качестве отрицательного контроля использованы IgG. Результаты представлены в процентах от исходного материала. Все данные представлены как среднее ± стандартное отклонение, для сравнения контроля и эксперимента использовался t-критерий Стьюдента. (*) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.05, (**) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.01. (б) Вестерн-блот анализ осаждения *H3* мРНК частиц с биотинилированным антисмысловым РНК-зондом к мРНК гистона *H3* с использованием антител к Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, CPSF100, CPSF73. В отрицательном контроле (К-) использован РНК-зонд с антисмысловой последовательностью к РНК белка YFP. (в) Вестерн-блот анализ осаждения белков с биотинилированными смысловыми РНК-зондами к последовательностям мРНК гистона *H3*: полноразмерной (*H3*), CDS1, CDS2, 3'UTR, с использованием антител к Xmas-2, PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, CPSF100, CPSF73. В отрицательном контроле (К-) использован РНК-зонд с антисмысловой последовательностью к РНК YFP.

TREX-2-ORC участвует в экспорте мРНК гистонов

Затем мы исследовали участие TREX-2-ORC в экспорте мРНК гистонов из ядра в цитоплазму. Белок Xmas-2 является платформой, с которой ассоциированы остальные белки TREX-2-ORC комплекса: PCID2 ассоциирован с областью Xmas-2 вблизи GANP-домена, ENY2 – с CID-доменом Xmas-2, из всех ORC субъединиц комплекса Orc3 сильнее всего связывается Xmas-2, взаимодействуя вместе с ENY2 с С-концом Xmas-2 [16,17].

Поэтому с целью снизить уровень TREX-2-ORC комплекса был проведен нокдаун Xmas-2 в S2 клетках методом РНК-интерференции. При нокдауне Xmas-2 уровень экспрессии белка значительно снижался, при этом уровни экспрессии субъединиц PCID2, ENY2, Orc3, Orc6 заметно не изменялись (рис. 2, а). Методом RIP-анализа было исследовано, нарушает ли нокдаун Xmas-2 взаимодействие TREX-2-ORC с мРНК гистонов. Нокдаун Xmas-2 приводил к уменьшению количества ассоциированных с мРНК гистонов как Xmas-2, так и белков

PCID2, ENY2, Orc3, Orc6, то есть к уменьшению связывания TREX-2-ORC с мРНК частицами гистонов. Результаты приведены для *H3* мРНК (рис. 2, б).

Далее было исследовано, как влияет нарушение взаимодействия мРНК гистона *H3* с TREX-2-ORC комплексом на ее экспорт из ядра в цитоплазму. Для этого был проведен анализ распределения мРНК *H3* в клетках S2 при нокдауне ключевых для взаимодействия комплекса с NXF1 и мРНК частицей субъединиц Xmas-2 и Orc3 методом флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с DIG-меченой антисмысловой РНК-пробой к кодирующей последовательности гена *H3* (рис. 2, з, 2, д). Так как мРНК гистонов синтезируется в S фазе и подвергается деградации после окончания S фазы, FISH-сигнал мРНК детектировался только в части клеток. В контрольном эксперименте FISH-сигнал *H3* мРНК детектировался в основном в цитоплазме клеток. Нокдаун NXF1 приводил к задерживанию *H3* мРНК в ядре, как и было показано в литературе [15]. Нокдаун Xmas-2 и нокдаун Orc3 также приводили к нарушениям экспорта мРНК в некоторой части клеток с *H3* FISH-сигналом (около 20–30%):

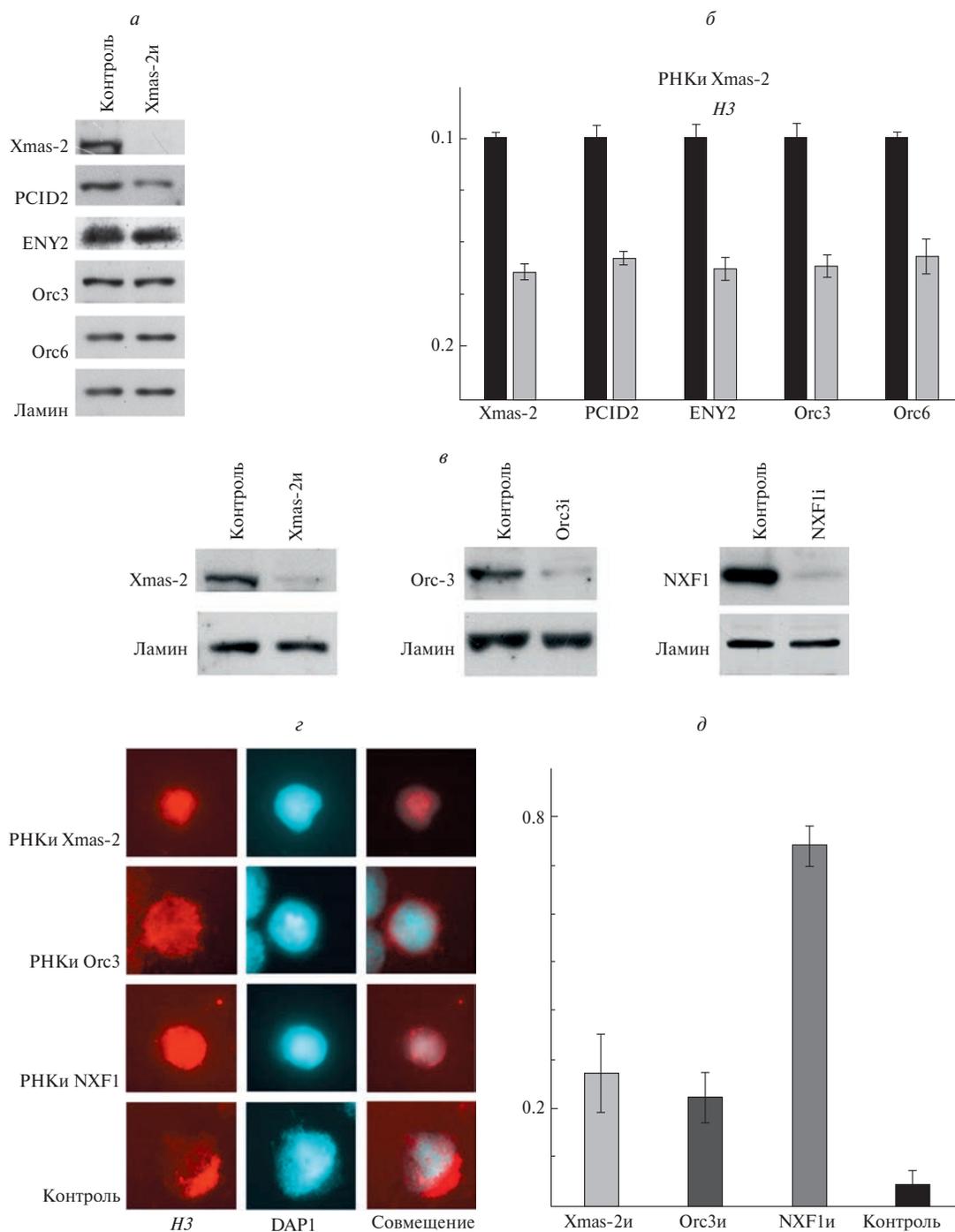


Рис. 2. Эффект нокадаун субъединиц TREX-2-ORC на экспорт мРНК гистонов. (а) Вестер-блот анализ уровней экспрессии белков при РНК-интерференциях Xmas-2, Orc3 в S2 клетках при помощи соответствующих антител. В качестве выравнивающего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. (б) Результаты иммуноосаждения мРНК частиц гистонов при РНК-интерференциях Xmas-2 с антителами к субъединицам TREX-2-ORC, в качестве отрицательного контроля использованы IgG. Результаты представлены в процентах от исходного материала. Все данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение, для сравнения контроля и эксперимента использовался t-критерий Стьюдента. (*) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.05 , (**) указывает на статистическую значимость с p -value < 0.01 . (в) Вестер-блот анализ РНК-интерференций Xmas-2, Orc3, NXF1 с использованием антител к одноименным белкам. В качестве выравнивающего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. (г) FISH-гибридизация с антисмысловой РНК-пробой к H3 мРНК при РНК-интерференциях (РНКи) Xmas-2, Orc3, NXF1 в S2 клетках. В качестве отрицательного контроля (Контроль) проведена РНК-интерференция с дцРНК белка GFP. (д) Доля S2-клеток с нарушениями экспорта H3 мРНК при нокадаунах Xmas-2, Orc3, NXF1 или GFP (Контроль).

накоплению РНК в ядре или равномерному распределению между ядром и цитоплазмой. (рис. 2г, 2д). Таким образом, снижение количества TREX-2-ORC, связанного с мРНК частицами гистонов, приводит к нарушению ядерного экспорта их мРНК. То, что нарушение экспорта наблюдается только в части клеток можно объяснить тем, что в привлечении NXF1 на мРНК гистонов кроме комплекса TREX-2-ORC участвуют и другие адаптеры: SR-белки 9G8 и SRp20 [18] и белок ALYREF [19].

Ранее мы показали, что TREX-2-ORC комплекс ассоциируется с основным рецептором экспорта NXF1 и служит адаптером для связывания NXF1 с поли-А-содержащими мРНК генов [9]. мРНК гистонов экспортируются при помощи NXF1 [15]. Мы показали, что TREX-2-ORC комплекс входит в состав мРНК и связывается с неполиаденилируемыми мРНК гистонов. То, что нокдаун комплексообразующих субъединиц TREX-2-ORC приводит к нарушению связывания комплекса с мРНК гистонов и нарушению их экспорта в некоторой части S2 клеток, позволяет предположить, что TREX-2-ORC также служит одним из адаптеров для NXF1-зависимого экспорта неполиаденилируемых мРНК гистонов, возможно, участвуя в экспорте на определенном этапе регуляции экспрессии в ходе клеточного цикла.

Ранее было обнаружено несколько адаптеров, через взаимодействие с которыми экспортный рецептор NXF1 привлекается на мРНК гистонов. В клетках млекопитающих и ооцитах лягушки было показано, что SR-белки 9G8 и SRp20 связываются со специфическим транспортным цис-элементом в кодирующей области *H2A* мыши [18]. В клетках человека основной экспортный адаптер ALYREF связывается с гистоновой мРНК в области, расположенной с 5'-конца от места расщепления, с пиком в области 50 нт [19]. По нашим данным TREX-2-ORC также преимущественно связывается с мРНК гистонов в 3'-концевой части кодирующей области. Но в то время, как связывание ALYREF с мРНК гистонов происходит котранскрипционно и ассоциировано с посадкой аппарата процессинга [19], TREX-2-ORC может привлекаться в мРНК гистонов не в ходе транскрипции, а на более позднем этапе экспортного пути мРНК частиц в ядре от сайтов транскрипции до ядерных пор. На это указывают данные о том, что нокдаун компонентов TREX-2 не влияет на процессинг поли(А)-содержащих модельных мРНК [20].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-24-00721.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fischer T., Strasser K., Racz A., et al. // The EMBO journal. 2002. V. 21. № 21. P. 5843–5852.
2. Rodríguez-Navarro S., Fischer T., Luo M.J., et al. // Cell. 2004. V. 116. № 1. P. 75–86.
3. Jani D., Lutz S., Hurt E., et al. // Nucleic acids research. 2012. V. 40. № 10. P. 4562–4573.
4. Jani D., Lutz S., Marshall N.J., et al. // Molecular cell. 2009. V. 33. № 6. P. 727–737.
5. Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E. and Stewart M. // Nature structural & molecular biology. 2012. V. 19. № 3. P. 328–336.
6. Dimitrova L., Valkov E., Aibara S., et al. // Structure. 2015. V. 23. № 7. P. 1246–1257.
7. Jani D., Valkov E., Stewart M. // Nucleic acids research. 2014. V. 42. № 10. P. 6686–6697.
8. Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., et al. // The EMBO journal. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
9. Kopytova D., Popova Vol., Kurshakova M., et al. // Nucleic acids research. 2016. V. 44. № 10. P. 4920–4933.
10. Bleichert F. // Current opinions in structural biology. 2019. V. 59. P. 195–204.
11. Popova Vol., Brechalov A. // Nonreplicative functions of the origin recognition complex. 2018. V. 9. P. 460–473.
12. Duronio R.J., Marzluff W.F. // RNA biology. 2017. V. 14. № 6. P. 726–738.
13. Sun Y., Zhang Y., Aik W.S., et al. // Science. 2020b. V. 367. P. 700–703.
14. Huang Y., Gattoni R., Stevenin J. and Steitz J.A. // Molecular Cell. 2003. V. 11. P. 837–843.
15. Erkmann J.A., Sanchez R., Treichel N., et al. // RNA. 2005. V. 11. P. 45–58.
16. Popova Vol.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. // Biochemistry and molecular biology journal. 2016. V. 2. P. 2–14.
17. Куршакова М. М., Копытова Д. В., Георгиева С. Г. // Доклады АН. 2021. Т. 496. С. 66–69.
18. Huang Y., Steitz J.A. // Molecular Cell. 2001. V. 7. P. 899–905.
19. Fan J., Wang K., Du X., et al. // The EMBO Journal. 2019.
20. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., et al. // Genes and Development. 2009. V. 24. P. 86–96.

**TREX-2-ORC COMPLEX OF *D. MELANOGASTER* PARTICIPATES
IN NUCLEAR EXPORT OF HISTONE MRNA****M. M. Kurshakova[#], Y. A. Yakusheva, Academician of the RAS S. G. Georgieva***Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, Russian Federation*[#]*E-mail: kursha@mail.ru*

The TREX-2-ORC protein complex of *D. melanogaster* is necessary for the export of the bulk of synthesized poly(A)-containing mRNA molecules from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores. However, the role of this complex in the export of other types of RNA remains unknown. We have shown that TREX-2-ORC participates in the nuclear export of histone mRNAs: it associates with histone mRNPs, binds to histone H3 mRNA at the 3'-terminal part of the coding region, and participates in the export of histone mRNAs from the nucleus to the cytoplasm.

Keywords: TREX-2, ORC, TREX-2-ORC, Xmas-2, PCID2, ENY2, mRNA export, histone mRNA

УДК 57.085.23

ИММУНОЛИПОСОМЫ КАК ПЕРСПЕКТИВНОЕ ПРОТИВОВИРУСНОЕ СРЕДСТВО К SARS-COV-2

© 2024 г. Т. В. Бобик¹, М. А. Симонова¹, Н. Ю. Рушкевич¹, Н. Н. Костин¹, Г. А. Скрябин¹, В. Д. Кнорре¹, А. А. Шульга¹, Е. В. Коновалова¹, Г. М. Прошкина¹, академик РАН А. Г. Габибов^{1,2}, академик РАН С. М. Деев^{1,3}

Поступило 24.09.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принято к публикации 21.10.2023 г.

Согласно статистическим данным Всемирной организации здравоохранения, в Российской Федерации с 03.01.2020 г по 13.09.2023 г выявлено примерно 23 млн подтвержденных случаев заболевания коронавирусом COVID-19, около 400 тыс. из которых закончились смертельным исходом. Учитывая высокую скорость мутации РНК-содержащего генома вируса, что неизбежно ведет к появлению новых инфекционных штаммов (эриса и пиролы), поиск лекарственных противовирусных средств по-прежнему является актуальной задачей, а с учетом активно мутирующего рецептор-связывающего домена эта задача требует принципиально новых решений. В данном исследовании предложен кандидатный иммунолипосомный препарат, таргетированный к S-белку SARS-CoV-2 с помощью моноклонального нейтрализующего антитела P4A1 и обеспечивающий проникновение в зараженную вирусом клетку высокоактивной рибонуклеазы, осуществляющей деградацию, в том числе, и вирусной РНК. Показано увеличение более чем в 40 раз нейтрализующей активности разработанного препарата в сравнении со свободным моноклональным нейтрализующим антителом.

Ключевые слова: иммунолипосомы, вируснейтрализация, барназа

DOI: 10.31857/S2686738924010099, **EDN:** I KRWHSS

ВВЕДЕНИЕ

В 2020 г человечество пережило пандемию коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. Однако говорить о том, что инфекция побеждена не приходится: в популяции по-прежнему происходит возникновение новых более агрессивных штаммов коронавируса, приводящих не только к инфицированию, но и к летальным исходам. Так, по состоянию на сентябрь 2023 года коронавирус SARS-CoV-2 инфицировал более 770 млн человек, число погибших от COVID-19 во всем мире превысило 6.9 млн человек [1].

К настоящему времени одобрены для использования и продолжают проходить клинические испытания большое количество препаратов на основе нейтрализующих моноклональных антител (nAb), действие которых обусловлено связыванием с эпитопами рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2, блокированием его взаимодействия с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) и подавлением, таким образом, инфицирования клеток хозяина. Препятствием к созданию универсального иммунопрепарата является значительная мутагенность RBD домена вирусного S-белка. Рекомендуемые для терапии COVID-19 препараты содержат значительные дозы рекомбинантных антител (400–2400 мг при однократном введении) [2], что может провоцировать нежелательные явления в некоторых случаях. Снижение дозы терапевтических антител, таким образом, было бы оправдано как с точки зрения биобезопасности, так и с экономической точки зрения. В этой связи особое значение приобретает подход, связанный с адресной доставкой препарата в зараженную вирусом клетку. Одним из подходов, позволяющих снизить концентрации терапевтического антитела, является применение конъюгатов антител с цитотоксическим

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

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

³ Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

E-mail: bobik_tanya@mail.ru

агентом. В частности, в качестве цитотоксического агента используются липосомы, нагруженные токсинами различной природы (органической и неорганической) – иммунолипосомы. Данный подход был успешно реализован в ряде работ [3–5], демонстрирующих улучшение терапевтического индекса препарата. Отметим, что липосомальная форма доставки лекарства имеет такие преимущества как: защита инкапсулированного лекарства от ферментативной деградации и быстрого клиренса *in vivo*, снижение иммуногенности включенных в липосому белковых препаратов, снижение общей токсической нагрузки от инкапсулированного токсина на организм. Кроме того, применение иммунолипосом позволяет расширять количество потенциальных мишеней при одном виде цитотоксических липосом за счет простой смены векторной молекулы на поверхности липосомы.

Известно, что вследствие взаимодействия таргетированных к поверхностному вирусному белку липосом с вирусными частицами и последующего их слияния, наблюдается перенос содержимого липосом внутрь вирусной частицы [6]. Мы предположили, что рибонуклеаза, содержащаяся внутри липосомальных частиц, которые таргетированы к поверхностному белку сложных РНК-содержащих вирусов, таким образом может доставляться внутрь содержимого вируса и/или инфицированной клетки и обеспечивать вируснейтрализующий эффект за счет частичного гидролиза РНК содержимого вируса и/или инфицированной клетки. В данной работе нами показано, что конъюгирование нейтрализующего антитела Р4А1 [7] с липосомальными частицами, несущими внутри рибонуклеазу барназу увеличивает более чем в 40 раз нейтрализующую активность антитела Р4А1 в псевдовирусной системе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение таргетированных липосомальных препаратов

В качестве цитотоксического компонента, воздействующего на вирусную РНК, использовали рибонуклеазу барназу из *Bacillus amyloliquefaciens*. Загрузку барназы в липосомы осуществляли на основе электростатического взаимодействия между положительно заряженным белком (при нейтральных значениях рН) и отрицательно заряженной внутренней поверхностью липосом. Липосомы формировали из природных фосфолипидов, содержащих 20% фосфатидилэтаноламина. Инкубация суспензии фосфолипидов с небольшой, гидрофильной и положительно заряженной (при нейтральных значениях рН) барназой, при низкой ионной силе в результате продавливания через

поликарбонатный фильтр с размером пор 100 нм, приводит к образованию липосом с диаметром около 90–100 нм. Модификацию внешней поверхности липосом осуществляли по аминокетогруппам фосфотидилэтаноламина с использованием 2-иминотолана (реагент Траута, позволяющий ввести SH-группу по первичным аминам фосфолипида, финальная концентрация в реакционной смеси 6 мМ) как описано в [8]. Рекомбинантное антитело Р4А1 или пептид G3, который использовали в качестве отрицательного контроля, конъюгировали со 100-кратным молярным избытком sulfo-EMCS (N-ε-maleimidocaproyl-oxysulfosuccinimideester, билинкер, позволяющий ввести в белок через оксисульфосукцинимидмалеимидную группу). Липосомы, содержащие на своей поверхности SH-группы, антитело Р4А1 или пептид G3 с малеимидной группой, предварительно очищенные с помощью гель-проникающей хроматографии (сорбент сефадекс G-25, Cytiva) от избытка непрореагировавших реагентов, далее конъюгировали вместе с получением таргетированных липосом Р4А1-ЛБ и G3-ЛБ соответственно. Адресные модули Р4А1 или пептид G3, непрореагировавшие с липосомами, отделяли от адресных липосом с использованием гель-проникающей хроматографии на колонке, упакованной сорбентом сефароза CL2В. Таргетированные липосомы Р4А1-ЛБ и G3-ЛБ при этом сходят с колонки в исключенном объеме, в то время как Р4А1 и пептид G3 – в полном объеме колонки. Препарат Р4А1-Л получали конъюгированием пустых липосом с антителом Р4А1 аналогичным образом. Под пустыми липосомами понимается препарат липосом, внутренняя водная фаза которого не содержит цитотоксического компонента.

Количественное определение Р4А1 антитела методом ИФА

В лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного рецептор-связывающий домена S-белка SARS-CoV-2 (RBD) в фосфатно-солевом буфере (PBS) в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8 °С. После блокировки свободных сайтов связывания блокирующим буфером (PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% БСА) вносили образцы анализируемых препаратов и раствор антитела Р4А1 известной концентрации в блокирующем буфере в разведениях и инкубировали в течение 30 мин при 37°С. После 30-минутной инкубации при 37°С и промывки в лунки планшета добавляли раствор антител к Fc-фрагменту антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (SigmaAldrich, США, кат. № AP113P), в разведении 1:10000 в блокирующем буфере, планшет инкубировали в течение 30 мин. По окончании инкуба-

ции и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты, измеряли величины ОП450 в лунках планшета на планшетном спектрофотометре. Строили кривую зависимости величин ОП450 от концентрации антитела Р4А1 и использовали ее для вычисления концентраций антитела Р4А1 в образцах липосомальных препаратов.

Определение нейтрализующей активности в псевдовирусной системе

Оценку нейтрализующей активности проводили с использованием псевдотипированных лентивирусов, несущих S-белок SARS-CoV-2 [9] по методике, описанной в работе [10], используя в качестве контроля растворы антитела Р4А1 известной концентрации. Серийные образцы анализируемых липосомальных препаратов готовили разведением исследуемых препаратов в среде DMEM с 10% FBS. Кривые зависимости величин люминесцентных сигналов от разведений препаратов строили с помощью ПО GraphPadPrism 8 и вычисляли концентрацию веществ, обеспечивающие нейтрализацию IC₄₀ псевдовируса.

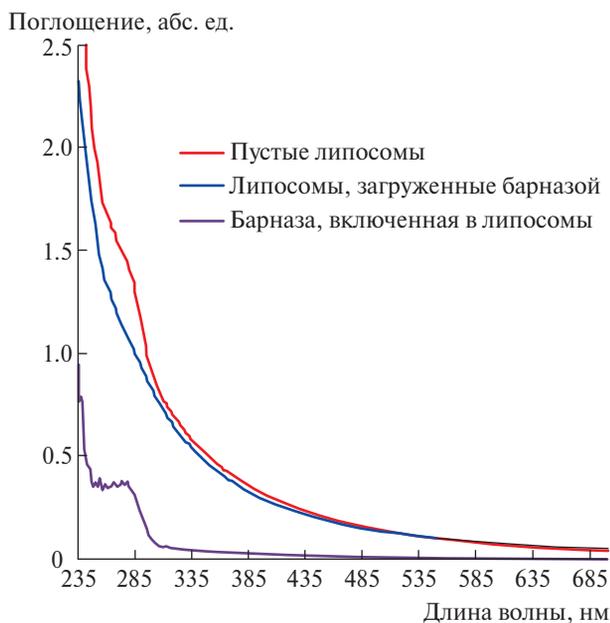


Рис. 1. Спектры поглощения липосом. Красная и синяя кривые — спектры поглощения липосом, загруженных барназой, и пустых липосом, соответственно. Сиреневая кривая — спектр поглощения барназы, загруженной в липосомы, который получен вычитанием спектра поглощения пустых липосом из спектра поглощения протеолипосом.

Определение цитотоксического действия липосом *in vitro*

Цитотоксическое действие липосомальных препаратов в отношении клеточной линии НЕК293Т-ACE2, определяли с использованием стандартного МТТ-теста [11]. Клетки рассеивали в 96-луночный планшет в количестве 1.5×10^3 клеток/лунку и культивировали в течение ночи. Ростовую среду заменяли на свежую, содержащую различные концентрации (0, 0.005 и 0.05 нМ) липосом, и инкубировали клетки в течение 72 ч при 37°C. По окончании инкубации клетки промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в свежей среде, содержащей 0,5 мг/мл МТТ в течение 1 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде. Оптическую плотность в лунках измеряли с использованием планшетного флуориметра Tecan Infinity при 570 нм. Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали, как отношение усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными (контрольными) клетками и выражали в процентах.

Обработка данных

На рисунках (если не указано иначе) представлены данные не менее трех независимых экспериментов, обработку данных проводили с помощью программного обеспечения GraphPadPrism8 (GraphPadSoftwar, США)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Загрузку барназы в липосомы оценивали спектрофотометрически. Для этого из спектра поглощения протеолипосом вычитали спектр пустых липосом (рис. 1). Концентрацию белка рассчитывали, используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{280} = 26930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Концентрация барназы в липосомах составила 13.3 мкМ. Концентрацию липосом, загруженных барназой, оценивали спектрофотометрически, сравнивая спектр пустых и протеолипосом.

Как видно из рис. 1, спектр протеолипосом совпадает со спектром пустых липосом, полученных 17-кратным продавливанием суспензии фосфолипидов (1.1 мг/мл) через фильтр с диаметром пор 100 нм. Ранее с использованием гидрофильного мембранонепроницаемого красителя фталоцианин-3,4',4'',4'''-тетрасульфата меди мы показали, что 1 мг/мл суспензии липидных везикул соответствует 1.2 нМ [8]. Поскольку спектр загруженных барназой липосом совпадает со спектром пустых

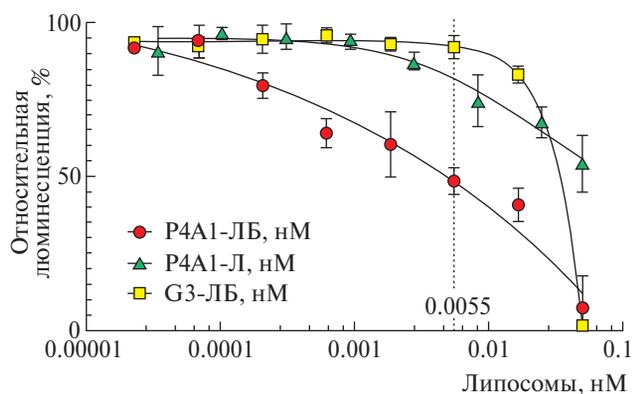


Рис. 2. Зависимость интенсивности люминесценции клеток линии НЕК293Т-ACE2, экспрессирующих на поверхности рецептор ACE2 человека, от концентрации липосомальных препаратов в псевдовиральной системе.

липосом с концентрацией 1.1 мг/мл, концентрация загруженных белком липосом составляет 1.3 нМ. Для селективной элиминации псевдовиральных частиц, содержащих на своей поверхности ген S-белка, внешнюю поверхность липосом ковалентно модифицировали рекомбинантным нейтрализующим антителом P4A1, специфичным к S-белку вируса SARS-CoV-2 (P4A1-ЛБ).

Антитело P4A1 получено скринингом В-клеток индивидуума, перенесшего COVID-19 [7]. Данное антитело специфично и эффективно ($KD = 1.02 \cdot 10^{-10} M$) связывает рецептор-связывающий домен S-белка SARS-CoV-2 (RBD), блокируя его взаимодействие с ACE2. Для оценки специфичности препарата P4A1-ЛБ получали препарат G3-ЛБ, ковалентно модифицируя внешнюю поверхность липосом, содержащих барназу, пептидом G3. Пептид G3 представляет собой белок неиммуноглобулиновой природы, способный высокоспецифично ($KD = 0.9 \cdot 10^{-9} M$) взаимодействовать с рецептором II эпидермального фактора роста человека [12]. Для оценки вклада барназы в нейтрализующую активность препарата P4A1-ЛБ получали препарат P4A1-Л, ковалентно модифицируя внешнюю поверхность пустых липосом антителом P4A1. Нейтрализующую активность полученных препаратов, а также интактного антитела P4A1, оценивали с помощью псевдовиральной системы с использованием псевдотипированных S-белком SARS-CoV-2 лентивирусов, кодирующих люциферазу светлячка (Luc) [10].

Все три исследуемых препарата демонстрируют нейтрализующую активность, обусловленную, по-видимому, разной природой (рис. 2). В случае препарата G3-ЛБ, имеющего в качестве направля-

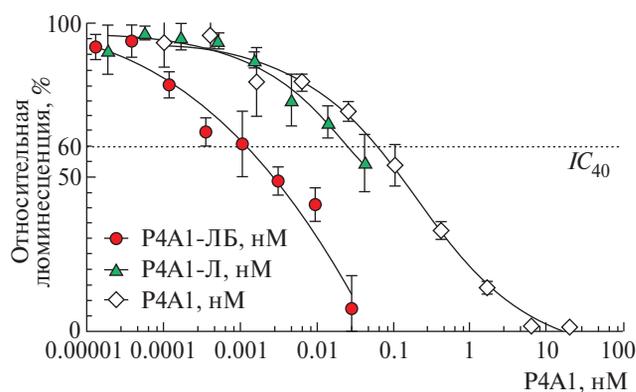


Рис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции клеток линии НЕК293Т-ACE2, экспрессирующих на поверхности рецептор ACE2 человека, от концентрации антитела P4A1 в составе липосомальных препаратов и буферного раствора в псевдовиральной системе.

ющей молекулы пептид G3, не обладающего способностью связываться с S-белком SARS-CoV-2, нейтрализующая активность проявляется при концентрации липосом более 0.0055 нМ. Этот эффект, возможно, реализуется за счет неспецифического связывания липосомальных частиц с поверхностью псевдовиральных и/или клеток и дальнейшего слияния с ними. Барназа, высвобождающаяся после слияния, проявляет РНКазную активность в отношении вирусного генома в составе псевдовиральных и/или цитоплазматической РНК зараженных клеток, что приводит к снижению синтеза маркерного белка люциферазы. Для исключения возможного объяснения наблюдаемого падения люминесценции гибелью клеток вследствие цитотоксического эффекта неспецифической интернализации липосом, содержащих барназу, мы изучили изменения жизнеспособности клеток линии НЕК293Т-ACE2, обработанных и необработанных препаратами G3-ЛБ, P4A1-ЛБ и P4A1-Л, с использованием стандартного МТТ-теста [11]. Полученные данные не выявили статистической разницы в жизнеспособности клеток линии НЕК293Т-ACE2 между обработанными и необработанными клетками для всех исследуемых препаратов, что свидетельствует об отсутствии значимого цитотоксического действия исследуемых липосомальных препаратов в диапазоне концентраций 0–0.05 нМ.

В случае препарата P4A1-Л, не содержащего барназу, нейтрализующая активность обусловлена концентрационно-зависимым блокированием антителом P4A1 S-белка SARS-CoV-2 на поверхности псевдовиральных, что в свою очередь препятствует взаимодействию с рецептором ACE2 и дальнейшему проникновению псевдовиральных в клетки. В слу-

чае препарата Р4А1-ЛБ мы можем предположить, что нейтрализующая активность достигается за счет синергического эффекта, обусловленного концентрационно-зависимым блокированием проникновения псевдовирюсов, как в случае препарата Р4А1-Л, так и РНК-азной активности барназы, как в случае препарата G3-ЛБ. Для корректного сравнения нейтрализующей активности полученных липосомальных препаратов Р4А1-ЛБ и Р4А1-Л определяли концентрацию конъюгированного антитела Р4А1 в составе препаратов методом ИФА. Поскольку для препарата Р4А1-ЛБ значения люминесценции для концентраций Р4А1 выше 0.0028 нМ, соответствующих концентрациям липосом более 0.0055 нМ, могут быть занижены вследствие влияния неспецифической интернализации барназы, то сравнение нейтрализующей активности проводили, определяя ингибирующую концентрацию 40 % (IC_{40}). Согласно полученным данным (рис. 3) нейтрализующая активность липосомальных препаратов Р4А1-Л и Р4А1-ЛБ (IC_{40} 17 ± 9 и 1.2 ± 0.9 рМ соответственно) выше таковой свободного антитела Р4А1 (IC_{40} 55 ± 6 рМ). Эти данные позволяют сделать вывод о том, что липосомальные частицы вносят значительный вклад в нейтрализацию взаимодействия S-белка псевдовирюса с рецептором ACE2. Данный эффект может быть объяснен несколькими механизмами.

Возможно, липосомы эффективно экранируют взаимодействие свободных молекул S-белка с рецептором ACE2, предупреждая инфекцию клеток. Также возможен эффект «экстракции» молекул S-белка с поверхности псевдовирюсов липосомальными частицами [13]. Значительное увеличение нейтрализующей активности Р4А1-ЛБ (IC_{40} 0.12 ± 0.09 рМ) по сравнению с Р4А1-Л (IC_{40} 1.7 ± 0.9 рМ) обусловлено проявлением РНКазной активности по отношению к вирусному геному псевдовирюсов и/или РНК молекул инфицированных клеток вследствие высвобождения барназы из липосомных частиц.

Таким образом, в результате данной работы были получены иммунолипосомы, таргетированные к S-белку вируса SARS-CoV-2 рекомбинантным нейтрализующим антителом Р4А1, содержащие (Р4А1-ЛБ) и не содержащие (Р4А1-Л) внутри РНКазу барназу. Показано, что липосомальные препараты Р4А1-ЛБ и Р4А1-Л обладают нейтрализующей активностью выше активности свободного нейтрализующего антитела Р4А1. А препарат иммунолипосом Р4А1-ЛБ обладает нейтраллизующей активностью более чем в 40 раз превышающей активность нейтрализующего антитела Р4А1. В то же время предложенный в этой статье подход продемонстрирован на примере таргетированных липосом к конкретному вирусу. Но эта методология, включающая использование антитела Р4А1 в ка-

честве направляющей молекулы, не может рассматриваться как универсальное средство для создания противокоронавирусных препаратов в силу мутагенеза, обычно приводящего к изменению параметров взаимодействия уже известных связывающих и нейтрализующих антител (в том числе и Р4А1) с вирусными белками. Поэтому для создания препаратов в этом и других случаях будут требоваться исследования специфичности взаимодействия таргетной липосомы и мишени на поверхности вируса.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке грата Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение №075-15-2021-1049.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов у авторов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>
2. *Widyasari K., Kim J.* A review of the currently available antibody therapy for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19) // *Antibodies*. 2023. V. 12. № 1. P. 5.
3. *Lu L., Ding Y., Zhang Y., et al.* Antibody-modified liposomes for tumor-targeting delivery of timosaponin AIII // *Int. J. Nanomedicine*. 2018. V. 13. P. 1927–1944.
4. *Di J., Xie F., Xu Y.* When liposomes met antibodies: Drug delivery and beyond // *Adv. Drug Deliv.* 2020. V. 154–155. P. 151–162.
5. *Park J. W., Kirpotin D. B., Hong K., et al.* Tumor targeting using anti-her2 immunoliposomes // *Journal of Controlled Release*. 2001. V. 74. P. 95–113.
6. *Ott S., Wunderli-Allenspach H.* Liposomes and influenza viruses as an in vitro model for membrane interactions I. Kinetics of membrane fusion and lipid transfer // *Eur J Pharm Sci*. 1994. V. 1. № 6. P. 323–332.
7. *Guo Y., Huang L., Zhang G., et al.* A SARS-CoV-2 neutralizing antibody with extensive Spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 2623.
8. *Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., et al.* Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARP in-functionalized liposomes // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
9. *Kruglova N., Siniavin A., Gushchin Vol., et al.* Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera // *Viruses*. 2021. V. 13. P. 1133.
10. *Kostin N. N., Bobik T. V., Skryabin G. A., et al.* An ELISA platform for the quantitative analysis of SARS-CoV-2

- RBD-neutralizing antibodies as an alternative to monitoring of the virus-neutralizing activity // *Acta Nat.* 2022. V. 14. P. 109–119.
11. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J Immunol Methods.* 1983. V. 65 (1–2). P. 55–63.
12. *Jost C., Schilling J., Tamaskovic R. et al.* A. Structural basis for eliciting a cytotoxic effect in HER2-overexpressing cancer cells via binding to the extracellular domain of HER2 // *Structure.* 2013. V. 21. P. 1979–1991.
13. *Zhang Z., King M.R.* Neutralization of the new coronavirus by extracting their spikes using engineered liposomes // *Nanomedicine.* 2023. V. 50. P. 102674.

IMMUNOLIPOSOMES AS A PROMISING ANTIVIRAL AGENT AGAINST SARS-COV-2

**T. V. Bobik^{a, #}, M. A. Simonova^a, N. U. Rushkevich^a, N. N. Kostin¹, G. A. Skryabin^a,
V. D. Knorre^a, A. A. Schulga^a, E. V. Konovalova^a, G. M. Proshkina^a,
Academician of the RAS A. G. Gabibov^{a, b}, Academician of the RAS S. M. Deev^{a, c}**

^a*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

^b*M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

^c*National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation*

[#]*E-mail: bobik_tanya@mail.ru*

According to the World Health Organization, as of September 13, 2023, there have been approximately 23 million confirmed cases of COVID-19 reported in the Russian Federation, about 400 thousand of which were fatal. Considering the high rate of mutation of the RNA-containing virus genome, which inevitably leads to the emergence of new infectious strains (Eris and Pyrola), the search for medicinal antiviral agents remains an urgent task. Moreover, taking into account the actively mutating receptor-binding domain, this task requires fundamentally new solutions.

This study proposes a candidate immunoliposomal drug that targets the S protein of SARS-CoV-2 by the monoclonal neutralizing antibody P4A1 and ensures the penetration of a highly active ribonuclease into the virus-infected cell, which degrades, among cellular RNA, viral RNA too. We demonstrate a more than 40-fold increase in the neutralizing activity of the developed drug compared to the free monoclonal neutralizing antibody.

Keywords: immunoliposomes, virus neutralization, barnase

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК roX В ПОДДЕРЖАНИИ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. В. А. Бабоша*, академик РАН П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко**

Поступило 06.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принято к публикации 27.10.2023 г.

Белки MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF и некодирующие РНК roX1 и roX2 формируют комплекс дозовой компенсации (КДК) дрозофилы, который специфично связывается с X-хромосомой самцов. Известно, что некодирующие РНК roX являются обязательными компонентами КДК в процессах сборки и привлечения комплекса на X-хромосому самцов. Однако до сих пор остается неясным, насколько необходима данная РНК для поддержания структуры уже собранного комплекса. В данной работе нами показано, что полный комплекс дозовой компенсации при воздействии РНКаз диссоциирует достаточно слабо: из комплекса эффективно освобождается хеликаза MLE, а остальные белковые компоненты, MSL1, MSL2 и MSL3, претерпевают частичную разборку и продолжают находиться в составе субкомплексов. Полученные результаты подтверждают важность некодирующей РНК roX2 не только в процессах инициации сборки КДК, но и на этапе поддержания структуры уже собранного комплекса.

Ключевые слова: дозовая компенсация, дрозофила, MSL1, РНК-белковые взаимодействия, roX

DOI: 10.31857/S2686738924010109, **EDN:** KRFHXD

Дозовая компенсация у дрозофилы направлена на увеличение экспрессии генов единственной X-хромосомы самцов с целью выравнивания с двумя X-хромосомами самок. В этом процессе ключевую роль играет РНК-белковый комплекс дозовой компенсации (КДК), состоящий из белков MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF и длинных некодирующих РНК, roX1 и roX2 [1; 2]. Исходно КДК привлекается на специфичные последовательности, распределенные по X-хромосоме (сайты первичного посадки, СПП), с которых происходит распространение КДК преимущественно на кодирующие части генов [3]. roX1 и roX2 представляют собой некодирующие РНК, различающиеся по размерам, последовательности, уровню экспрессии в клетках самцов, но являются взаимозаменяемыми в составе комплекса дозовой компенсации [4]. В их составе присутствуют небольшие консервативные участки, необходимые для функционирования КДК. Белок MLE необходим для включения РНК внутрь ком-

плекса, при этом roX могут сохраняться в составе комплекса и в отсутствие MLE [5; 6]. roX контактируют с MLE и MSL2 посредством консервативных участков с определенной вторичной структурой, состоящей из нескольких шпилек [5; 6]. В отсутствие roX происходит нарушение паттернов распределения белков КДК вдоль X-хромосомы [7]. Известно, что распространение КДК зависит от активности транскрипции генов roX, что является косвенным подтверждением инициации процесса сборки полного комплекса или его отдельных модулей непосредственно на новосинтезируемой РНК [8]. Последовательность этапов сборки комплекса остается малоизученной, однако известно, что в отсутствие хеликазной активности MLE КДК теряет способность к распространению за пределы мест связывания КДК с хроматином, что может говорить о необходимости roX для формирования полного КДК, способного к связыванию с X-хромосомой за пределами СПП [9].

Целью данной работы стало изучение влияния деградации РНК на общую организацию комплекса дозовой компенсации *Drosophila melanogaster* с целью демонстрации значения нкРНК roX в поддержании структуры и состава комплекса. В рамках данного исследования были проведены аналитическое ультрацентрифугирование в сахарозном

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

*E-mail: v.babosha@gmail.com

**E-mail: maksog@mail.ru

градиенте и коиммунопреципитация компонентов комплекса до и после обработки РНКазой А и III.

В качестве исходного материала использовался ядерный лизат культуры клеток S2 *Drosophila melanogaster*, имеющих эмбриональное происхождение и считающихся преимущественно мужскими. Полученный лизат делили на три части: без обработки нуклеазами с добавлением ванадил-рибонуклеозидного комплекса (VNC, неспецифичный ингибитор РНКаз), с обработкой РНКазой А (с преимущественной специфичностью к одноцепочечным участкам РНК) и с обработкой РНКазой III (с преимущественной специфичностью к двуцепочечным участкам РНК). После соответствующей обработки экстрактов проводили аналитическое ультрацентрифугирование и коиммунопреципитацию полученных образцов. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили на ультрацентрифуге Beckman L7 с ротором типа 70.1 TI в трехдюймовых пробирках Quick-Seal в сахарозном градиенте 10–40% в течение 2 ч 15 мин при 55000 г_{рм}. По окончании ультрацентрифугирования последовательно отбирались фракции объемом 500±50 мкл с одновременной спектрофотометрической и кондуктометрической регистрацией. Из фракций осаждались белки в присутствии ТХУ, после чего растворялись в 70 мкл фосфатно-солевого буфера. Затем проводили белковый электрофорез с последующим иммуноблот-анализом на компоненты КДК: MSL1, MSL2, MSL3, MLE. Коиммунопреципитацию проводили также со всеми 3 типами образцов – без обработки и с обработкой РНКазой А и III с антителами, специфично узнающими белки MSL2 и MSL3. Результаты иммунопреципитации анализировали про помощи иммуноблот-анализа с антителами, специфично узнающими белок MSL1.

После фракционирования образца экстракта, не обработанного нуклеазами, все исследуемые белки КДК обнаруживаются в тяжелых фракциях (рис. 1, а). При этом для белка MSL1 характерна преимущественная локализация во фракциях 2, 5–7, MSL2–1, 3–6, MSL3–2–9. Для MLE четкий сигнал детектировать не удалось. Таким образом, можно предположить, что КДК соответствует примерно 5–7 фракциям. Коиммунопреципитация также показала, что белки MSL1, MSL2 и MSL3 достаточно эффективно копреципитируются из экстракта, не обработанного нуклеазами (рис. 2, а).

Из аликвот фракций, полученных после ультрацентрифугирования ядерного лизата, не обработанного нуклеазами, выделялась РНК с последующей обратной транскрипцией для мониторинга количества некодирующей РНК roX в полученных фракциях методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с ис-

пользованием праймеров и TaqMan-пробы к roX2. Праймеры к другой некодирующей РНК roX1 не использовались, так как в популяции S2-клеток данная нкРНК практически не экспрессируется [10]. В результате проведенного анализа (рис. 2, б) roX2 была выявлена во всех фракциях, но выраженный пик детектировался с 5 по 13.

После обработки экстракта РНКазой А в условиях, обеспечивающих специфичное расщепление

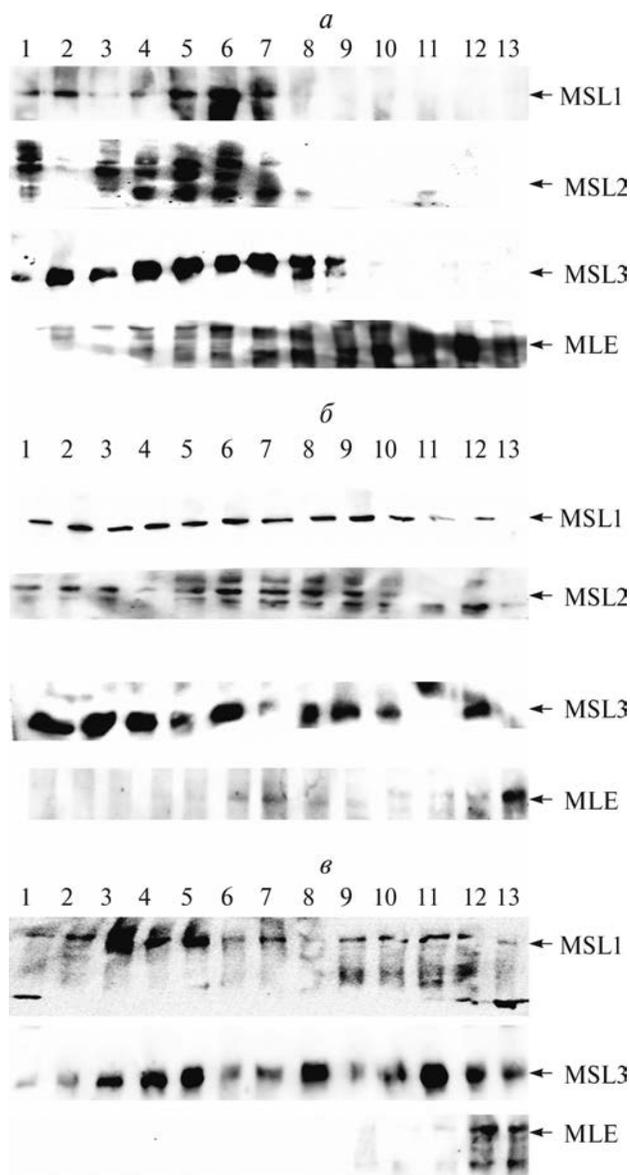


Рис. 1. Выявление компонентов КДК в сахарозном градиенте 10–40%. (а) Лизат без обработки нуклеазой, с VNC. (б) Лизат, обработанный РНКазой А. (в) Лизат, обработанный РНКазой III. Иммуноблот-анализ проведен с антителами, специфично узнающими белки MSL1, MSL2, MSL3, MLE. Цифрами отмечены номера собранных фракций от 1 до 13 (от «тяжелой» к «легкой»).

одноцепочечной РНК, белки MSL1, MSL2 стали детектироваться почти во всех фракциях от тяжелых до легких, за исключением только самых легких 12 и 13 (Рис. 1б). Аналогичная картина была получена с MSL1 и MSL3 для образца, обработанного РНКазой III в условиях, обеспечивающих специфичное расщепление двуцепочечной РНК (рис. 1, в).

Для MSL3 после обработки РНКазой А наблюдался существенный сдвиг в сторону легких фракций. И только один белок, MLE, после обработки РНКазами практически полностью диссоциировал из комплекса и оказывался в самой легкой фракции.

Эксперименты по коиммунопреципитации белков из экстрактов, обработанных РНКазами А и III, показали сходные результаты (рис. 2, а). При иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL3, белок MSL1 продолжает копреципитироваться с эффективностью, сходной с экстрактом, не обработанным нуклеазами. В то же время при иммунопреципитации антителами,

специфично узнающими белок MSL2, детектируется примерно двукратное снижение уровня белка MSL1 в образцах иммунопреципитатов по сравнению с преципитатом из экстракта, не обработанного нуклеазами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нкРНК гоX не играет ключевую роль в поддержании целостности КДК. В то же время, так как наблюдаются изменения профилей распределения белков КДК по фракциям после обработки РНКазами и несколько меняется эффективность преципитации белков MSL1 и MSL2, можно предположить, что гоX является одним из регуляторов стабилизации КДК. Ее удаление из предварительно собранного комплекса способно привести к полной диссоциации только белка MLE, что должно иметь фатальное значение *in vivo*, остальные компоненты остаются в виде полных или частично разобранных комплексов. В частности, по результатам иммунопреципитации можно предположить существование РНК-независимого субкомплек-

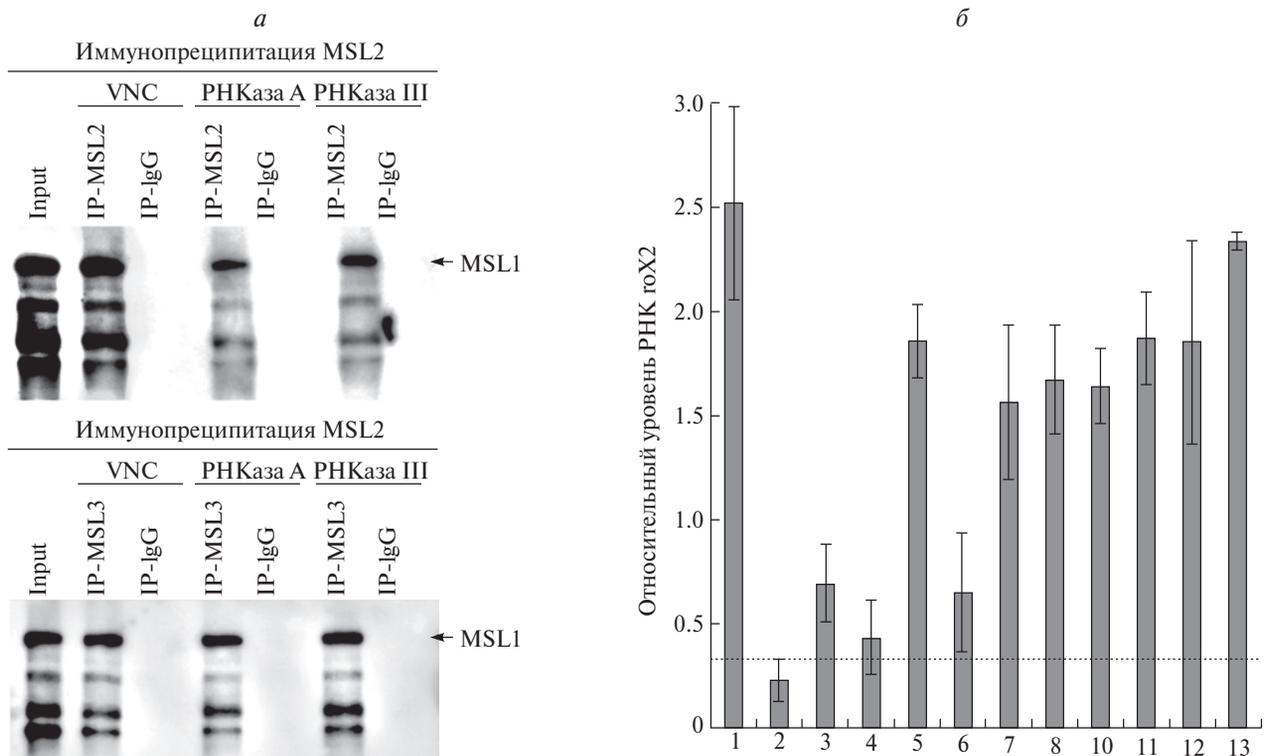


Рис. 2. (а) Результаты иммунопреципитации ядерных экстрактов, выделенных из культуры клеток S2, с антителами, специфично узнающими белки MSL2 и MSL3, или с иммуноглобулинами G кролика (отрицательный контроль). Экстракты проходили 3 вида обработки: 1) без нуклеаз, обработаны неспецифичным ингибитором РНКаз VNC, 2) с добавлением РНКазы А, 3) с добавлением РНКазы III. Иммунопреципитаты анализировались при помощи иммуноблот-анализа на присутствие белка MSL1 в образцах. 'input' – исходный экстракт; IP-MSL2 – образец после иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL2; IP-MSL3 – образец после иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL3; IP-IgG – образец после иммунопреципитации иммуноглобулинами G кролика. (б) Выявление РНК гоX2 во фракциях, полученных после аналитического ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте 10-40% ядерного экстракта из культуры клеток S2. Пунктирной линией отмечен уровень фона. Стандартные отклонения построены по результатам четырех измерений.

са MSL1-MSL3. Хотя можно предположить, что roX1 выполняет аналогичную функции в структуре КДК, исследование её роли требует отдельных экспериментов. Дальнейшие исследования в данной области необходимы для детального описания всех этапов сборки и разборки КДК.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Пирогову С.А. за помощь в проведении части экспериментов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 21-04-00211. В работе использовалось оборудование, приобретенное при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-668.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Samata M., Akhtar A.* Dosage Compensation of the X Chromosome: A Complex Epigenetic Assignment Involving Chromatin Regulators and Long Noncoding RNAs // *Annual Review of Biochemistry*. 2018. Vol. 87. Dosage Compensation of the X Chromosome. № 1. P. 323–350.
2. *Kuroda M. I., Hilfiker A., Lucchesi J. C.* Dosage Compensation in *Drosophila*-a Model for the Coordinate Regulation of Transcription // *Genetics*. 2016. V. 204. № 2. P. 435–450.
3. *Straub T., Grimaud C., Gilfillan G. D., et al.* The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex // *PLoS genetics*. 2008. V. 4. № 12. P. e1000302.
4. *Meller V. H., Rattner B. P.* The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex // *The EMBO Journal*. 2002. V. 21. № 5. P. 1084–1091.
5. *Maenner S., Müller M., Fröhlich J., et al.* ATP-dependent roX RNA remodeling by the helicase maleless enables specific association of MSL proteins // *Molecular Cell*. 2013. V. 51. № 2. P. 174–184.
6. *Ilik I. A., Quinn J. J., Georgiev P., et al.* Tandem Stem Loops in roX RNAs Act Together to Mediate X Chromosome Dosage Compensation in *Drosophila* // *Molecular cell*. 2013. V. 51. № 2. P. 156–173.
7. *Li F., Schiemann A. H., Scott M. J.* Incorporation of the noncoding roX RNAs alters the chromatin-binding specificity of the *Drosophila* MSL1/MSL2 complex // *Molecular and Cellular Biology*. 2008. V. 28. № 4. P. 1252–1264.
8. *Kelley R. L., Lee O.-K., Shim Y.-K.* Transcription rate of noncoding roX1 RNA controls local spreading of the *Drosophila* MSL chromatin remodeling complex // *Mechanisms of development*. 2008. V. 125. № 11–12. P. 1009–1019.
9. *Morra R., Smith E. R., Yokoyama R., Lucchesi J. C.* The MLE subunit of the *Drosophila* MSL complex uses its ATPase activity for dosage compensation and its helicase activity for targeting // *Molecular and Cellular Biology*. 2008. V. 28. № 3. P. 958–966.
10. *Johansson A.-M., Stenberg P., Larsson J.* msl2 mRNA is bound by free nuclear MSL complex in *Drosophila melanogaster* // *Nucleic Acids Research*. 2011. V. 39. № 15. P. 6428–6439.

STUDY OF THE ROLE OF LONG NON-CODING RNA ROX IN MAINTAINING OF THE DOSAGE COMPENSATION COMPLEX IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

V. A. Babosha[#], Academician of the RAS P. G. Georgiev, O. G. Maksimenko^{**}

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: v.babosha@gmail.com

^{**}E-mail: maksog@mail.ru

The proteins MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF and non-coding RNAs roX1 and roX2 form the *Drosophila* dosage compensation complex (DCC), which specifically binds to the X chromosome of males. It is known that non-coding RNA roX are primary component of the DCC in the process of assembly and spreading of the complex among the X chromosome of males. However, it still remains unclear the role of this RNA in maintaining the structure of the already assembled complex. In this work, we have shown that the full-assembled complex of dosage compensation dissociates rather weakly when treated with RNases: the MLE helicase is effectively released from the complex, and the remaining protein components, MSL1, MSL2 and MSL3, undergo partial disassembly and continue to be part of subcomplexes. The results confirm the importance of the non-coding RNA roX2 not only in the processes of initiation of CDK assembly, but also at the stage of maintaining the structure of the already assembled complex.

Keywords: Dosage compensation, *Drosophila*, MSL1, RNA-protein interactions, roX

УДК: 577.21

НСПВР1 В КОМПЛЕКСЕ С ПЕПТИДОМ БЕЛКА ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TAG7 СПОСОБЕН ЛИЗИРОВАТЬ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ, НЕСУЩИЕ TNFR1-РЕЦЕПТОР.

© 2024 г. Е. А. Романова, Д. М. Юркина, Д. В. Яшин*, Л. П. Сашенко, академик РАН Г. П. Георгиев

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принято к публикации 03.11.2023 г.

Поиск новых цитотоксических агентов, способных лизировать опухолевые клетки, является важной задачей в борьбе с онкологическими заболеваниями. Здесь мы показали, что белок HspBP1, кошаперон белка теплового шока Hsp70, способен образовывать комплекс с ранее обнаруженным пептидом (17.1) белка врожденного иммунитета Tag7. Эксперименты с применением термофореза продемонстрировали, что сродство пептида 17.1 белка Tag7 к молекуле HspBP1 в 100 раз выше, чем у полноразмерной молекулы Tag7. Добавление комплекса 17.1-HspBP1 к опухолевым клеткам индуцирует в них апоптоз и некроптоз. Полученные в данной работе результаты могут быть использованы для разработки перспективных противоопухолевых препаратов.

Ключевые слова: Tag7, HspBP1, опухолевые клетки, цитотоксичность, 17.1 пептид

DOI: 10.31857/S2686738924010112, **EDN:** KQXYJX

Понимание механизмов гибели опухолевых клеток и выявление новых соединений, индуцирующих эту гибель, чрезвычайно важны для разработки новых стратегий противоопухолевой иммунотерапии.

Одним из первых цитотоксических белков был описан фактор некроза опухолей (TNF). (1) В настоящее время известно, что TNF является цитокином и играет ключевую роль в иммунном ответе. (2) Функциональная активность TNF осуществляется за счет взаимодействия с рецепторами на клеточной поверхности и индукции внутриклеточного сигнала. (3) Рецепторы TNF хорошо охарактеризованы и интенсивно исследуются. (4) Наиболее хорошо известен специфический рецептор TNF – TNFR1 (5). TNFR1 присутствует на многих тканях и клетках, в том числе и на опухолевых. Этот рецептор индуцирует в клетках два альтернативных процесса программируемой клеточной гибели: апоптоз и некроптоз. При апоптозе запускается каскад специфических протеаз-каспаз, активация которых в конечном счете приводит к расщеплению ДНК до нуклеосом (6). При блокировании каспа-

зы 8, генетическом или за счет внешних стимулов, наблюдается активация RIP1 и RIP3 фосфокиназ и включение программы некроптоза. (7)

Расширение спектра лигандов этого рецептора будет способствовать созданию новых путей иммунотерапии. Ранее нами было показано, что белок Tag7 также известный как (PGRPLY1), ген которого у мыши был обнаружен в нашем Институте (8), является лигандом TNFR1 рецептора (9). Связываясь с рецептором, он может блокировать его взаимодействие с другими лигандами, в том числе и с TNF. В комплексе с Hsp70 Tag7 индуцирует в опухолевых клетках альтернативные цитотоксические процессы (10).

Мы также описали белок, участвующий в регуляции взаимодействия Tag7-Hsp70 комплекса с клетками: HspBP1. (11) Он является ко-шапероном, регулирующим АТФазную активность Hsp70 (12). Белки могут связываться с Tag7 и ингибировать цитотоксическую активность Tag7-Hsp70 комплекса. Нами было установлено, что каждый из этих белков конкурирует с Hsp70 за центр связывания с Tag7 с образованием неактивного комплекса. Эти результаты позволяют предположить, что они связываются с тем же фрагментом Tag7, что и Hsp70. Сравнительно недавно мы выявили пептидный фрагмент Tag7 (пептид 17.1), ответ-

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской Академии Наук, Москва, Россия

*E-mail: yashin_co@mail.ru

ственный за связывание с Hsp70 и необходимый для проявления цитотоксической активности. Мы создали комплекс 17.1-Hsp70, также обладающий цитотоксическим действием на опухолевые клетки. Наши предварительные данные свидетельствуют, что Mts1 также может образовывать цитотоксический комплекс 17.1-Mts1. Здесь мы выясняли, может ли HspBP1 взаимодействовать с этим пептидом и образовывать цитотоксический комплекс.

Целью настоящей работы было: 1) сравнительная характеристика комплексов белка Tag7 и его функционального пептидного фрагмента 17.1 с белком HspBP1; 2) исследование цитотоксической активности комплекса Tag7-HspBP1 и 17.1-HspBP1.

Клетки L929 (фибробласты мышцы) культивировали в среде DMEM (ПанЭко, РА) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США). Культура была получена из банка клеточных линий РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Для измерения цитотоксичности белки и белковые комплексы добавляли к культуре L929 в концентрации 1 нМ, если не указана другая концентрация, и инкубировали 3 ч или 20 ч. Цитотоксичность измеряли с помощью набора Cytotox (Promega, США) по методике производителя. Для ингибирования цитотоксичности использовали блокирующие антитела к TNFR1 в концентрации 10 мкг/мл (Invitrogen, США). Используются данные от 5 различных экспериментов.

Рекомбинантный белок HspBP1 был получен, как описывалось ранее. (11) Колонку с активированной CNBr сефарозой 4B (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США), конъюгированной с 17.1, изготавливали в соответствии с протоколом производителя. Белок HspBP1 наносили на эту колонку, колонку промывали PBS, содержащим 0,5 М NaCl и только PBS. Белок элюировали 0,25 М триэтиламинном (TEA) при pH 12. Элюированный материал разрешали с помощью SDS-ПААГ и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Поликлональные кроличьи антитела к HspBP1 или Tag7 (Abcam, Кембридж, Великобритания; 1:15000; 1 ч) для детекции использовали антикроличьи антитела, связанные с HRP (Abcam, Кембридж, Великобритания; 1:15000; 1 ч). Результаты были визуализированы с использованием набора ECL Plus (GE Healthcare, Чикаго, Иллинойс, США) в соответствии с протоколом производителя. Хемилюминесценцию регистрировали с помощью прибора iBright (Thermo Fisher Scientific, Бостон, Массачусетс, США).

Очищенный HspBP1 был флуоресцентно мечен с использованием Alexa Fluor 633 (Юджин, OR, США) в соответствии с инструкциями производителя. HspBP1 (200 нМ) инкубировали в течение 20 мин с каждым соединением в темноте при комнатной температуре в 16 различных концентрациях,

полученных путем последовательного разведения, начиная с самой высокой растворимой концентрации. Образцы загружали в стеклянные капилляры (Monolith NT Capillaries) и анализировали с помощью термофореза с использованием нанотемпературного аппарата Monolith NT 115 (мощность ИК-лазера 10%). Качество сигнала контролировалось с помощью устройства NanoTemper Monolith для обнаружения возможной автофлуоресценции лиганда, осаждения, агрегации или вызванных лигандом изменений скорости фотообесцвечивания. Эксперименты были проведены в трех экземплярах и обработаны с использованием программного обеспечения для анализа сродства (MO Control v.1.6.1, Nano-Temper).

Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Statistica 6.1 (StatSoft®). Для подтверждения нормальности распределения данных был использован тест Шапиро–Уилка. Результаты представлены в виде среднего значения \pm SD. Статистически значимые различия были

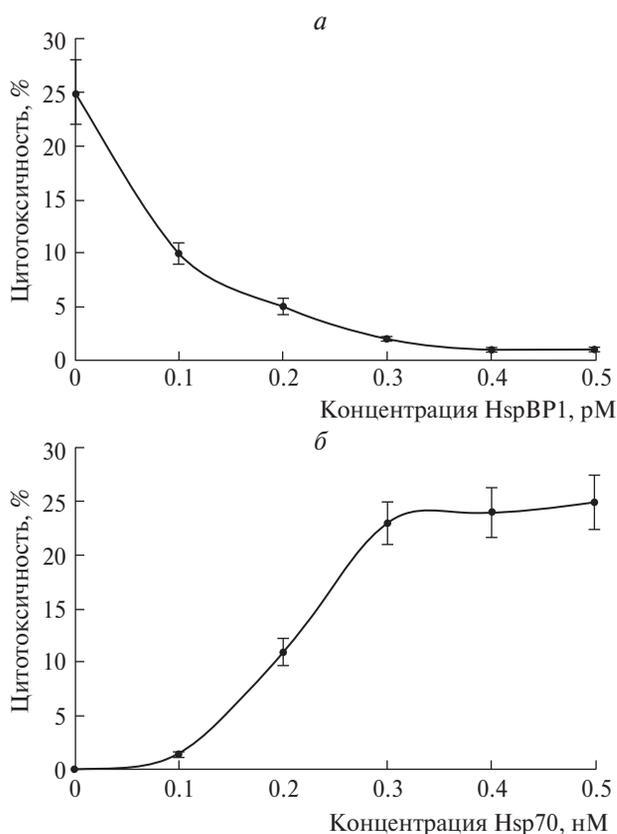


Рис. 1. (а) Добавление увеличивающейся концентрации HspBP1 к Tag7-Hsp70 комплексу ингибирует его цитотоксическую активность. (б) Добавление увеличивающейся концентрации Hsp70 к Tag7-HspBP1 комплексу приводит к появлению цитотоксической активности.

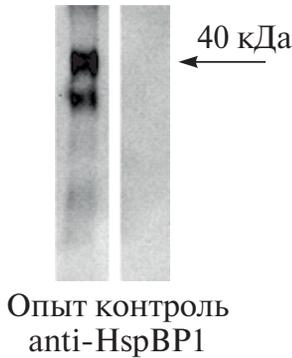


Рис. 2. Нанесение HspBP1 на 17.1-Сефарозу (опыт) или на чистую Сефарозу (контроль), разрешенный с помощью 12% SDS-ПААГ и проявленный антителами к HspBP1.

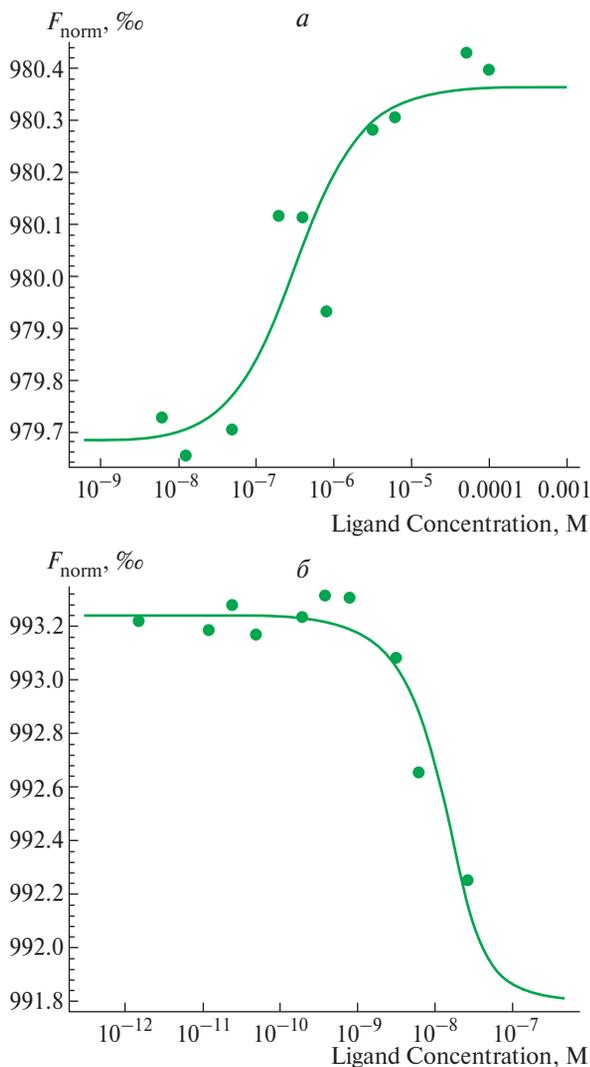


Рис. 3. Термофоретические кривые диссоциации при взаимодействии Tag7-HspBP1 (а) и 17.1-HspBP1 (б)

определены с помощью *t*-критерия. Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

Ранее мы показали, что HspBP1 взаимодействует с Tag7, иммобилизованным на CN-Br Сефарозе, что свидетельствует об образовании Tag7-HspBP1 комплекса. Для измерения цитотоксической активности были использованы клетки L929, так как они несут TNFR1 рецептор и высокочувствительны к действию как TNF, так и к Tag7-Hsp70 комплексу. Здесь мы подтвердили, что добавление HspBP1 ингибирует цитотоксическую активность Tag7-Hsp70 комплекса в дозозависимой. Результаты, представленные на рис. 1, а демонстрируют резкое падение цитотоксичности комплекса Tag7-Hsp70 с увеличением концентрации ингибирующего белка HspBP1. Комплекс Tag7-HspBP1 не обладает цитотоксической активностью, но добавление Hsp70 вызывает рост цитотоксической активности с увеличением концентрации Hsp70. Максимальная цитотоксичность достигается при 5-ти кратном избытке Hsp70 по отношению к Tag7-HspBP1 комплексу (рис. 1, б). Эти результаты позволяют предположить, что Hsp70 и HspBP1 конкурируют за один участок связывания с Tag7.

Ранее мы также показали, что Hsp70 связывается с 12-ти членным пептидным фрагментом, расположенным в С-концевом участке полипептидной цепи Tag7 (пептидом 17.1). Здесь мы исследовали взаимодействие пептида 17.1 с HspBP1 с помощью аффинной хроматографии. Образец HspBP1 наносили на CN-Br сефарозу с иммобилизованным пептидом 17.1.

Связавшийся материал анализировали с помощью SDS-ПААГ и последующего вестерн-блота со специфическими антителами против HspBP1 (рис. 2). Можно видеть, что в элюате присутствует белок с молекулярной массой 40кДа, взаимодействующий со специфическими антителами к HspBP1. Следовательно, возможно образование 17.1-HspBP1-комплекса.

Далее проводили сравнительную оценку аффинности этих комплексов. Для оценки белок-белкового взаимодействия HspBP1 с Tag7 и пептидом 17.1 использовали количественный метод микромасштабного термофореза. При добавлении Tag7 и его пептида к меченому HspBP1 были получены четкие кривые связывания при увеличении концентрации исследуемых компонентов (рис. 3, а, 3, б). Данные термофореза демонстрируют, что K_D для комплекса Tag7-HspBP1 составляет 328 нМ, что свидетельствует о низком сродстве этих соединений и низкой стабильности комплекса. Взаимодействие фрагмента Tag7 пептида 17.1 с HspBP1 можно считать высокоспецифичным, так как K_D составляет 3,91 нМ. Можно предположить, что такой комплекс имеет более высокую стабильность.

Следующим этапом исследования была оценка цитотоксической активности полученных комплексов. Ранее было показано, что комплексы Tag7-Hsp70 и 17.1-Hsp70 обладают цитотоксичностью (13). Как упоминалось выше, Tag7 участвует в индукции цитотоксичности при взаимодействии с рецептором TNFR1, индуцирующим альтернативные цитотоксические процессы, апоптоз и некроптоз. Также известно, что максимальная апоптотическая цитотоксичность достигается через 3 ч взаимодействия лиганда с рецептором, некроптоз развивается через 20 ч такого взаимодействия. В связи с этим цитотоксическая активность определялась через 3 и 20 часов взаимодействия лиганда с клетками. Полученные результаты демонстрируют отсутствие цитотоксической активности.

Были приготовлены 4 комплекса: Tag7-HspBP1, а также 17.1-HspBP1 со стехиометрией 1:1 и 1:2, и добавлены к опухолевым клеткам. Цитотоксическая активность определялась через 3 часа и через 20 часов (рис. 4, а и 4, б).

Можно видеть, что комплекс Tag7-HspBP1 не обладал цитотоксической активностью даже при увеличении количества второго компонента. Комплекс 17.1-HspBP1 1:1 также не обладал цитотоксической активностью. Однако комплекс 17.1-HspBP1 1:2 проявлял через 3 часа и через 20 часов с клетками цитотоксичность, подавляемую добавлением анти-TNFR1 антител. Эти результаты позволяют считать, что цитотоксический 17.1-HspBP1 комплекс индуцирует в опухолевых клетках апоптотический и некроптотический процессы программируемой клеточной смерти при взаимодействии комплекса с рецептором TNFR1.

Ранее мы показали, что пептид 17.1 обладает высоким сродством к Hsp70, K_D составляла 7,16 нМ и была сопоставима с K_D для Hsp70 с полноразмерным Tag7 (1,73 нМ) (13). K_D для 17.1-HspBP1, равная 3,91 нМ, также близка к этим значениям. Все три комплекса обладали цитотоксической активностью. K_D для комплекса HspBP1 с полноразмерным Tag7 значительно выше и составляла 328 нМ, что свидетельствует о низкой активности и слабой стабильности комплекса. Можно предположить, что отсутствие цитотоксической активности у Tag7-HspBP1 связано с его диссоциацией при взаимодействии с клетками. Таким образом, установлена корреляция между аффинностью белок-белкового взаимодействия и цитотоксической активностью.

В настоящее время не ясно, почему полноразмерный Tag7 имеет низкое сродство к HspBP1. Возможно, структурный фрагмент этого белка препятствует прочному связыванию HspBP1 с участком полипептидной цепи Tag7, соответствующему пептиду 17.1. Окончательно этот вопрос может быть

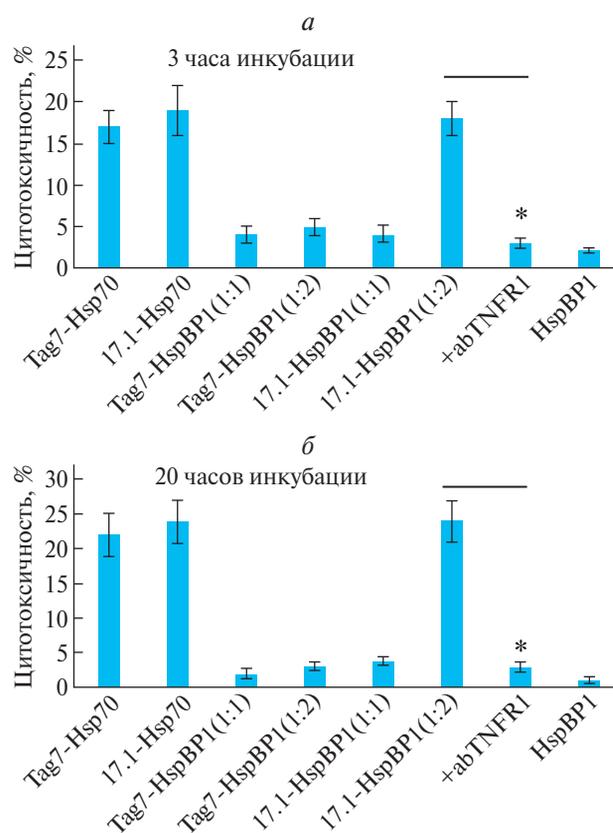


Рис. 4. Цитотоксическая активность комплексов через 3 (а) и 20 часов (б) инкубации с опухолевыми клетками L929. * – $p < 0,05$

решен после проведения рентгеноструктурного анализа. Ранее в наших исследованиях мы продемонстрировали, что HspBP1 является ингибитором цитотоксической активности Tag7-Hsp70 комплекса. Здесь же мы продемонстрировали, что с пептидом Tag7, с которым он связывается значительно сильнее, он может участвовать в индукции цитотоксической активности.

Суммируя вышесказанное, можно отметить, что получен новый высокоаффинный, цитотоксический комплекс, индуцирующий гибель опухолевых клеток при его взаимодействии с рецептором TNFR1.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского научного фонда грант РНФ № 23-14-00076.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Геномное редактирование» Федерального государственного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (ЦКП ИБГ РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Carswell E.A., et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975. V. 72. P. 3666–3670.
2. *Siegmund D., Wajant H.* TNF and TNF receptors as therapeutic targets for rheumatic diseases and beyond // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2023. V. 19. P. 576–591.
3. *Huyghe J., Priem D., Bertrand M.J.M.* Cell death checkpoints in the TNF pathway // *Trends Immunol.* 2023. V. 44. P. 628–643.
4. *Shi G., Hu Y.* TNFR1 and TNFR2, Which Link NF- κ B Activation, Drive Lung Cancer Progression, Cell Differentiation, and Metastasis // *Cancers (Basel).* 2023. V. 15. P. 4299.
5. *Gough P., Myles I.A.* Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects // *Front Immunol.* 2020. V. 11. P. 585880.
6. *Ashkenazi A., Salvesen G.* Regulated cell death: signaling and mechanisms // *Annu Rev Cell Dev. Biol.* 2014. V. 30. P. 337–356.
7. *Roberts J.Z., Crawford N., Longley D.B.* The role of Ubiquitination in Apoptosis and Necroptosis // *Cell Death Differ.* 2022. V. 29. P. 272–284.
8. *Kustikova O.S., et al.* Cloning of the tag7 gene expressed in metastatic mouse tumors // *Genetika.* 1996. V. 32. P. 621–628.
9. *Yashin D.V., et al.* Tag7 (PGLYRP1) in Complex with Hsp70 Induces Alternative Cytotoxic Processes in Tumor Cells via TNFR1 Receptor // *J Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 21724–21731.
10. *Yashin D.V., et al.* The Tag7-Hsp70 cytotoxic complex induces tumor cell necroptosis via permeabilisation of lysosomes and mitochondria // *Biochimie.* 2016. V. 123. P. 32–36.
11. *Yashin D.V., et al.* The heat shock-binding protein (HspBP1) protects cells against the cytotoxic action of the Tag7-Hsp70 complex // *J Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10258–10264.
12. *Bracher A., Verghese J.* Nucleotide Exchange Factors for Hsp70 Molecular Chaperones: GrpE, Hsp110/Grp170, HspBP1/Sil1, and BAG Domain Proteins // *Subcell Biochem.* 2023. V. 101. P. 1–39.
13. *Yurkina D.M., et al.* Short Peptides of Innate Immunity Protein Tag7 (PGLYRP1) Selectively Induce Inhibition or Activation of Tumor Cell Death via TNF Receptor // *Int J Mol Sci.* 2023. V. 24. P. 11363.

HSPBP1 IN COMPLEX WITH THE PEPTIDE OF THE INNATE IMMUNITY PROTEIN TAG7 IS ABLE TO LYSE TUMOR CELLS CARRYING TNFR1 RECEPTOR.

**E. A. Romanova, D. M. Yurkina, D. V. Yashin[#], L. P. Sashchenko,
Academician of the RAS G. P. Georgiev**

Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]*E-mail: yashin_co@mail.ru*

The search for new cytotoxic agents capable of lysing tumor cells is an important task in the fight against cancer. Here we have shown that the protein HspBP1, the chaperone of the heat shock protein Hsp70, is able to form a complex with the previously discovered peptide (17.1) of the innate immunity protein Tag7. Experiments using thermophoresis have demonstrated that the affinity of the Tag7 protein peptide 17.1 to the HspBP1 molecule is 100 times higher than that of the full-sized Tag7 molecule. The addition of the 17.1-HspBP1 complex to tumor cells induces apoptosis and necroptosis in them. The results obtained in this work can be used to develop promising antitumor drugs.

Keywords: Tag7, HspBP1, tumor cells, cytotoxicity, 17.1 peptide

УДК 595.132

ДВА ИСТОЧНИКА ЦЕЛОМИЧЕСКОЙ МЕЗОДЕРМЫ У БРАХИОПОД

© 2024 г. Т. В. Кузьмина, Е. Н. Темерева*

Представлено академиком РАН В. В. Малаховым

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 31.10.2023 г.

Принято к публикации 31.10.2023 г.

Формирование целомической мезодермы у Bilateria происходит различными путями и имеет большой интерес с позиций сравнительной эмбриологии и филогении. В данной работе методами сканирующей электронной микроскопии и цитохимии в сочетании с конфокальной лазерной микроскопией показаны ранние стадии онтогенеза брахиоподы *Coptothyris grayi*. На стадии гастрюлы одновременно из передней и задней стенок архентерона формируются два источника мезодермы. И передний, и задний зачатки образуются энтероцельно как непарные выпячивания стенки первичной кишки, которые впоследствии отшнуровываются. Таким образом, были подтверждены ранее известные данные об энтероцельной закладке целома у брахиопод. Кроме того, впервые для всего типа Brachiopoda показано формирование целомической мезодермы из двух зачатков: переднего и заднего. Анализ литературы показывает, что два источника целомической мезодермы характерны для онтогенеза представителей различных групп первичноротых и вторичноротых животных. Этот факт может служить доказательством ранее предложенной гипотезы о плезиоморфии двух источников мезодермы для Bilateria.

Ключевые слова: Lophophorata, Brachiopoda, онтогенез, развитие, мезодерма, целом

DOI: 10.31857/S2686738924010124, **EDN:** KPYSYE

Брахиоподы – группа морских беспозвоночных, систематическое положение которой долгое время оставалось спорным. В настоящее время брахиоподы вместе с форонидами и мшанками входят в состав таксона Spiralia [1], для большинства представителей которых описан схизоцельный способ формирования целома. Тем не менее, в 19 и 20 веках для брахиопод был обнаружен энтероцельный способ закладки целома, сходный с вторичноротыми животными [2, 3, 4, 5]. Однако современное исследование [6] показало, что у брахиопод при формировании целома не происходит выпячивания эпителия архентерона, а происходит выселение плотной массы мезодремальных клеток, которые путем расхождения формируют целомические полости, таким образом, напоминающий схизоцельный способ закладки целома.

Цель настоящей работы – изучить формирование мезодермы брахиопод на примере *Coptothyris grayi*.

Материалом для работы послужили взрослые особи брахиоподы *Coptothyris grayi* (Davidson, 1852), собранные в заливе Восток Японского моря в районе морской биологической станции “Восток” Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН. Последовательные стадии развития были получены путем искусственного оплодотворения [7], расслаблены в 3.5% растворе MgCl₂ и зафиксированы в 4% параформальдегиде на 0.1M фосфатном буфере. Тонкая морфология последовательных стадий развития была изучена методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), для чего фиксированный материал был обезвожен в спиртах восходящей концентрации и ацетоне, высушен в критической точке на аппарате сушки Hitachi critical point dryer HCP-1, смонтирован на столики и напылен тяжелыми металлами. Препараты изучали в сканирующем электронном микроскопе JEOL JSM-6380LA в межкафедральной лаборатории электронной микроскопии Биологического факультета МГУ. Для изучения на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (КЛСМ) зафиксированный материал отмывали в фосфатном буфере с 5% Triton-X100, в течение 24 часов и затем инкубировали в растворе фаллоидина Phalloidin-FITC-495 Sigma P5282 (1:100) и DAPI Sigma D9542 (1:1000) в течение 2 ча-

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

*E-mail: temereva@mail.ru.

сов при комнатной температуре. Материал был изучен в лазерном конфокальном микроскопе Nikon Eclipse Ti (Токуо, Япония). Z-проекции были сделаны в программе ImageJ 1.43; 3D реконструкции построены в программе Amira ver. 5.2.2.

Для *Coptothyris grayi* характерно наружное оплодотворение, выход из яйцевых оболочек происходит на стадии поздней бластулы. В воде происходит гастралляция путем инвагинации: формируется архентерон, который связан с внешней средой через округлый бластопор. Через 15 часов после оплодот-

ворения (чпо) бластопор на вегетативном полюсе гастраллы удлиняется, таким образом формируется билатерально симметричная поздняя гастрала, плоскость симметрии которой совпадает с плоскостью вытянутого бластопора (рис. 1, а). На этой стадии передний и задний участки эпителия архентерона формируют выпячивания, образуя передний и задний целомические мешки (рис. 1, б–в). Таким образом, энтероцельным путем формируется и передняя, и задняя мезодерма. Передний и задний целомический мешок имеют по паре латеральных

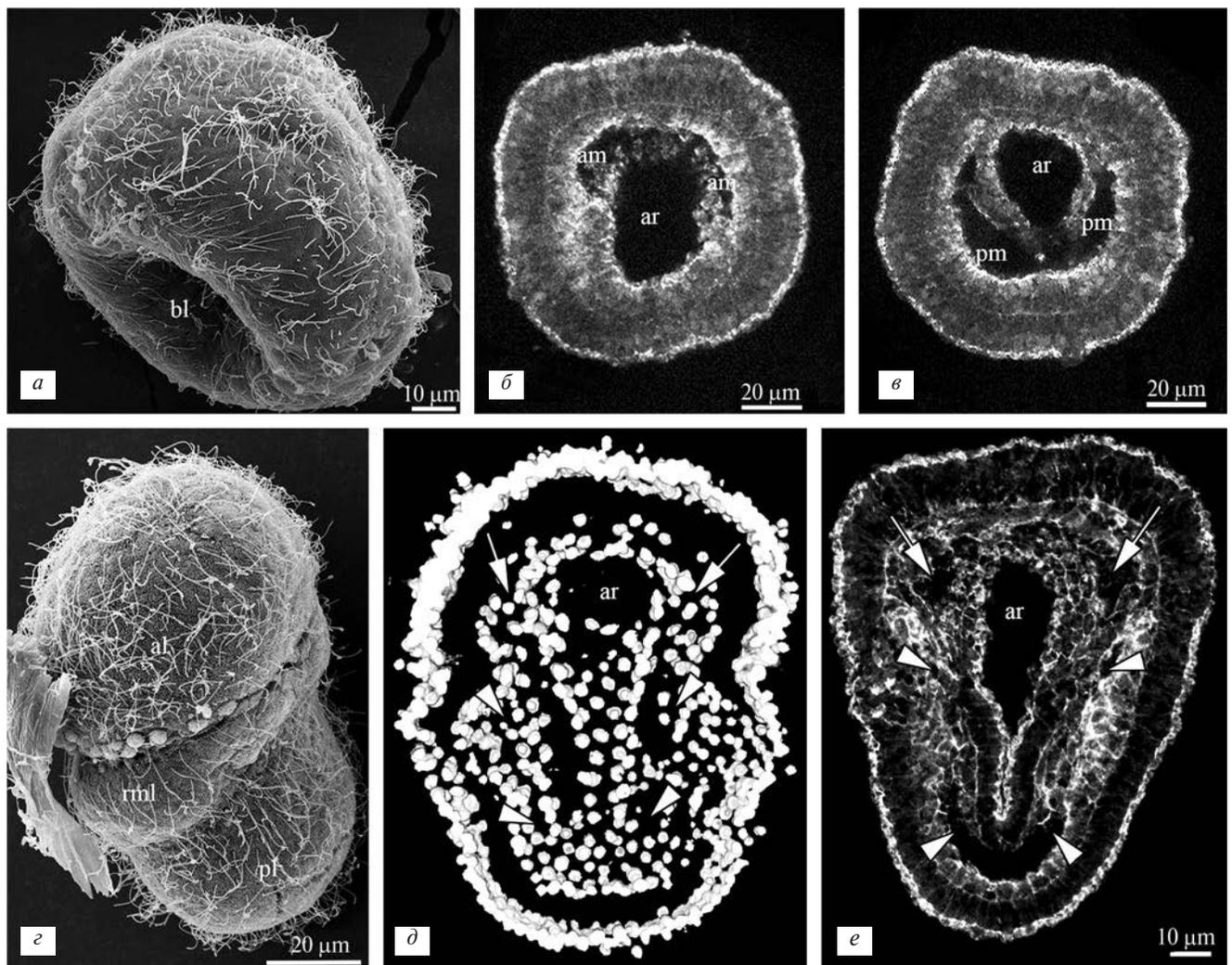


Рис. 1. Формирование мезодермы у личинки брахиоподы *Coptothyris grayi*: (а) – поздняя билатерально симметричная гастрала (15 чпо), СЭМ, (б) – формирование передней мезодермы на стадии поздней гастраллы, частичная Z-проекция части после окраски DAPI, КЛСМ, (в) – формирование задней мезодермы на стадии поздней гастраллы, частичная Z-проекция после окраски DAPI, КЛСМ, (г) – ранняя трехлопастная личинка (22 чпо), СЭМ, (д) – Z-проекция ранней трехлопастной личинки после окраски DAPI, КЛСМ, (е) – Z-проекция ранней трехлопастной личинки после окраски фаллоидином, КЛСМ.

(al) – головная лопасть, (am) – передняя мезодерма, (ar) – архентерон, (bl) – бластопор, (pl) – ножная лопасть, (pm) – задняя мезодерма, (rml) – зачаток мантийной лопасти, стрелки указывают на переднюю мезодерму, наконечники стрелок указывают на заднюю мезодерму.

выростов, которые располагаются по бокам от архентерона (рис. 1, б–в). Через 22 чпо формируется ранняя трехлопастная личинка, которая состоит из хорошо развитых головной и ножной лопасти, между которыми располагается кольцевидное утолщение – зачаток мантийной лопасти (рис. 1, г).

На этой стадии передний целомический мешок оказывается расположенным в головной лопасти личинки, а целомический мешок задней мезодермы подразделяется на две пары мешков, которые располагаются по бокам от архентерона в зачатке мантийной и ножной лопастях. После этого целомические мешки начинают сливаться между собой, формируя общий целомический зачаток, частично подразделенный на три пары целомических полостей (рис. 1, д–е). Одновременно происходит замыкание бластопора от заднего конца к переднему.

Таким образом, полученные результаты подтверждают данные Ковалевского, Конклина и Персиваля [2, 3, 4, 5] о настоящей энтероцелии у брахиопод. Важно отметить, что личинки современных ринхонеллиформных брахиопод лецитотрофные. При этом все клетки личинки очень крупные и заполнены желточными гранулами, а между базальными пластинками эктодермы и энтодермы очень мало места. Поэтому внутри личинок брахиопод нет обширных целомических полостей, а зачатки целомических полостей представляют собой группу близко расположенных клеток, несущих апикальные реснички. Эти клетки связаны адгезивными контактами и окружены базальной пластинкой. Вероятно, Карстен Лютер [6] зачатки уже сформированных целомических полостей рассматривал как плотную массу мезодермальных клеток. Можно предположить, что схизоцельный способ закладки целома произошел от энтероцельного из-за малоклеточности эмбриона и нехватки места между энтодермой и эктодермой. При этом у брахиопод наблюдается переходная стадия, когда целомические полости закладываются в виде карманов архентерона, но при этом настоящая целомическая полость появляется позже путем расхождения плотно сближенных клеток.

В данной работе впервые для брахиопод описано формирование передней и задней мезодермы. Формирование двух источников мезодермы описано также для разных других групп билатерально симметричных животных, таких как *Spiralia* [8, 9 10], *Ecdysozoa* [11, 12] и *Deuterostomia* [13, 14]. Кроме того, наличие передней и заднего и переднего мезодермальных зачатков также обнаружено у других представителей лофофорат, например, у форонид [15, 16]. Вероятно, наличие двух источников мезодермы является плезиоморфным признаком для всех *Bilateria* [15]. Недавно было предположено, что наличие двух источников мезодермы подтверждает

гипотезу амфистомии, в которой формирование рта и ануса *Bilateria* произошло путем слияния боковых сторон вытянутого щелевидного рта книдариоподобных предков. Передний и задний источники мезодермы связаны с передним и задним концами кишечной трубки и, вероятно, произошли от круговой области формирования мезодермы радиально симметричного предка *Bilateria* [10, 15]. Наличие у брахиопод энтероцельного способа закладки целома позволяет предположить, что эта группа животных сохранила плезиоморфные черты, вероятно, свойственные общему предку *Bilateria*.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 23-14-00020).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Halanych K. M., Bacheller J. D., Aguinaldo A. M., et al.* Evidence from 18S ribosomal DNA that the lophophorates are protostome animals // *Science*. 1995. V. 267. P. 1641–1643.
2. *Kovalevsky A. O.* Observations sur le developpement des brachiopods (Analysis by Oehlert and Deniker) // *Arch. Zool. Exp. Gen. Sér.* 1883. V. 2. P. 57–76.
3. *Conklin E. G.* The embryology of a brachiopod, *Terebratulina septentrionalis* Couthouy // *Proc. Am. Philos. Soc.* 1902. V. 41. P. 41–76.
4. *Percival E.* A contribution to the life-history of the brachiopod *Terebratella inconspicua* Sowerby // *Trans. R. Soc. New Zealand*. 1944. V. 74. P. 1–23.
5. *Percival E.* A contribution to the life-history of the brachiopod *Tegulorhynchia nigricans* // *Quat. J. microsc. Sci.* 1960. V. 101. P. 439–457.
6. *Lüter C.* The origin of the coelom in Brachiopoda and its phylogenetic significance // *Zoomorphology*. 2000. V. 120. P. 15–28.
7. *Kuzmina T. V., Malakhov V. V., Temereva E. N.* Larval development of the brachiopod *Coptothyris grayi* (Davidson, 1852) (Terebratulida: Rhynchonelliformea) and the evolution of brachiopod life cycles // *Invert. Zool.* 2019. V. 16. № 1. P. 27–40.
8. *Boyer B. C., Henry J. J., Martindale M. Q.* The cell lineage of a polyclad turbellarian embryo reveals close similarity to coelomic spiralian // *Dev. Biol.* 1998. V. 204. P. 111–123.
9. *Henry J. Q., Martindale M. Q.* Conservation of the spiralian development program: Cell lineage of the nemertean *Cerebratulus lacteus* // *Dev. Biol.* 1998. V. 201. P. 253–269.
10. *Lartillot N., Le Gour M., Adoutte A.* Expression patterns of fork head and gooseoid homologues in the mollusk *Patella vulgata* supports the ancestry of the anterior

- mesentoderm across Bilateria // *Dev. Gen. Evol.* 2002. V. 212. P. 551–561.
11. *Weygoldt P.* Embryologische Untersuchungen an Ostracoden: Die Entwicklung von *Cyprideis litoralis* // *Ibid.* 1960. V. 78. P. 370–426.
 12. *Benesch R.* Zur Ontogenie und Morphologie von *Artemia salina* // *Zool. Jahrb. Anat.* 1969. V. 86. P. 307–458.
 13. *Seifert R., Jacob M., Jacob H.J.* The avian prechordal head region: a morphological study // *J. Anat.* 1993. V. 183. P. 75–89.
 14. *Kiecker C., Niehrs C.* The role of prechordal mesoderm in neural patterning // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001. V. 11. P. 27–33.
 15. *Temereva E. N., Malakhov V. V.* Embryogenesis and larval development of *Phoronopsis harmeri* Pixell, 1912 (Phoronida): dual origin of the coelomic mesoderm // *Invertbr. Reprod. Dev.* 2007. V. 50. № 2. P. 57–66.
 16. *Temereva E. N., Malakhov V. V.* Embryogenesis in phoronids // *Invert. Zool.* 2012. V. 9. № 1. P. 1–39.

TWO SOURCES OF MESODERM IN BRACHIOPODS

T. V. Kuzmina, E. N. Temereva[#]

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

[#]*E-mail: temereva@mail.ru*

Presented by Academician of the RAS V. V. Malakhov

In Bilateria, the formation of the coelomic mesoderm occurs in various ways and is of great significance for comparative embryology and phylogeny. Several early ontogenetic stages were studied in the brachiopod *Coptothyris grayi* by scanning electron microscopy and cytochemistry combined with confocal laser microscopy. Two sources of the mesoderm were observed to form simultaneously from the anterior and posterior walls of the archenteron at the gastrula stage. Both anterior and posterior rudiments form enterocoely as unpaired protrusions of the wall of the archenteron and are subsequently separated from it. The findings confirmed the previous data on enterocoely in brachiopods. Moreover, a dual origin of the coelomic mesoderm from an anterior and a posterior precursor was for the first time demonstrated for all brachiopods. Analysis of the literature showed that two sources of the coelomic mesoderm in ontogeny are characteristic of representatives of various groups of protostomes and deuterostomes. This fact may provide evidence for the earlier hypothesis of plesiomorphy of two sources of the mesoderm in Bilateria.

Keywords: Lophophorata, Brachiopoda, ontogeny, development, mesoderm, coelom

УДК 576.5

ПРЯМОЕ РЕПРОГРАММИРОВАНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА С БОЛЕЗНЬЮ ХАНТИНГТОНА В НЕЙРОНЫ СТРИАТУМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ ПАТОЛОГИИ

© 2024 г. Н. А. Красковская*, М. Г. Хотин,
член-корреспондент РАН А. Н. Томилин, Н. А. Михайлова

Поступило 30.10.2023 г.

После доработки 03.11.2023 г.

Принято к публикации 04.11.2023 г.

Разработана новая *in vitro* модель болезни Хантингтона (БХ), основанная на прямом репрограммировании дермальных фибробластов пациента с данным генетическим заболеванием в нейроны стриатума. Прямое репрограммирование позволяет получать нейроны, исключая этап репрограммирования в индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки, при котором происходит потеря эпигенетической информации, заложенной в клетках конкретного донора, а следовательно, и возраст-ассоциированный фенотип заболевания. Новая модель воспроизводит основной гистопатологический признак болезни Хантингтона – накопление агрегатов мутантного белка хантингтина в нейронах стриатума, полученных из фибробластов больного. Проведение экспериментов на нейронах пациентов в культуре, полученных при помощи прямого репрограммирования, позволяет индивидуально оценить степень прогрессирования нейропатологии и осуществить персонализированный подход в выборе стратегии лечения и подборе лекарственных препаратов для терапии. Модель болезни Хантингтона *in vitro* может также быть использована для доклинических исследований лекарственных препаратов.

Ключевые слова: прямое репрограммирование, болезнь Хантингтона, нейроны, стриатум, фибробласты, агрегаты белка хантингтина

DOI: 10.31857/S2686738924010131, **EDN:** KPTWVG

Болезнь Хантингтона (БХ) является неизлечимым доминантно-наследуемым генетическим заболеванием человека, вызванным увеличением количества повторов кодона CAG выше порога в 36 триплетов в гене IT15, также известного как ген НТТ, кодирующем белок хантингтин [1]. Средний возраст манифестации составляет 35–45 лет, в зависимости от количества повторов CAG в полиморфном локусе гена. Увеличение количества повторов приводит к удлинению полиглутаминового тракта в белке, что в свою очередь приводит к формированию агрегатов мутантного белка в тканях головного мозга [2]. Большие успехи были достигнуты с применением технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых (iPS) клеток [3] и нейронов из них [4–6]. Однако iPS клетки имеют ряд недостатков, которые накладывают существенное ограничение на их использование в контексте мо-

делирования нейродегенеративных заболеваний [7]. При переходе через плюрипотентное состояние нейрональные клетки теряют большую часть эпигенетических меток, которые были приобретены в процессе дифференцировки и созревания соматических клеток, из которых они произошли [8]. Кроме того, «зрелость» нейронов, получаемых через iPS клетки, сильно зависит от протокола репрограммирования, который также зачастую трудно воспроизводится [9].

Ряд патологических изменений при развитии нейродегенеративных заболеваний, в том числе БХ, проявляется с возрастом, когда нейроны стареют и становятся более уязвимыми к клеточному стрессу [10]. Принимая во внимание этот важный аспект для моделирования БХ, мы сосредоточились на новом подходе к моделированию нейропатологии, основанном на прямом репрограммировании. Ключевым элементом данного подхода является отсутствие этапа дедифференцировки в эмбриональное состояние, прохождение через которое является причиной потери эпигенетической информации из клеток донора. Такой подход позволяет в большей

Институт цитологии Российской академии наук,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com

степени сохранить возраст-ассоциированный фенотип заболевания [7, 11], и лучше отражает характерный фенотип нейронов (например, гибель этих клеток), в отличие от моделей, в которых отсутствуют эпигенетические маркеры старения. В нейронах, полученных посредством прямого репрограммирования, наблюдается возраст-специфичный профиль транскрипции генов и снижение уровня ядерного транспортного рецептора, чего не наблюдалось в нейронах, полученных через iPS клетки [12]. Кроме того, нейроны, полученные путем прямого репрограммирования, лучше сохраняют признаки старения доноров, включая повреждения ДНК, потерю гетерохроматина и ядерной организации, а также повышенную активность бета-галактозидазы [7].

К настоящему моменту опубликовано всего 4 статьи с применением прямого репрограммирования для изучения патогенеза БХ [11, 13–15], что

во многом обусловлено низкой эффективностью процедуры этого метода и сильной гетерогенностью получаемых нейронов [16]. В предыдущем исследовании нами был оптимизирован протокол прямого репрограммирования, который позволил увеличить как выживаемость индуцированных нейронов стриатума (до 80%), так и гомогенность полученной популяции клеток [17].

В настоящем исследовании, методом прямого репрограммирования, нами получены нейроны стриатума из линии дермальных фибробластов HDDF от пациента с БХ и контрольных клеток линии DF1 от здорового донора [18]. На рис. 1 представлен общий вид культуры дермальных фибробластов *in vitro* от пациента с БХ и от донора без нейропатологии. Показано, что хантингтин распределен диффузно в цитоплазме обеих популяций фибробластов без видимых агрегатов (рис. 2). Однако существенное отличие наблюдается в нейронах стриатума, полученных из этих фибробластов. На рис. 3 показано, что в нейронах, полученных из фибробластов линии DF1, хантингтин по-прежнему распределен диффузно по цитоплазме и видимых агрегатов не образует. Вместе с тем, в нейронах, полученных из фибробластов линии HDDF, были визуализированы агрегаты хантингтина в some нейронах и в некоторых отростках этих клеток.

Таким образом нами было подтверждено, что в нейронах, полученных из фибробластов пациентов с БХ наблюдаются агрегаты мутантного белка, что является основным гистопатологическим признаком данной нейропатологии. Полученная клеточная модель отражает основные патологические изменения, происходящие в клетках при развитии БХ и имеет потенциал для применения в качестве платформы для оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов.

Существующие подходы персонализированной медицины предполагают подбор фармацевтической терапии, эффективной для конкретного пациента. Несмотря на то, что эффективные препараты для лечения или предотвращения БХ пока не разработаны, можно предположить, что их эффективность будет зависеть от знания генотипа и возраста пациента, а также стадии развития заболевания. Учитывая аутосомно-доминантный тип наследования БХ, можно предположить, что знание особенностей течения болезни у представителей старшего поколения семей, будет способствовать разработке методов лечения носителей БХ младших поколений, принимая во внимание их возрастные особенности. В данном случае использование технологии прямого репрограммирования становится необходимым инструментом для подбора терапии, наиболее безопасной и эффективной для конкретных пациентов.

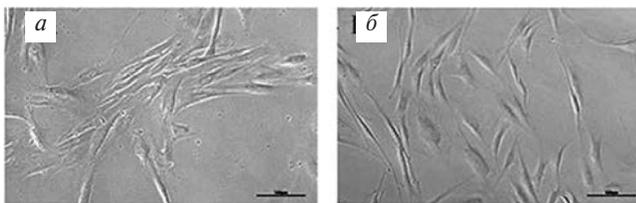


Рис. 1. Микрофотографии дермальных фибробластов человека *in vitro*. (а) Фибробласты линии DF1 (получены от здорового донора) и (б) линии HDDF (получены от донора с болезнью Хантингтона). Фазово-контрастная микроскопия, $\times 10$. Масштаб 100 мкм.

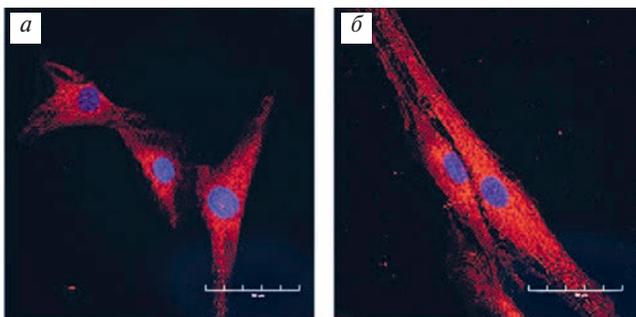


Рис. 2. Визуализация диффузного распределения белка хантингтина в цитоплазме дермальных фибробластов. (а) Клетки линии DF1 (здоровый донор) и (б) клетки линии HDDF (донор с болезнью Хантингтона). Иммунофлуоресцентное окрашивание антителами к хантингтину mEM48 (вторичные антитела конъюгированы с Alexa 555) (красный). Ядра клеток визуализированы красителем DAPI (синий). Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 50 мкм.

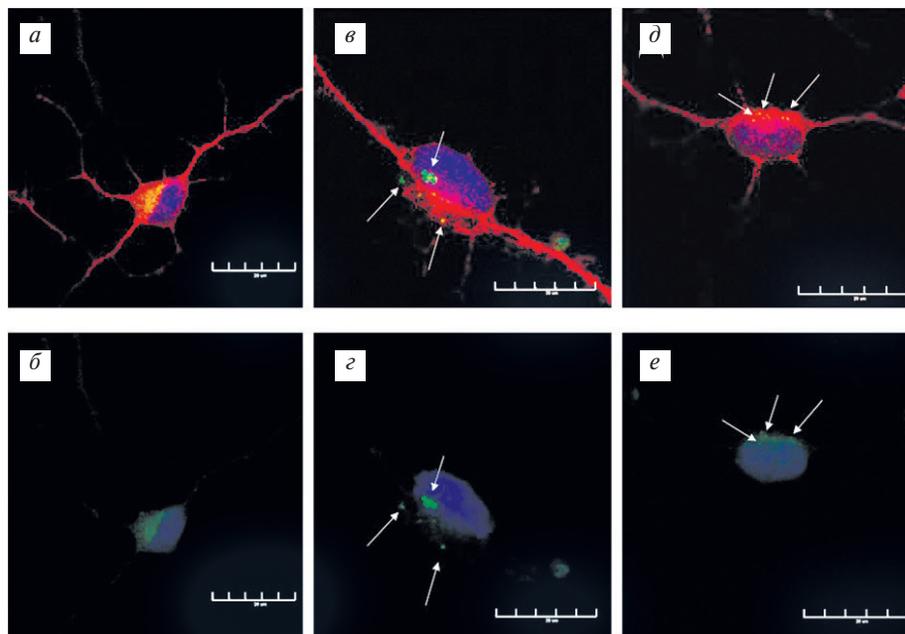


Рис. 3. Визуализация белка хантингтина (зеленый) в нейронах стриатума, полученных методом прямого репрограммирования из дермальных фибробластов: (а и б) клеток линии DF1 (здоровый донор) и (в, г, д, е) из клеток линии HDDF (донор с болезнью Хантингтона). Показан результат иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к нейрональному маркеру MAP2 (вторичные антитела конъюгированы с Alexa 555) и антителами к хантингтину mEM48 (вторичные антитела Alexa 488). Ко-локализация этих двух белков проявляется в желтом окрашивании. Ядра клеток визуализированы красителем DAPI (синий). Конфокальная микроскопия, $\times 60$. Масштаб 30 мкм. В нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов здорового донора, хантингтин в цитоплазме распределен диффузно (а и б), в то время как в нейронах стриатума, полученных из дермальных фибробластов пациента с болезнью Хантингтона, наблюдаются агрегаты этого белка (показаны стрелками) (в, г, д и е).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение дермальных фибробластов

Фибробласты от пациента с подтвержденным диагнозом БХ выделяли из биоптата кожи, согласно протоколу описанному ранее [18]. Пациент – женщина 36 лет с подтвержденным диагнозом БХ. В результате генетического исследования в гене белка хантингтина обнаружено 47 повторов кодона CAG. Перед забором ткани, который был осуществлен в условиях медицинского учреждения, проводили медицинский осмотр донора и получали его информированное добровольное согласие на забор ткани и использование клеток, полученных из нее, в научных исследованиях. Для работы с клетками было получено одобрение этической комиссии ИЦ РАН (Протокол № 12/23 от 08.08.2023).

Клетки из фрагмента биоптата кожи выделяли механическим способом и культивировали в среде, содержащей 90% DMEM/F12 (Биолот, Россия) + 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25%) – Версена (0,2%) по достижению ими 90% конфлюэнтности. Кратность

рассева составляла 1:3–1:5. Клетки активно пролиферировали, их жизнеспособность после криоконсервации составляла 80%. В качестве контроля использовали дермальные фибробласты линии DF1, полученные от здорового донора – женщины 37 лет (клетки были получены из ЦКП Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН).

Прямое репрограммирование дермальных фибробластов в нейроны стриатума

Для процедуры репрограммирования использовали лентивирусные векторы, кодирующие микро РНК miR-9/9* и miR-124 (инициируют ремоделирование хроматина), транскрипционные факторы MYT1L и DLX2 (направляют дифференцировку в ГАМКэргические нейроны) и STIP2 (направляет дифференцировку в нейроны стриатума). Экспрессия микроРНК контролировалась доксициклин-индуцибельным промотором. После селекции антибиотиком постмитотические клетки пересаживали на стекла, покрытые матригелем. Кондиционную среду для фибробластов на следующий день заменяли на среду для репрограм-

мирования, содержащую Neurobasal-As добавлением 2% B-27, 0.125 мМ добавки GlutaMAX (все Gibco, США), 1 мМ вальпроевой кислоты 1 мкМ ретиноевой кислоты, 200 мкМ дибутилц АМФ (SigmaAldrich, США), 20 нг/мл нейротрофического фактора мозга, 20 нг/мл нейротрофина 3 типа (PepcoTech, Великобритания) и 20 нг/мл нейротрофического фактора глиального клеточного происхождения. Клетки культивировали в течение 40 дней с момента инфицирования лентивирусами. Визуализацию хантингина проводили при помощи иммунофлуоресцентного окрашивания клеток антителами mEM48 (Merck Millipore).

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Минобрнауки России в рамках Соглашения № 075-15-2021-1063 (результаты на рис. 1 и 2) и грантом РНФ № 22-75-00106 (результаты на рис. 3).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group // *Cell*. 1993. V. 72. P. 971–983.
2. DiFiglia M., Sapp E., Chase K. O., Davies S. W., Bates G. P., Vonsattel J. P., Aronin N. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // *Science*. 1997. V. 277. P. 1990–1993.
3. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. P. 663–676.
4. Consortium H. D. i. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 11. P. 264–278.
5. Nekrasov E. D., Vigont V. A., Klyushnikov S. A., Lebedeva O. S., Vassina E. M., Bogomazova A. N., Chestkov I. V., Semashko T. A., Kiseleva E., Suldina L. A., Bobrovsky P. A., Zimina O. A., Ryzantseva M. A., Skopin A. Y., Illarioshkin S. N., Kaznacheyeva E. V., Lagarkova M. A., Kiselev S. L. Manifestation of Huntington's disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons // *Mol Neurodegener*. 2016. V. 11. P. 27.
6. Vigont V., Nekrasov E., Shalygin A., Gusev K., Klushnikov S., Illarioshkin S., Lagarkova M., Kiselev S. L., Kaznacheyeva E. Patient-Specific iPSC-Based Models of Huntington's Disease as a Tool to Study Store-Operated Calcium Entry Drug Targeting // *Front Pharmacol*. 2018. V. 9. P. 696.
7. Tang Y., Liu M. L., Zang T., Zhang C. L. Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons // *Front Mol Neurosci*. 2017. V. 10, 359.
8. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types // *Genome Biol*. 2013. V. 14. P. R115.
9. Le Cann K., Foerster A., Rosseler C., Erickson A., Hautvast P., Giesselmann S., Pensold, D., Kurth I., Rothermel M., Mattis V. B., Zimmer-Bensch G., von Horsten S., Denecke B., Clarner T., Meents J., Lampert A. The difficulty to model Huntington's disease in vitro using striatal medium spiny neurons differentiated from human induced pluripotent stem cells // *Sci Rep*. 2021. V. 11. P. 6934.
10. Machiela E., Jeloka R., Caron N. S., Mehta S., Schmidt M. E., Baddeley H. J. E., Tom C. M., Polturi N., Xie Y., Mattis V. B., Hayden M. R., Southwell A. L. The Interaction of Aging and Cellular Stress Contributes to Pathogenesis in Mouse and Human Huntington Disease Neurons // *Front Aging Neurosci*. 2020. V. 12. P. 524369.
11. Victor M. B., Richner M., Olsen H. E., Lee S. W., Monteyts A. M., Ma C., Huh C. J., Zhang B., Davidson B. L., Yang X. W., Yoo A. S. Striatal neurons directly converted from Huntington's disease patient fibroblasts recapitulate age-associated disease phenotypes // *Nature neuroscience*. 2018. V. 21. P. 341–352.
12. Mertens J., Paquola A. C. M., Ku M., Hatch E., Bohnke L., Ladjevardi S., McGrath S., Campbell B., Lee H., Herdy J. R., Goncalves J. T., Toda T., Kim Y., Winkler J., Yao J., Hetzer M. W., Gage F. H. Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects // *Cell Stem Cell*. 2015. V. 17. P. 705–718.
13. Liu Y., Xue Y., Ridley S., Zhang D., Rezvani K., Fu X. D., Wang H. Direct reprogramming of Huntington's disease patient fibroblasts into neuron-like cells leads to abnormal neurite outgrowth, increased cell death, and aggregate formation // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e109621.
14. Monk R., Lee K., Jones K. S., Connor B. Directly reprogrammed Huntington's disease neural precursor cells generate striatal neurons exhibiting aggregates and impaired neuronal maturation // *Stem Cells*. 2021. V. 39. P. 1410–1422.
15. Oh Y. M., Lee S. W., Kim W. K., Chen S., Church V. A., Cates K., Li T., Zhang B., Dolle R. E., Dahiya S., Pak S. C., Silverman G. A., Perlmutter D. H., Yoo A. S. Age-related Huntington's disease progression modeled in directly reprogrammed patient-derived striatal neurons highlights impaired autophagy // *Nat Neurosci*. 2022. V. 25. P. 1420–1433.
16. SamoiloVA E. M., Kalsin V. A., Kushnir N. M., Chistyakov D. A., Troitskiy A. V., Baklaushev V. P. Adult Neural Stem Cells: Basic Research and Production Strategies for Neurorestorative Therapy // *Stem Cells Int*. 2018. V. 2018. P. 4835491.
17. Kraskovskaya N., Bolshakova A., Khotin M., Bezprozvanny I., Mikhailova N. Protocol Optimization for Direct Reprogramming of Primary Human Fibroblast into Induced Striatal Neurons // *Int J Mol Sci*. 2023. V. 24.

18. Krylova T.A., M.A.S., Zenin V.V., Koltsova A.M., Kropacheva I.V., Turilova V.I., Yakovleva T.K., Poljanskaya G. G. Derivation and characteristic of a non-immortalized cell lines of human dermal fibroblasts, generated from skin of the eyelids of adult donors of different age // Tsitologia. 2016. V. 58. P. 850–864.

DIRECT REPROGRAMMING OF SOMATIC SKIN CELLS FROM A PATIENT WITH HUNTINGTON'S DISEASE INTO STRIATAL NEURONS TO CREATE MODELS OF PATHOLOGY

N. A. Kraskovskaya[#], M. G. Khotin,

Corresponding Member of the RAS A. N. Tomilin, N. A. Mikhailova

Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

[#]*E-mail: ninakraskovskaya@gmail.com*

A new *in vitro* model of Huntington's disease (HD) has been developed, based on the direct reprogramming of dermal fibroblasts from patients with the disease into striatal neurons. Direct reprogramming makes it possible to obtain neurons, preserving the epigenetic information inherent in the cells of a specific donor, and, consequently, the age-associated phenotype of the disease. The new model resembles the main histopathological feature of Huntington's disease – the accumulation of aggregates of the mutant huntingtin protein in striatal neurons obtained from the patient's fibroblasts. Conducting experiments on induced neurons from patients in culture, obtained using direct reprogramming, allows us to individually assess the degree of progression of neuropathology and implement a personalized approach in choosing a treatment strategy and selecting drugs for therapy. The *in vitro* model of Huntington's disease can be used for preclinical drug studies, for the treatment of neurodegenerative diseases and for assessing their effectiveness on neurons of specific patients.

Ключевые слова: direct reprogramming, Huntington's disease, neurons, striatum, fibroblasts, huntingtin protein aggregates

УДК 577.121:[574.24:591.351:597.552.51]

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА У СМОЛТОВ И ПЕСТРЯТОК АТЛАНТИЧЕСКОГО ЛОСОСЯ (*SALMO SALAR* L), ВЫРАЩИВАЕМЫХ С ПРИМЕНЕНИЕМ РАЗНЫХ РЕЖИМОВ ОСВЕЩЕНИЯ

© 2024 г. М. В. Кузнецова*, М. А. Родин, Н. С. Шульгина, М. Ю. Крупнова, А. Е. Курицин, С. А. Мурзина, академик РАН Н. Н. Немова

Поступило 30.10.2023 г

После доработки 10.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г.

В работе исследована активность ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени смолтов и пестряток атлантического лосося (*Salmo Salar* L), которых выращивали в осенний период при воздействии двух режимов фотопериода (постоянного и естественного) в сочетании с разным режимом кормления с последующим содержанием при зимнем коротком фотопериоде. Установлена зависимость в уровне активности исследуемых ферментов как с принадлежностью молоди лосося к экспериментальной группе, так и между пестрятками и смолтами, отобранными по окончании зимнего короткого фотопериода. Смолты, рост и развитие которых проходили в условиях постоянного режима освещения и круглосуточном кормлении, отличались от других групп более высокими значениями активности цитохром *c* оксидазы (ЦО) и низкими – альдолазы в мышцах. Установлены различия между пестрятками и смолтами в аэробном метаболизме в мышцах, одинаковые для всех экспериментальных групп, а именно: сравнительно высокая активность ЦО и альдолазы у смолтов. Характер изменений активности исследуемых ферментов в печени пестряток и смолтов различался у особей из разных экспериментальных групп. Результаты исследования активности ферментов энергетического обмена у молоди лосося, выращиваемой в условиях разных режимов фотопериода, позволяют предположить, что интенсивность и направление путей энергетического обмена и окисления глюкозы зависят от используемого светового режима, что, в конечном счете, может повлиять на завершенность процесса смолтификации исследуемых рыб.

Ключевые слова: фотопериод, атлантический лосось, смолты, пестрятки, активность ферментов энергетического обмена

DOI: 10.31857/S2686738924010145, **EDN:** KPQBQT

Смолтификация (трансформация пестрятки в смолта) – процесс развития атлантического лосося, направленный на подготовку к жизни в море. В течение этого периода у рыб происходят значительные биохимические, физиологические, морфологические и поведенческие изменения [1–5]. Фотопериод является одним из основных факторов, который в течение продолжительного времени влияет на процесс регуляции смолтификации у атлантического лосося [6]. В условиях искусственно-

го выращивания атлантического лосося увеличение светового дня используется для ускорения темпов роста и наступления смолтификации [7–8]. Ранее было показано [7–8], что в условиях выращивания молоди лосося при круглосуточном освещении для нормального развития и успешного завершения процесса смолтификации необходимо подвергать рыбу временному (в течение нескольких месяцев) воздействию короткого («зимнего») фотопериода с последующим увеличением продолжительности светового дня.

Нами был поставлен долгосрочный эксперимент по влиянию постоянного освещения на рост и развитие сеголетков лосося *Salmo salar* L. (0+) в условиях аквакультуры в южном регионе России (Республика Северная Осетия-Алания). С сентября по ноябрь (2022 г.) сеголетки лосося содержались

Институт биологии – обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения
науки Федерального исследовательского центра
«Карельский научный центр Российской академии наук»,
г. Петрозаводск, Россия,

*E-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

Таблица 1. Средние масса и длина особей, взятых для анализа, указаны в таблице

Группа	смолты		пестрятки	
	Масса, г	Длина, мм	Масса, г	Длина, мм
24С КК	59.91 ± 2.91	169.28 ± 3.54	53.63 ± 3.46	164.29 ± 2.98
ЕстФ КД	59.61 ± 4.11	172.5 ± 3.66	56.61 ± 3.35	168.48 ± 3.57
24С КД	63.64 ± 3.74	173.11 ± 3.89	55.31 ± 2.28	161.63 ± 1.73

в группах с разными режимами кормления и освещения. Результаты исследования, полученные для молоди лосося в осенний период, показали [9], что постоянное освещение оказывает положительное влияние на прирост массы сеголетков лосося в процессе развития, что согласуется с повышением уровня аэробного обмена в мышцах и усилением использования углеводов в гликолизе в печени рыб, а также с характерными изменениями липидного состава [10], свидетельствующими о начале смолтификации. С начала декабря молодь лосося из всех экспериментальных групп содержалась в условиях естественного зимнего фотопериода (без дополнительного освещения) в сочетании с разным режимом кормления. В данной работе представлены результаты изучения активности ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах и печени смолтов и пестряток атлантического лосося, которые были отобраны в начале марта по завершении зимнего (короткого) фотопериода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на предприятии ООО «Остров аквакультура» (Республика Северная Осетия-Алания). До начала эксперимента мальков (выклев 10–15 марта 2022 г) содержали в условиях непрерывного освещения (24LD) с использованием светодиодных осветителей LED (36W, 6500K). С начала сентября сеголетки содержались в экспериментальных условиях в трех группах по 2 лотка (выростные лотки размером 4 × 1.2 м, объемом 2.5–2.7 м³): группа № 1 («24С КК») – режим освещения постоянный (24С:0Т), кормление круглосуточное (КК); группа № 2 («ЕстФ КД») – экспериментальный – естественный фотопериод («ЕстФ»), кормление в светлое время суток (с 06:00 до 18:00 в сентябре, с 08:00 до 18:00 в октябре, с 08:00 до 17:00 в ноябре) через каждые два часа (КД); группа № 3 («24С КД») – режим освещения постоянный (24С), кормление проводилось только в светлое время суток как у рыб из группы № 2 (КД). С начала декабря подросшую молодь, согласно экспериментальным группам, перенесли в круглые бассейны объемом 2,1 м³ (диаметром 2 м, высотой 1 м) в количестве в среднем 2800 на бассейн. С декабря по март выращивание пестряток и смолтов проходило в усло-

виях естественного освещения региона при зимнем коротком дне (от 9 до 11 ч светового дня). Условия дневного освещения: 5500 lx, в пасмурную погоду – 500 lx. зимний период кормили в светлое время суток коммерческим кормом, одинаковым для всех групп; расчет корма проводили согласно нормам возрастной группы и с учетом биомассы. Вода в лотки поступала в объеме 2.7–3 л/сек на лоток со скважины, поэтому температурный режим был постоянным и с декабря по конец марта составил 10.3–10.8 °С. Более детально условия эксперимента описаны в наших недавних публикациях [9,10].

На день анализа (3 марта) количество смолтов в исследуемых группах составило: в группе «24С КК» – до 50%, «ЕстФ КД» – 40%, «24С КД» – 25%. Для исследования отбирали пестряток и смолтов лосося из каждой экспериментальной группы (табл. 1).

Активность ферментов энергетического и углеводного обмена в мышцах цитохром с оксидазы (ЦО КФ1.9.3.1., лактатдегидрогеназы ЛДГ, 1.1.1.27, альдолаза КФ 4.1.2.13) и печени (ЦО, ЛДГ, пируваткиназы (ПК, КФ 2.7.1.40), глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы Г-6-ФДГ, 1.1.1.49, глицеро-фосфатдегидрогеназы 1-ГФДГ КФ 1.1.1.8, альдолаза) определяли индивидуально для каждой особи по общепринятым методикам [11–14]. Активность ферментов выражали в мкмоль субстрата (продукта)/мин/мг белка. Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд [15]. Статистический анализ полученных результатов проводили общепринятыми методами вариационной статистики с использованием критерия Шапиро–Уилкса, теста Краскела–Уоллиса с последующим сравнением выборок по критерию Манна–Уитни. Все результаты считались значимыми при $p < 0.05$. Все данные представлены как $M \pm SE$. Исследование выполнено на оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния условий освещения на состояние смолтов и пестряток лосося определяли активность ферментов энергетического и углеводного обмена. По активности ключевых ферментов анаэ-

робного и аэробного синтеза АТФ, путей окисления глюкозы можно судить об энергетическом статусе и функциональной активности органов рыб. Так, ЦО – ключевой фермент дыхательной цепи митохондрий, активность которого свидетельствует об уровне аэробного метаболизма [16]; ЛДГ, фермент гликолиза, может служить показателем анаэробного обмена в мышцах и глюконеогенеза в печени [17]. ПК – ключевой фермент гликолиза, катализирует реакцию превращения фосфоенолпирувата в пируват, и уровень ее активности характеризует интенсивность этого процесса [18]. Альдолаза (фермент гликолиза) – катализирует образование дигидроксиацетонфосфата и глицеральдегид-3-фосфата, которые впоследствии участвуют в процессах гликолиза, глюконеогенеза и образования липидов [19]. Фермент 1-ГФДГ катализирует реакцию образования 1-глицерофосфата, который является предшественником структурных и запасных липидов [20]; Г6ФДГ является ключевым ферментом пентозофосфатного пути (ПФП), в котором происходит образование пентоз и генерируется восстановитель в форме НАДФН, использующийся в реакциях биосинтеза холестерина, жирных кислот [21].

Межгрупповые различия

Согласно результатам, установлены различия между группами рыб по активности ЦО и альдолазы в мышцах. Так активность ЦО в мышцах у смолтов из группы «24С КК» выше, чем в других группах (рис. 1, а). Значения активности ЦО указывают на более высокий уровень аэробного обмена в мышцах особей из групп с постоянным освещением. Ранее нами было установлено, что в период до применения зимнего фотопериода уровень аэробного обмена был выше в мышцах рыб, выращиваемых при постоянном освещении, что связали с преимуществами энергообеспечения процессов роста у этих рыб [9]. Поскольку смолтификационные пестройки связаны еще и с ускорением темпов роста [5], то вероятно, более высокий уровень аэробного обмена у смолтов из группы «24С КК» может указывать на успешность в темпах роста.

Как у пестряток, так и у смолтов различия по активности альдолазы в мышцах были схожие: у рыб группы «24С КК» активность ниже, чем в других группах (рис. 1, б). Результаты согласуются с ранее полученными: в ноябре, активность альдолазы в мышцах (а также и печени) была ниже у рыб группы «24С КК» [9]. Можно предположить, что у рыб из группы с естественным освещением в энергетическом обмене преимущественно используются углеводы, в то время как у рыб из группы «24С КК» для этих целей могут расходоваться и другие субстраты. Поскольку снижение активности альдолазы в мышцах рыб из группы «24С КК» наблюдается на раз-

ных стадиях, это указывает на метаболические перестройки и перераспределение запасных веществ в результате использования дополнительного освещения и круглосуточного кормления. У смолтов из группы «24С КК» активность альдолазы, напротив, выше, чем в других группах, что указывает на высокий уровень использования углеводов в энергетическом обмене. Межгрупповых различий по активности ЛДГ и ПК у пестряток и смолтов установлено не было.

В печени смолтов различия между группами установлены по активности ферментов путей окисления глюкозы: 1-ГФДГ и Г6ФДГ. Активность Г6ФДГ в печени смолтов в группе «24С КК» была ниже, чем в других группах, а у рыб 24С КД – выше (табл. 2). Установлена более высокая активность 1-ГФДГ в печени рыб из группы «24С КК» по сравнению с таковой у смолтов из группы «24С КД» (табл. 2). Можно предположить, что интенсивность использования глюкозы в разных путях биосинтеза (ПФП и образование глицерофосфата) отличается между исследуемыми группами рыб. Вероятно, что у рыб из группы «24С КК» период энергоемких метаболических смолтификационных изменений завершается и наблюдается переход к накоплению энергетических запасов, что согласуется с данными наших коллег по соотношению липидных фракций [22]. На интенсификацию восстановления энергетических запасов у смолтов из группы «24С КК» по сравнению с рыбами из других групп указывает более высокая активность ЛДГ в печени (табл. 2), что связано с интенсивностью глюконеогенеза.

Сравнение пестряток и смолтов

Процесс трансформации пестрятки в смолта у атлантического лосося *Salmo salar* L. представляет собой совокупность метаболических и поведенческих изменений, которые влияют на липидный и углеводный обмен, осморегуляцию, транспорт кислорода, рост и реотаксис [4, 5]. Этап завершения смолтификации характеризуется уменьшением коэффициента упитанности и увеличением устойчивости к солёности воды, ускорением роста, повышением активности жаберной Na^+/K^+ -АТФазы, а также концентрации гормона роста в плазме [5].

Согласно анализу данных были выявлены различия в аэробном метаболизме в мышцах между пестрятками и смолтами, одинаковые для всех экспериментальных групп. Более высокая активность ЦО в мышцах у смолтов по сравнению с пестрятками, указывает на увеличение энергетических затрат при смолтификации, необходимых для поддержания адаптивных реакций метаболизма, а также для процессов роста [4]. В частности, у смолтов выяв-

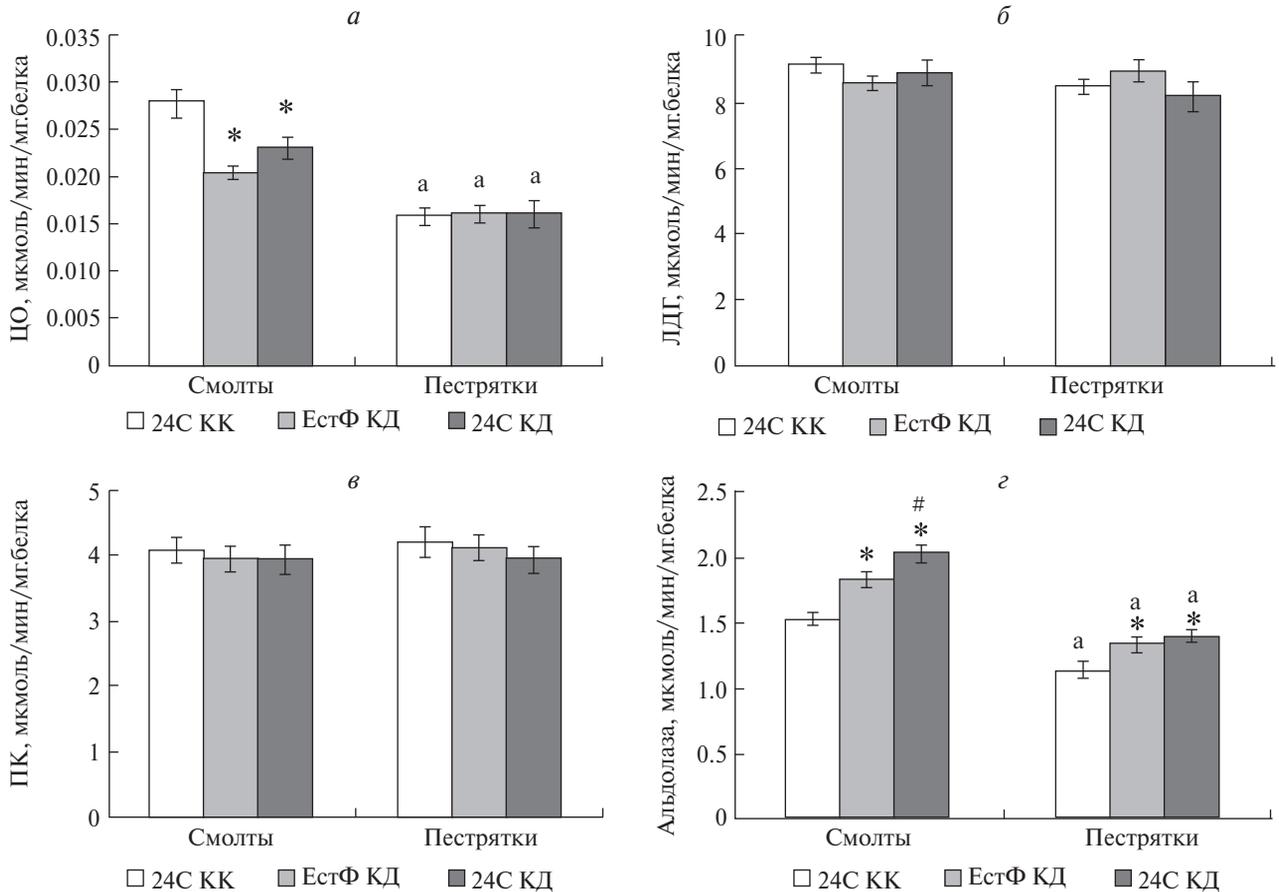


Рис. 1. Активность ферментов ЦО (а), ЛДГ (б), ПК (в), альдолазы (г) (мкмоль/мин/мг белка) в белых мышцах атлантического лосося, выращиваемого в группах с разными режимами освещения и кормления («24С КК» – режим освещения постоянный, кормление круглосуточное; «ЕстФ КД» – естественный фотопериод, кормление в светлое время суток; «24С КД» – режим освещения постоянный, кормление в светлое время суток). Различия достоверны при $p < 0.05$: * – в сравнении с группой «24С КК», # – в сравнении с группой «ЕстФ КД», а – между смолтами и пестрятками в соответствующей группе.

лена интенсификация окислительных процессов: у атлантического лосося стандартные и активные показатели метаболизма у смолтов на 50% выше, чем у пестряток [23], предполагается, что это повышение может быть связано с увеличением активности дыхательных ферментов и пролиферацией митохондрий, вызванными повышением уровня гормонов щитовидной железы [24].

Показано, что активность ЛДГ в мышцах не изменяется от пестряток к смолтам (рис. 1б). Этот результат отличается от данных, полученных для лосося из естественных популяций, согласно которым активность ЛДГ у мигрирующих смолтов в мышцах была выше, чем у пестряток [25]. Такие различия связаны с дополнительными энергозатратами на осуществление физической активности во время миграции вниз по течению реки [4, 5], в чем нет необходимости для молоди лосося, которая выращи-

вается в условиях аквакультуры.

Уровень активности альдолазы в мышцах увеличивается у смолтов по сравнению с пестрятками во всех группах (рис. 1г). Это указывает на то, что у смолтов повышается использование углеводов в аэробном и анаэробном обмене.

Характер изменений активности исследуемых ферментов в печени между пестрятками и смолтами различался у разных экспериментальных групп. Так для группы «24С КК» было характерно снижение активности ЦО и ГбФДГ у смолтов по сравнению с пестрятками, а для группы 24С КД – уменьшение активности ЛДГ и 1-ГФДГ (табл. 2). Это позволяет предположить наличие различий в интенсивности процессов биосинтеза и глюконеогенеза, что, возможно, указывает на разные временные стадии завершения процесса смолтификации у рыб из разных групп. Так, согласно результатам

Таблица 2. Относительная активность ферментов (мкмоль/мин/г белка) в печени форели в зависимости от условий освещения и кормления ($M \pm m$)

	Условия освещения и кормления		
	24С КК	ЕстФ КД	24С КД
ЦО			
Смолты	0.084 ± 0.004	0.087 ± 0.009	0.098 ± 0.009
Пестрятки	0.108 ± 0.009 ^a	0.104 ± 0.005	0.098 ± 0.005
ЛДГ			
Смолты	1.76 ± 0.10	1.38 ± 0.09*	1.44 ± 0.07*
Пестрятки	1.74 ± 0.17	1.77 ± 0.06 ^a	1.74 ± 0.10 ^a
ПК			
Смолты	0.0167 ± 0.0010	0.0155 ± 0.0010	0.0177 ± 0.0016
Пестрятки	0.0104 ± 0.0005 ^a	0.0107 ± 0.0004 ^a	0.0121 ± 0.0007 ^a
Г6ФДГ			
Смолты	0.0249 ± 0.0010	0.0295 ± 0.0010*	0.0318 ± 0.0005**
Пестрятки	0.0292 ± 0.0008 ^a	0.0308 ± 0.0014	0.0295 ± 0.0011
1-ГФДГ			
Смолты	0.0215 ± 0.0004	0.0201 ± 0.0010	0.0165 ± 0.0013*
Пестрятки	0.0207 ± 0.0013	0.0190 ± 0.0012	0.0204 ± 0.0012 ^a
Альдолаза			
Смолты	0.0311 ± 0.0013	0.0295 ± 0.0016	0.0286 ± 0.0017
Пестрятки	0.0328 ± 0.0018	0.0297 ± 0.0018	0.0294 ± 0.0017

Примечание. Различия достоверны при $p < 0.05$: * – в сравнении с группой «24С КК», # – в сравнении с группой «ЕстФ КД», а – между смолтами и пестрятками в соответствующей группе.

анализа липидного и жирнокислотного состава [22, 26] с учетом процентного соотношения смолтов к пестрятке, процесс смолтификационных перестроек у рыб группы «24С КД» протекает медленнее. Если сравнивать условия выращивания в этих двух группах рыб, то, вероятно, изменение схемы кормления (круглосуточное и кормление днем) при постоянном освещении способствовало определенной перестройке метаболизма.

В группе «ЕстФ КД» уровень активности ЛДГ также был ниже (табл. 2), что может свидетельствовать о снижении лактатзависимого глюконеогенеза [23]. Такое снижение уровня ЛДГ в печени во время смолтификации было выявлено другими авторами у атлантического лосося [23] и лосося масу *Onchorhinkus masu* [27].

Общим для рыб всех исследуемых групп было увеличение ПК в печени у смолтов по сравнению

с пестрятками (табл. 2). Это указывает на увеличение интенсивности использования глюкозы в энергетическом обмене и процессах биосинтеза [18].

Таким образом, показано, что использование круглосуточных режимов кормления и освещения при выращивании молоди лосося вызывает определенные метаболические перестройки, способствующие более интенсивному росту рыб и последующей смолтификации. Период короткого зимнего фотопериода способствовал наступлению смолтификации после применяемых режимов круглосуточного освещения. Результаты исследований активности ферментов аэробного и анаэробного обмена и путей окисления глюкозы у молоди рыб при их выращивании в заданных экспериментальных условиях, позволяют предположить, что выявленные различия в интенсивности процессов биосинтеза и глюконеогенеза в печени и аэробного обмена в мышцах, указывают на разные стадии

завершения процесса смолтификации у рыб, рост и развитие которых проходили в условиях разных фотопериода и режимов кормления. Смолты отличаются от пестряток (вне зависимости от экспериментальных групп) усиленным аэробным обменом и повышенным использованием углеводов в мышцах и гликолиза в печени.

Представленные в настоящей работе результаты дополняют сведения о роли факторов среды в реализации биохимических адаптаций в процессе роста и смолтификации у молоди лососевых рыб в условиях аквакультуры.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при финансовой поддержке проекта Российского научного фонда № 19-14-00081-П «Влияние физических факторов на эффективность искусственного (заводского) воспроизводства молоди атлантического лосося *Salmo salar*: физиолого-биохимическая и молекулярно-генетическая характеристика».

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают глубочайшую благодарность главному рыбоводу предприятия М. Горбунову за курирование эксперимента, проведение необходимых рыбохозяйственных мероприятий, сбор биоматериала, компетентные консультации и рекомендации в ходе реализации исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Веселов А. Е., Калюжин С. М.* Экология, поведение и распределение молоди атлантического лосося. Петрозаводск: Карелия. 2001. 160 с.
2. *Павлов Д. С., Савваитова К. А., Кузищин К. В. и др.* Тихоокеанские благородные лососи и форели Азии. М.: Науч. мир. 2001. 200 с.
3. *Павлов Д. С., Нефедова З. А., Веселов А. Е. и др.* Сравнение липидных спектров сеголеток Атлантического лосося // Биологические ресурсы Белого моря и внутренних водоемов Европейского Севера. 2009. С. 404–407.
4. *Stefansson S. O., Björnsson B. T., Ebbesson L. O.E. et al.* In: *Fish Larval Physiology*, eds R. N. Finn, B. G. Kapoor. Science Publishers, Enfield, NH, USA. 2008. P. 639–681.
5. *McCormick S. D.* Smolt physiology and endocrinology. *Fish physiology*. 2013. V. 32. P. 199–251.
6. *Handeland S. O., Stefansson S. O.* Photoperiod control and influence of body size on off-season parr–smolt transformation and post-smolt growth // *Aquaculture*. 2001. V. 192. P. 291–307.
7. *Stefansson S. O., Nilsen T. O., Ebbesson L. O. et al.* Molecular mechanisms of continuous light inhibition of Atlantic salmon parr–smolt transformation // *Aquaculture*. 2007. V. 273. № 2–3. P. 235–245.
8. *Strand J. E. T., Hazlerigg D., Jørgensen E. H.* Photoperiod revisited: is there a critical day length for triggering a complete parr–smolt transformation in Atlantic salmon *Salmo salar*? // *Journal of fish biology*. 2018. V. 93. № 3. С. 440–448.
9. *Кузнецова М. В., Родин М. А., Шульгина Н. С. и др.* Влияние разных режимов освещения и кормления на активность ферментов энергетического обмена у сеголетков атлантического лосося в условиях аквакультуры // *Онтогенез*. 2023. Т. 54. № 2. С. 162–171.
10. *Мурзина С. А., Провоторов Д. С., Воронин В. П. и др.* Показатели липидного обмена у сеголетков атлантического лосося *Salmo salar*, в условиях аквакультуры в южном регионе РФ при разных режимах освещения и кормления // *Известия РАН. Серия биологическая*. 2023. № 2. С. 134–148.
11. *Smith L.* Spectrophotometric assay of cytochrome c oxidase // *Methods in Biochem Analysis* 2. P. 427–434.
12. *Колб В. Г., Камышников В. С.* Клиническая биохимия. Минск: Изд-во Беларусь, 1976. 311 с.
13. *Кочетов Г. А.* Практическое руководство по энзимологии. М.: Высш. шк., 1980. 272 с.
14. *Bücher T., Pfeleiderer G.* Pyruvate kinase from muscle // *Methods in Enzymology*. 1955. V. I. P. 345–440.
15. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem*. 1976. V. 72. P. 248–254.
16. *Goolish E. M., Adelman I. R.* Tissue specific cytochrome c oxidase activity in largemouth bass: the metabolic cost of feeding and growth // *Physiological Zoology*. 1987. V. 60. P. 454–464.
17. *Gauthier C., Campbell P., Couture P.* Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*) // *Comparative Biochemistry and Physiology: Part A*. 2008. V. 151. P. 526–532.
18. *Metón I., Mediavilla D., Caseras A. et al.* Effect of diet composition and ration size on key enzyme activities of glycolysis–gluconeogenesis, the pentose phosphate pathway and amino acid metabolism in liver of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) // *British Journal of Nutrition*. 1999. V. 82. № 3. P. 223–232.
19. *Llewellyn L., Sweeney G. E., Ramsurn V. P. et al.* Cloning and unusual expression profile of the aldolase B gene from Atlantic salmon // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Gene Structure and Expression*. 1998. V. 1443. № 3. P. 375–380.
20. *Treberg J. R., Lewis J. M., Driedzic W. R.* Comparison of liver enzymes in osmerid fishes: key differences between a

- glycerol accumulating species, rainbow smelt (*Osmerus mordax*), and a species that does not accumulate glycerol, capelin (*Mallotus villosus*). *Comp Biochem Physiol A Mol. Integr. Physiol.* 2002. V. 132. P. 433–438.
21. Tian W. N., Braunstein L. D., Pang J. et al. Stanton R. C. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 10609–10617.
 22. Провоторов Д. С., Мурзина С. А., Воронин В. П. и др. Липидный профиль пестряток и смолтов атлантического лосося *Salmo salar* L., выращенных в аквакультуре при введении разных режимов освещения // *Известия РАН. Серия биологическая.* 2023/24 (в печати).
 23. Maxime V., Boeuf G., Pennec J. P., et al. Comparative study of the energetic metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts // *Aquaculture.* 1989. V. 82. № 1. P. 163–171.
 24. Leonard J. B., McCormick S. D. Metabolic enzyme activity during smolting in stream- and hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) // *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.* 2001.
 25. Churova M. V., Meshcheryakova O. V., Veselov A. E. et al. Activity of metabolic enzymes and muscle-specific gene expression in parr and smolts Atlantic salmon *Salmo salar* L. of different age groups // *Fish Physiology and Biochemistry.* 2017. V. 43. № 4. P. 1117–1130.
 26. Провоторов Д. С., Мурзина С. А., Воронин В. П. и др. Состав жирных кислот общих липидов у пестряток и смолтов атлантического лосося *Salmo Salar* L. выращенных в аквакультуре при разных режимах освещения // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2023 (в печати).
 27. Mizuno S., Urabe H., Aoyama T. et al. Changes in activity and transcript level of liver and gill metabolic enzymes during smoltification in wild and hatchery-reared masu salmon (*Oncorhynchus masou*) // *Aquaculture.* 2012. V. 362. P. 109–120.

METABOLIC ENZYMES ACTIVITY IN SMOLTS AND PARRS OF ATLANTIC SALMON (*Salmo Salar* L) GROWN UNDER DIFFERENT LIGHT REGIMES

M. V. Kuznetsova[#], M. A. Rodin, N. S. Shulgina, M. Yu. Krupnova, A. E. Kuritsin,
S. A. Murzina, Academician of the RAS N. N. Nemova

*Institute of Biology of the Karelian Research Centre of the Russian Academy of Sciences,
Petrozavodsk, Russian Federation*

[#]E-mail: kuznetsovamvi@yandex.ru

The activities of enzymes of energy and carbohydrate metabolism in the muscles and liver of smolts and parrs of Atlantic salmon (*Salmo Salar* L), which were grown in the autumn period under the influence of two photoperiod modes (constant and natural) in combination with a different feeding regime and subsequent maintenance during the winter short photoperiod, were investigated. The dependence in the activity level of the studied enzymes was established both with the membership of the juvenile salmon to the experimental group, and between the parr and smolts selected at the end of the winter short photoperiod. The smolts, grown under conditions of constant lighting and round-the-clock feeding, differed from other groups by higher values of cytochrome c oxidase (COX) activity and low values of aldolase in muscles. The differences between parr and smolts in aerobic metabolism in muscles were found to be the same for all experimental groups, namely: relatively high activity of COX and aldolase in smolts. The pattern of changes in the activity of the studied enzymes in the liver of parrs and smolts differed in individuals from different experimental groups. The results of the study of the activity of energy metabolism enzymes in salmon juveniles grown under different photoperiod conditions suggest that the intensity and direction of the pathways of energy metabolism and glucose oxidation depend on the light regime used, which, consequently, may affect the completeness of the smoltification process of the studied fish.

Keywords: photoperiod, Atlantic salmon, smolts, parrs, activity of enzymes of energy metabolism

УДК 551.89:568.24:598.241.4

НЕОЖИДАННАЯ НАХОДКА ТРЕХПЕРСТКИ (AVES: CHARADRIIFORMES: TURNICIDAE) В НИЖНЕМ ПЛЕЙСТОЦЕНЕ КРЫМА

© 2024 г. Н. В. Зеленков

Представлено академиком РАН А. В. Лопатиным

Поступило 23.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г.

Трехперстки (семейство Turnicidae отряда Charadriiformes) – морфологически специализированная группа мелких, преимущественно тропических птиц открытых ландшафтов, крайне бедно представленная в палеонтологической летописи. В статье описана фрагментарная плечевая кость трехперстки из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в центральном Крыму. Это первая находка семейства Turnicidae в Евразии в хронологическом интервале от плиоцена до среднего плейстоцена. Данная находка подчеркивает ограниченность имеющихся сведений о таксономическом составе авифаун раннечетвертичного времени Евразии даже на семейственном уровне, а также проливает свет на позднекайнозойскую эволюционную историю Turnicidae.

Ключевые слова: ископаемые птицы, Turnicidae, ранний плейстоцен, Восточная Европа, Северное Причерноморье

DOI: 10.31857/S2686738924010157, **EDN:** KPDJWT

Раннеплейстоценовые фауны птиц Евразии остаются одними из наименее изученных среди древних кайнозойских авифаун континента. Ограниченные данные имеются по ископаемым птицам раннего плейстоцена Центральной и отчасти Восточной Европы, а также Восточного Китая [1], однако таксономический состав фаун птиц этой эпохи в целом для Евразии остается во многом неясным [2]. При этом раннеплейстоценовые авифауны имеют определяющее значение для реконструкции завершающих этапов эволюции современных фаунистических сообществ птиц, корни которых уходят в конец раннего – среднего плейстоцен [3].

В связи с очень слабой изученностью раннеплейстоценовой истории птиц Евразии большое значение имеют находки в недавно открытой пещере Таврида в Крыму, ископаемая фауна позвоночных которой датируется серединой раннего плейстоцена (1.8–1.5 млн л.н.) [4]. Среди птиц из пещеры Таврида описаны самая крупная нелетающая птица Северного полушария *Pachystruthio dmanisensis* (Burchak-Abramovich et Vekua, 1990), древнейшая в палеонтологической летописи утка-широконоска

Spatula praeclypeata Zelenkov, 2022, а также первый в Восточной Европе ископаемый рябок *Pterocles bosporanus* Zelenkov, 2023 [5–7]. В этой статье из пещеры Таврида описана новая неожиданная находка ископаемого представителя экзотических (преимущественно тропических) птиц – трехперстки (семейство Turnicidae отряда Charadriiformes). Это первая находка трехперсток в плиоцене – среднем плейстоцене Евразии и одна из единичных находок семейства Turnicidae в палеонтологической летописи. Материал хранится в коллекции Палеонтологического института им. А.А. Борисяка РАН (ПИН) в Москве.

Трехперстки – компактная (18 видов в составе двух современных родов) и морфологически хорошо очерченная группа мелких наземных птиц, внешне похожих на мелких фазановых (в частности, на перепелов, что обусловило английское название этой группы, “buttonquail”) и населяющих открытые и зачастую аридные местообитания в тропиках и отчасти субтропиках Старого Света (рис. 1).

Одной из ярких отличительных особенностей трехперсток может считаться их необычайно высокая скорость воспроизводства – это может служить объяснением ускоренной морфологической (в значительной степени, остеологической) эволюции группы, на долгое время затруднившей определение родственных связей этих птиц. Скелет трехпер-

Палеонтологический институт им. А.А. Борисяка РАН,
Москва

E-mail: nzelen@paleo.ru



Рис. 1. География современного распространения и ископаемых плиоцен-четвертичных находок трехперсток (Turnicidae): сплошная заливка – современный ареал семейства Turnicidae; белые круги – ранее известные плиоцен-четвертичные находки (см. текст); звезда – новая раннеплейстоценовая находка *Turnix* sp. в пещере Таврида, Центральный Крым.

сток (и, в особенности, у рода *Turnix* Bonnaterre, 1791) преобразован столь значительным образом, что это не позволяло морфологам XVIII–XX вв. корректно определять даже отрядную принадлежность этой группы [8]. Только находка переходных ископаемых форм впервые указала на близость трехперсток к ржанкообразным (Charadriiformes) [9, 10], что позднее было подтверждено молекулярными данными [11].

Трехперстки крайне редки в палеонтологической летописи даже по сравнению со многими другими группами птиц. Стволовые представители группы из родов *Turnipax* Mayr, 2000 и *Cerestenia* Mayr, 2000, заметно отличающиеся морфологически от современных Turnicidae и первоначально выделявшиеся в отдельное семейство Turnipacidae, известны из раннего олигоцена Франции и Германии [10, 12], а род *Eociffia* Mourer-Chauvire, Pickford et Senut, 2017, рассматриваемый как Charadriiformes incertae sedis, но родственной Turnicidae – из эоцена Намибии [13]. Из позднего олигоцена и среднего миоцена Франции по нескольким костям описаны трехперстки, сходные с родом *Turnipax* [14]. Дистинктивная морфология стволовых представителей группы свидетельствует и об отличной экологической специализации этих птиц по сравнению с современными Turnicidae [10, 12].

Кроновые представители семейства трехперстковых (*Ortyxelos janossyi* (Kessler, 2009) и неопределимые Turnicidae) найдены в верхнем миоцене Венгрии, Украины и Казахстана и также представлены лишь единичными костями [15]. Более молодые находки трехперсток известны из нижнего плиоцена и нижнего плейстоцена Южной Африки, а также из верхнего плейстоцена – голоцена Египта, Мадагаскара, Восточного Китая, Японии и Австралийского региона [1, 15–20]. В плиоцене и раннем – среднем плейстоцене Евразии эта группа птиц до настоящего времени отмечена не была.

Описываемая находка из пещеры Таврида (рис. 2) представлена дистальным фрагментом левой плечевой кости (экз. ПИН, № 5644/1777) очень мелкой неворобыной птицы (мельче, чем современный перепел *Coturnix coturnix* (Linnaeus, 1758)), характеризующейся типичной морфологией Turnicidae. Размеры экз. ПИН, № 5644/1777: общая длина фрагмента – 13 мм; ширина дистального эпифиза – 5.2 мм; минимальная ширина стержня – 2.3 мм. Для этого экземпляра характерно выраженное выпуклое вентральное расширение стержня непосредственно проксимальнее дистального эпифиза (рис. 2, ext), как у Turnicidae. Для других птиц, и в частности остальных Charadriiformes, подобное строение плечевой кости нехарактерно [15]. Так же,



Рис. 2. Дистальная часть плечевой кости *Turnix* sp. из нижнего плейстоцена пещеры Таврида в сравнении с ископаемыми и современными Turnicidae: *a*, *д* – экз. ПИН, № 5644/1777, *Turnix* sp.; пещера Таврида, Крым, нижний плейстоцен; *б* – Turnicidae gen. indet., экз. Национального научно-природоведческого музея, Киев, NMNHU-P Eg-2-02; местонахождение Егоровка-2, Одесская обл., Украина; верхний миоцен; *в* – *Turnix tanki* Blyth, 1843, остеологическая коллекция ПИН, экз. 53-5-1, современный; *г* – *Turnix ocellatus* (Scopoli, 1786), экз. Национального музея естественной истории, Париж, MNHN 1884-2466, современный; *a-г* – с краниальной стороны; *д* – с каудальной стороны. Обозначения: *cd* – дорсальный мыщелок; *cv* – вентральный мыщелок; *ed* – дорсальный надмыщелок; *fb* – fossa m. brachialis, *ext* – дистальное расширение; *psd* – дорсальный надмыщелковый отросток.

как и у Turnicidae, у экз. ПИН, № 5644/1777 fossa m. brachialis явственно приближена к вентральному краю кости, а вентральный мыщелок выражено выступает дистально по отношению к дорсальному мыщелку; дорсальный надмыщелок широкий (рис. 2).

Хорошо выраженное вентральное расширение наряду со слабо выраженным дорсальным надмыщелковым отростком и узким вентральным мыщелком позволяют относить экз. ПИН, № 5644/1777 к роду *Turnix*. Для современного рода *Ortyxelos* Vieillot, 1825 характерно слабо развитое вентральное расширение (что заметно при виде как с краниальной, так и с каудальной сторон), крупный дорсальный надмыщелковый отросток и дорсовентрально широкий вентральный мыщелок [14]. Кроме того, у *Ortyxelos* дорсальный надмыщелок практически не выражен. Палеогеновые и раннемиоценовые трехперстки отчасти сходны с *Ortyxelos* по морфологии плечевой кости [10, 14].

Сохранность экз. ПИН, № 5644/1777 не позволяет установить видовую принадлежность находки в пределах рода *Turnix*. При этом от трехперстки из позднего миоцена южной Украины (местонахождение Егоровка-2) экз. ПИН, № 5644/1777 отличается дистально сдвинутым дорсальным надмыщелковым

отростком и прямым профилем дорсального края дорсального надмыщелка при виде с краниальной стороны. У трехперстки из Егоровки указанный край вогнутый, а дорсальный надмыщелковый отросток достаточно крупный, как у *Ortyxelos* [15].

Присутствие трехперстки в раннем плейстоцене Крыма обогащает известную авифауну умеренного пояса Евразии этого временного интервала, подчеркивая неполноту имеющихся сведений о таксономических сообществах птиц раннечетвертичного времени континента даже на семейственном уровне. Трехперстка из пещеры Таврида, несомненно, представляет собой реликт неогеновой авифауны региона и, по-видимому, одним из последних Turnicidae в Восточной Европе. Отсутствие трехперсток в достаточно хорошо изученных фаунах птиц среднего плейстоцена южной Европы [1, 3] указывает на то, что в южной части умеренного пояса Западной Евразии эти птицы исчезли по мере похолодания климата в калабрии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор признателен Д.О. Гимранову (Институт экологии растений и животных Уральского отделения РАН, Екатеринбург) за сбор и передачу описанной находки и акад. А.В. Лопатину (ПИН) за замечания к рукописи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда, № 22-14-00214, <https://rscf.ru/project/22-14-00214/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tyrberg T.* Pleistocene birds of the Palaearctic: a catalogue. Cambridge, Mass.: Nuttall Ornithol. Club, 1998. 720 p.
2. *Зеленков Н. В.* // Зоол. журн. 2013. Т. 92. С. 1077–1087.
3. *Mourer-Chauviré C.* // Palaeovertebrata. 1993. V. 22. P. 73–98.
4. *Лопатин А. В., Вислобокова И. А., Лавров А. В., и др.* // Докл. Акад. Наук. 2019. Т. 485. С. 381–385.
5. *Zelenkov N. V., Lavrov A. V., Startsev D. B., et al.* // J. Vertebr. Paleontol. 2019. Vol. 39. P. e1605521.
6. *Зеленков Н. В.* // Палеонтол. журн. 2022. № 6. С. 92–104.
7. *Зеленков Н. В.* // Докл. РАН. Науки о жизни. 2023. Т. 511. С. 371–374.
8. *Sibley C. G., Ahlquist J. E.* Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. London: Yale University Press, New Heaven, 1990. 976 p.
9. *Mayr G.* // Geobios. 2000. V. 33. P. 625–636.
10. *Mayr G., Knopf C. W.* // Ibis. 2007. Vol. 149. P. 774–782.
11. *Paton T. A., Baker A. J., Groth J. C., Barrowclough G. F.* // Mol. Phyl. Evol. 2003. V. 29. P. 268–278.
12. *Mayr G.* Avian evolution: the fossil record of birds and its paleobiological significance. Chichester, West Sussex: John Wiley and Sons, 2017. 293 p.
13. *Mourer-Chauviré C., Pickford M., Senut B.* // Contrib. MACN. 2017. V. 7. P. 99–131.
14. *De Pietri V. L., Mayr G., Costeur L., Scofield P.* // C. R. Palevol. 2022. V. 21. P. 235–244.
15. *Zelenkov N. V., Volkova N. V., Gorobets L. V.* // J. Ornithol. 2016. V. 157. P. 85–92.
16. *Hou L.* // Mem. Inst. Vertebr. Paleontol. Paleanthropol. Acad. Sci. 1993. V. 19. P. 165–297.
17. *Meijer H. J. M., Sutinka T., Saptomo E. W., et al.* // J. Vertebr. Paleontol. 2013. V. 33. P. 877–894.
18. *Olson S. L.* // Ann. S. Afr. Mus. 1994. V. 104. P. 49–61.
19. *Matsuoka H.* // Tropics. 2000. V. 10. P. 165–188.
20. *Pavia M.* // Quatern. Sci. Reviews. 2020. V. 248. P. 106532.

UNEXPECTED FIND OF A BUTTONQUAIL (AVES: CHARADRIIFORMES: TURNICIDAE) IN THE LOWER PLEISTOCENE OF CRIMEA

N. V. Zelenkov

Borissiak Paleontological institute, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: nzelen@paleo.ru

Presented by Academician of the RAS A. V. Lopatin

Buttonquails (family Turnicidae of the order Charadriiformes) are a morphologically specialized group of small, predominantly tropical birds of open landscapes, extremely poorly represented in the fossil record. The article describes a fragmentary humerus of a buttonquail from the Lower Pleistocene of the Taurida Cave in central Crimea. This is the first find of the family Turnicidae in Eurasia in the chronological interval from the Pliocene through the Middle Pleistocene. This find highlights the limited available information on the taxonomic composition of Early Quaternary Eurasian avifaunas, even at the family level, and also sheds light on the Late Cenozoic evolutionary history of Turnicidae.

Keywords: fossil birds, Turnicidae, early Pleistocene, North Black Sea region, Eastern Europe

УДК 577.29

ЭФФЕКТИВНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ЛОКУСА *CXCR4* С ПОМОЩЬЮ РИБОНУКЛЕОПРОТЕИНОВЫХ КОМПЛЕКСОВ Cas9, СТАБИЛИЗИРОВАННЫХ ПОЛИГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

© 2024 г. Д. С. Голубев¹, Д. С. Комков^{1,2}, М. В. Шепелев¹,
Д. В. Мазуров^{1,3}, Н. А. Круглова^{1,*}

Представлено академиком РАН П. Г. Георгиевым

Поступило 31.10.2023 г

После доработки 10.11.2023 г.

Принято к публикации 12.11.2023 г.

Редактирование генов с помощью системы CRISPR/Cas9 открывает новые возможности в лечении заболеваний человека. По этой причине актуальной является разработка подходов для повышения эффективности геномного редактирования. В данной работе для повышения уровня редактирования локуса *CXCR4*, мишени для генотерапии ВИЧ-инфекции, белок Cas9 модифицировали, вводя дополнительные сигналы NLS, а рибонуклеопротеиновые комплексы Cas9 и гидовой РНК стабилизировали с помощью поли-L-глутаминовой кислоты. В совокупности это позволило в 1.8 раза повысить уровень нокаута *CXCR4* в Т-клеточной линии СЕМ/R5 и в 2 раза повысить уровень нокина пептидного ингибитора слияния ВИЧ-1 МТ-С34 в первичных CD4⁺ Т-лимфоцитах.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, RNP, PGA, редактирование генома, *CXCR4*, HIV, NLS

DOI: 10.31857/S2686738924010164, EDN: KMSWSW

Редактирование генома клеток человека с помощью системы CRISPR/Cas9 является перспективной технологией для создания препаратов, предназначенных для лечения вирусных инфекций (HIV, HPV), онкологических, аутоиммунных и метаболических заболеваний человека [1]. Успешное применение системы CRISPR/Cas9 в клинической практике требует высокой эффективности редактирования. Предложено большое количество различных подходов, направленных на повышение уровня редактирования, таких как модификации белка Cas9, гидовой РНК, донорной ДНК, оптимизация средств доставки геномных редакторов в клетки, а также воздействие на пути репарации ДНК [2,3].

Одна из областей применения геномного редактирования – разработка генотерапевтических подходов для лечения ВИЧ-инфекции [4]. В мире насчитывается более 38 млн человек, зараженных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), которые вынуждены пожизненно принимать антиретровирусные препараты. Несмотря на высокую эффективность таких препаратов, их прием сопряжен с побочными эффектами и существует риск развития устойчивости вируса к ним [4]. Поэтому актуальной представляется разработка альтернативных методов лечения с помощью технологии геномного редактирования. Один из таких методов направлен на получение CD4⁺ Т-клеток человека, устойчивых к ВИЧ-инфекции. В частности, этого можно добиться с помощью нокаута генов рецепторов ВИЧ или нокина генетических конструкций, экспрессирующих противовирусные факторы [5]. Поэтому важной задачей является повышение эффективности геномного редактирования для получения как можно более обогащенной популяции отредактированных клеток, что важно для их приживления в организме реципиента.

Целью данной работы было повышение уровня редактирования локуса *CXCR4*, кодирующего хемокинный рецептор *CXCR4*, который является одним из рецепторов ВИЧ. Нокаут *CXCR4* в зрелых

¹ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Место работы в настоящее время: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel

³ Место работы в настоящее время: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA

*E-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru

CD4⁺ Т-клетках представляется возможной стратегией придания Т-клеткам устойчивости к ВИЧ, которая была успешно применена в нескольких работах [6, 7]. Кроме того, ранее нами была разработана платформа нокина в локус *CXCR4* пептидных ингибиторов слияния ВИЧ с клеткой [8]. Таким образом, повышение уровней нокаута и нокина для локуса *CXCR4* представляются актуальными задачами для разработки методов терапии ВИЧ-инфекции с помощью геномного редактирования.

Важно отметить, что для применения в клинической практике наиболее предпочтительной является доставка Cas9 в клетки в виде рибонуклеопротеиновых комплексов (ribonucleoprotein, RNP), так как RNP обладают меньшей токсичностью по сравнению с молекулами ДНК или РНК, позволяют снизить вероятность нецелевого редактирования, а отсутствие плазмидной ДНК устраняет риск ее интеграции в геном клеток-мишеней [9]. Для повышения уровня редактирования локуса *CXCR4* с помощью RNP белок Cas9 модифицировали путем увеличения числа NLS, а комплексы RNP стабилизировали с помощью поли-L-глутаминовой кислоты (poly-L-glutamic acid, PGA) [10, 11]. В нескольких работах показано, что тип и количество сигналов NLS в белке Cas9 влияют на эффективность редактирования [10, 12]. Однако подобных данных, полученных для Т-клеточных линий или первичных Т-клеток, мало [13]. Поэтому решено было оценить эффект от увеличения числа NLS в белке Cas9 при редактировании Т-клеточной линии SEM/R5, полученной на основе линии CCRF-SEM (ATCC) и описанной ранее [8]. Для этого на основе плазмиды SP-Cas9 (Addgene #62731), в которой белок Cas9 имеет один сигнал NLS на С-конце, конструировали плазмиды, кодирующие Cas9 с 2х, 3х или 4хNLS (рис. 1, а). Для создания конструкции с 2хNLS амплифицировали фрагмент плазмиды SP-Cas9, кодирующий N-конец Cas9, с помощью

праймеров 5'-Nco-NLS-Cas9 и 3'-Nde-Cas9 (нуклеотидные последовательности всех праймеров приведены в табл. 1).

Продукт ПЦР клонировали в вектор pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific, США). Далее, фрагмент NcoI-NdeI клонировали из pJET1.2 по этим же сайтам в плазмиду SP-Cas9, получая SP-Cas9-2хNLS. Для получения плазмид с 3х и 4хNLS сначала амплифицировали фрагмент плазмиды SP-Cas9 с праймерами 5'-Cas9_Nhe и 3'-Cas9_Afl, продукт ПЦР клонировали в вектор pCR-Blunt (Invitrogen, США), получая pCR-Cas9-NLS NA. Далее одноцепочечные олигонуклеотиды 5'-Afl-2хNLS и 3'-Afl-2хNLS гибридизовали и клонировали в плазмиду pCR-Cas9-NLS NA по сайтам AflII-BamHI, получая pCR-Cas9-3хNLS-6His, из которой далее клонировали фрагмент NheI-BamHI в плазмиды SP-Cas9 и SP-Cas9-2хNLS, получая соответственно SP-Cas9-3хNLS и SP-Cas9-4хNLS.

Было обнаружено, что белки с 2х и 4хNLS, несущие один из сигналов NLS на N-конце, неэффективно экспрессировались в клетках *E. coli* BL21(DE3) (рис. 1, б). Возможно, необходимо модифицировать N-конец Cas9, например, добавив к нему фрагмент мальтоза-связывающего белка (maltose-binding protein, MBP) для облегчения экспрессии в бактериях, как было сделано в работе Staahl et al. [14]. Поэтому далее были очищены белки Cas9 с 1х и 3хNLS на С-конце как описано в работе Maslennikova et al. [8]. Мишень для Cas9 в локусе *CXCR4* (CACTTCAGATAACTACACCGAGG) была описана ранее [8]. Гидовую РНК получали с помощью транскрипции *in vitro*, как подробно описано в работе Maslennikova et al. [8].

Для формирования RNP комплексов смешивали 200 пмоль белка Cas9 и 200 пмоль гидовой РНК в буфере R (Invitrogen, США) и инкубировали смесь 20 мин при комнатной температуре. Готовые

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Нуклеотидная последовательность, 5' -> 3'
5'-Nco-NLS-Cas9	GCCCATGGCGAAACGTCCGGCGGCCACGAAGAAAGCCGGTCAGGCGAAGAAAA GAAAGCAGCGGATAAAAAATACAGCATTGGTC
3'-Nde-Cas9	GATCATATGAGCCAGTGCC
5'-Cas9_Nhe	GGCTAGCCATTATGAAAACTG
3'-Cas9_Afl	CCTTAAGCGAGCCACCGCCCACTTTG
5'-Afl-2хNLS	TTAAGCCGGCAGCTAAGAAAAAGAAAGGCAGCCCTAAGAAAAAGCGTAAAGTGGGC GGTGGCTCGCATCATCATCATCACTAAG
3'-Afl-2хNLS	GATCCTTAGTGATGATGATGATGATGATGCGAGCCACCGCCCACTTTACGCTTTTCTTA GGGCTGCCTTTCTTTTCTTAGCTGCCGGC

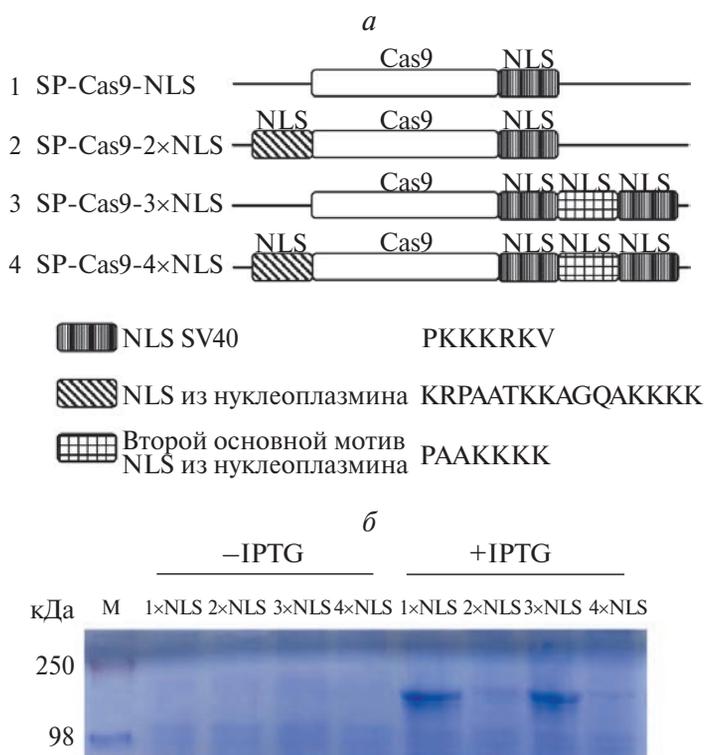


Рис. 1. (а) Схемы плазмидных конструкций для экспрессии Cas9 с различным числом NLS в клетках *E.coli*. Показаны аминокислотные последовательности NLS вируса SV40, NLS из белка нуклеоплазмينا и последовательность второго основного мотива из NLS нуклеоплазмينا (PAAKKKK) [20]. (б) Электрофореграмма лизатов клеток *E.coli* BL21 (DE3), трансформированных одной из четырех конструкций для продукции Cas9, до и после индукции экспрессии с помощью IPTG. Белки разделяли в 7.5% акриламидном геле и окрашивали красителем Кумасси R-250. М – маркеры молекулярного веса белков.

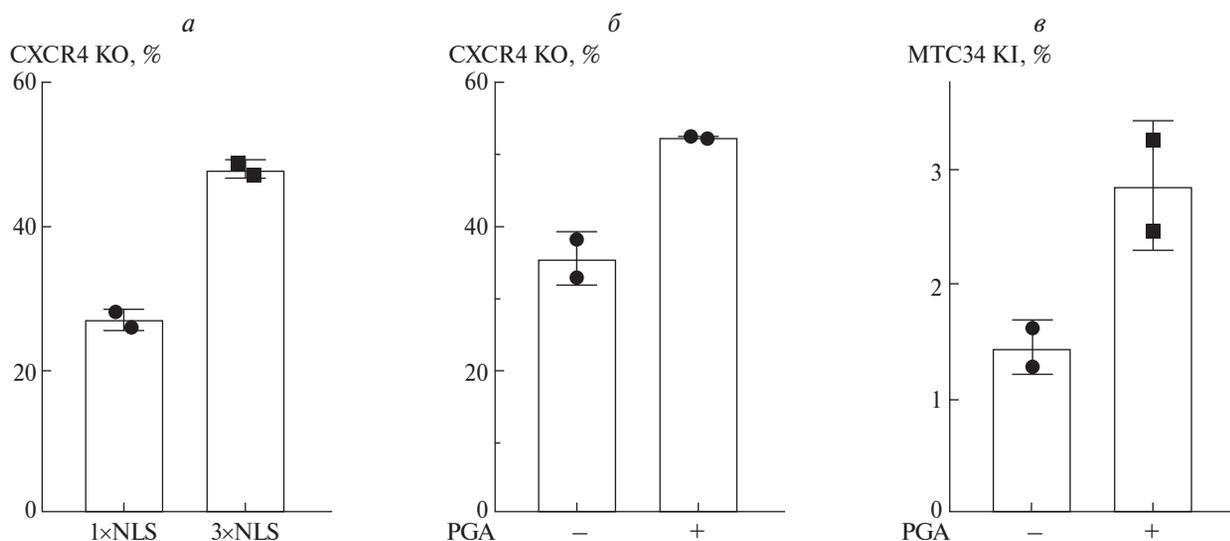


Рис. 2. (а) Уровень нокаута CXCR4 в клетках СЕМ/R5, электропорированных RNP с Cas9–1xNLS или Cas9–3xNLS. (б) Уровень нокаута CXCR4 в клетках СЕМ/R5, электропорированных комплексами RNP с добавлением PGA (+) или без добавления PGA (–). Экспрессию белка CXCR4 анализировали с помощью проточной цитометрии проводили на 3 день после электропорации. (в) Уровень нокина пептида МТ-С34 в локусе *CXCR4* в CD4⁺ Т-лимфоцитах, электропорированных RNP с Cas9–3xNLS вместе с донорной плазмидой pJet-X4ex2 в присутствии PGA (+) или без PGA (–).

RNP электропорировали в 1.5×10^6 клеток СЕМ/R5 с помощью прибора Neon (Invitrogen, США) при параметрах 1230 В, 40 мс, 1 импульс. На 3 день оценивали уровень белка CXCR4 на поверхности клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью мышиных моноклональных антител против CXCR4 (клон 12G5, Santa Cruz Biotechnology, США) и козьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa488 (Thermo Scientific, США). Добавление двух дополнительных сигналов NLS к белку Cas9 увеличивало процент негативных по CXCR4 клеток в 1.8 раза (рис. 2, а).

В отсутствие gRNA белок Cas9 нестабилен и даже в комплексе с gRNA в составе RNP может формировать нефункциональные агрегаты [11]. Согласно работе Nguyen et al., предотвратить агрегацию и повысить стабильность RNP можно с помощью анионного полимера PGA [11]. Поэтому была оценена эффективность нокаута CXCR4 с помощью Cas9-3xNLS в присутствии PGA. Для этого использовали PGA с молекулярной массой 15–50 кДа, разведенную до концентрации 100 мг/мл в деионизованной воде. Для формирования RNP комплексов PGA использовали как описано в статье Nguyen et al [11]: на один образец смешивали 4 мкл PGA (100 мг/мл в воде) и 200 пмоль gRNA, затем данную смесь добавляли к 200 пмоль Cas9 в буфере R. Было обнаружено, что добавление PGA к RNP комплексам увеличивало уровень нокаута CXCR4 в 1.4 раза (рис. 2, б).

Данные, полученные на Т-клеточной линии СЕМ/R5, показали, что введение дополнительных сигналов NLS в белок Cas9 и добавление PGA к RNP комплексам приводят к повышению уровня нокаута CXCR4. После этого решено было перейти к клинически релевантной модели и провести эксперимент на первичных CD4⁺ Т-клетках. В этом случае проводили нокаут CXCR4 с одновременным нокином пептидного ингибитора слияния ВИЧ-1 МТ-С34 во второй экзон гена CXCR4. В результате корректного нокина клетки экспрессировали короткий GPI-заякоренный пептид МТ-С34 на мембране, который можно было детектировать с помощью полученных ранее антител [8]. Периферические мононуклеарные клетки выделяли из крови здоровых доноров, CD4⁺ Т-клетки выделяли с помощью магнитной сепарации (#130–096–533, Miltenyi Biotec, Германия) и активировали с помощью частиц с иммобилизованными антителами против CD2, CD3 и CD28 (#130–091–441, Miltenyi Biotec, Германия) в течение 2 суток. Для электропорации готовили RNP комплексы в присутствии PGA или без нее, которые смешивали с 5.4 мг донорной плазмиды pJet-X4ex2, описанной ранее [8], добавляли к 1.5×10^6 клеток и проводили электропорацию при параметрах 1600 В, 10 мс, 3 импульса. На 3 сутки после электропорации анализировали уро-

вень пептида МТ-С34 на поверхности клеток методом проточной цитофлуориметрии с помощью мышиных моноклональных антител С24 [8] и козьих антител против иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с Alexa488 (Thermo Scientific, США). Поскольку экспрессия CXCR4 на первичных CD4⁺ Т-лимфоцитах зависит от состояния активации клеток и постепенно снижается после стимуляции [15], значительная часть клеток в контрольном образце без добавления RNP оказывалась негативной по CXCR4 (данные не показаны). По этой причине было решено оценивать только уровень нокина, который в нашем случае является наиболее важным показателем. Именно клетки с нокином представляют собой целевую популяцию, которая потенциально может быть использована для переноса реципиенту. Было обнаружено, что уровень нокина при использовании RNP с тремя сигналами NLS составлял около 1.5%, а при добавлении PGA к RNP комплексам достигал 3% (рис. 2, в).

Известно, что большее число NLS в белке Cas9 увеличивает эффективность доставки Cas9 в ядро и тем самым повышает уровень редактирования [10, 12]. Мы показали влияние такой модификации Cas9 на уровень редактирования в Т-клеточной линии СЕМ/R5. Наши данные согласуются с результатами недавно опубликованной работы, в которой было показано, что при введении второго NLS SV40 в белок Cas9 происходило увеличение уровня редактирования локуса CCR5 в Т-клеточной линии Jurkat в 1.5–2 раза [13].

Дополнительная стабилизация RNP комплексов с помощью PGA, как впервые было показано в работе Nguyen et al. [11], приводила к повышению уровня нокаута CXCR4 в 1.4 раза. PGA была использована в нескольких работах, посвященных редактированию Т клеток [11, 16–19]. В одних работах при добавлении PGA к RNP комплексам авторы наблюдали повышение уровня нокина и повышение выживаемости клеток [11, 18], в других отмечалось или только небольшое повышение нокина [17], или положительное влияние на выживаемость [16]. Наконец, в одной работе не было обнаружено никакого эффекта от PGA [19]. В нашей модели в присутствии PGA удалось повысить уровень нокаута CXCR4 и уровень нокина пептидного ингибитора слияния ВИЧ-1 МТ-С34. Кроме того, мы заметили, что при использовании более жестких режимов электропорации (1700 В, 20 мс, 1 импульс), при которых удается добиться еще более высоких показателей нокаута, в присутствии PGA клетки выживают лучше и делятся быстрее, чем без добавления PGA (данные не показаны).

Таким образом, нами было показано, что введение дополнительных сигналов NLS и добавление PGA к RNP комплексам приводило к повышению

уровня нокаута CXCR4 в Т-клеточной линии СЕМ/ R5, а также к повышению уровня нокина пептида МТ-С34 в этот локус в первичных CD4⁺ Т-клетках. Полученные данные могут быть использованы при разработке методов редактирования Т-клеточных линий и первичных Т-клеток человека с целью создания генотерапевтических средств для лечения ВИЧ-инфекции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.Н. Бончука и О.В. Аркову за очистку рекомбинантного белка Cas9. Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института биологии гена РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-25-00310).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с образцами крови доноров одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии гена РАН (Москва, Россия), заключение № 5 от 15.04.2022. У доноров получено письменное информированное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pavlovic K., Tristán-Manzano M., Maldonado-Pérez N., et al. Using Gene Editing Approaches to Fine-Tune the Immune System // *Front. Immunol. Frontiers Media SA*, 2020. V. 11.
2. Shams F., Bayat H., Mohammadian O., et al. Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: An inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems // *BioImpacts*. 2022. V. 12. № 4. P. 371–391.
3. Smirnikhina S.A., Zaynitdinova M.I., Sergeeva V.A., et al. Improving Homology-Directed Repair in Genome Editing Experiments by Influencing the Cell Cycle // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 11. P. 5992.
4. Cornu T.I., Mussolino C., Müller M.C., et al. HIV Gene Therapy: An Update // *Hum. Gene Ther. Hum Gene Ther*. 2021. V. 32. № 1–2. P. 52–65.
5. Maslennikova A., Mazurov D. Application of CRISPR/Cas Genomic Editing Tools for HIV Therapy: Toward Precise Modifications and Multilevel Protection // *Front. Cell. Infect. Microbiol. Frontiers Media S.A*. 2022. V. 12. P. 880030.
6. Hou P., Chen S., Wang S., et al. Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection // *Sci. Rep*. 2015. V. 5. P. 15577.
7. Wang Q., Chen S., Xiao Q., et al. Genome modification of CXCR4 by *Staphylococcus aureus* Cas9 renders cells resistance to HIV-1 infection. // *Retrovirology*. 2017. V. 14. № 1. P. 51.
8. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., et al. Engineering T-Cell Resistance to HIV-1 Infection via Knock-In of Peptides from the Heptad Repeat 2 Domain of gp41 // *MBio. American Society for Microbiology*. 2022. V. 13. № 1.
9. Kim S., Kim D., Cho S.W., et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins // *Genome Res*. 2014. V. 24. № 6. P. 1012–1019.
10. Maggio I., Zittersteijn H.A., Wang Q., et al. Integrating gene delivery and gene-editing technologies by adenoviral vector transfer of optimized CRISPR-Cas9 components // *Gene Ther*. 2020. V. 27. № 5. P. 209–225.
11. Nguyen D.N., Roth T.L., Li P.J., et al. Polymer-stabilized Cas9 nanoparticles and modified repair templates increase genome editing efficiency // *Nat. Biotechnol*. 2020. V. 38. № 1. P. 44–49.
12. Cong L., Ran F.A., Cox D., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. № 6121. P. 819–823.
13. Shui S., Wang S., Liu J. Systematic Investigation of the Effects of Multiple SV40 Nuclear Localization Signal Fusion on the Genome Editing Activity of Purified SpCas9 // *Bioengineering*. 2022. V. 9. № 2. P. 83.
14. Staahl B.T., Benekareddy M., Coulon-Bainier C., et al. Efficient genome editing in the mouse brain by local delivery of engineered Cas9 ribonucleoprotein complexes // *Nat. Biotechnol*. 2017. V. 35. № 5. P. 431–434.
15. Buckley C.D., Amft N., Bradfield P.F., et al. Persistent Induction of the Chemokine Receptor CXCR4 by TGF- β 1 on Synovial T Cells Contributes to Their Accumulation Within the Rheumatoid Synovium // *J. Immunol*. 2000. V. 165. № 6. P. 3423–3429.
16. Shy B.R., Vykunta V.S., Ha A., et al. High-yield genome engineering in primary cells using a hybrid ssDNA repair template and small-molecule cocktails // *Nat. Biotechnol*. 2023. V. 41. № 4. P. 521–531.
17. Kath J., Du W., Pruene A., et al. Pharmacological interventions enhance virus-free generation of TRAC-replaced CAR T cells // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev*. 2022. V. 25. P. 311–330.
18. Mohr M., Damas N., Gudmand-Høyer J., et al. The CRISPR-Cas12a Platform for Accurate Genome Editing, Gene Disruption, and Efficient Transgene Integration in Human Immune Cells // *ACS Synth. Biol*. 2023. V. 12. № 2. P. 375–389.
19. Oh S.A., Senger K., Madireddi S., et al. High-efficiency nonviral CRISPR/Cas9-mediated gene editing of human T cells using plasmid donor DNA // *J. Exp. Med*. 2022. V. 219. № 5.
20. Makkerh J.P.S., Dingwall C., Laskey R.A. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids // *Curr. Biol*. 1996. V. 6. № 8. P. 1025–1027.

EFFICIENT EDITING OF THE *CXCR4* LOCUS USING Cas9 RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES STABILIZED WITH POLYGLUTAMIC ACID

D. S. Golubev^a, D. S. Komkov^{a,b}, M. V. Shepelev^a, D. V. Mazurov^{a,c}, N. A. Kruglova^{a,#}

^a*Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Current address: Department of Physiology and Cell Biology, Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Be'erSheva, Israel*

^c*Current address: Division of Infectious Diseases and International Medicine, Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, USA*

[#]*E-mail: natalya.a.kruglova@yandex.ru*

Presented by Academician of The RAS P. G. Georgiev

Gene editing using the CRISPR/Cas9 system provides new opportunities for the treatment of human diseases. Therefore, it is relevant to develop approaches aimed at increasing the efficiency of genome editing. Here, to increase the level of editing of the *CXCR4* locus, a target for gene therapy of HIV infection, the Cas9 protein was modified by introducing additional NLS signals, and the ribonucleoprotein complexes of Cas9 and guide RNA were stabilized with poly-L-glutamic acid. This allowed a 1.8-fold increase in the level of *CXCR4* knockout in the CEM/R5 T cell line and a 2-fold increase in the level of knock-in of the HIV-1 fusion peptide inhibitor MT-C34 in primary CD4⁺ T lymphocytes.

Keywords: CRISPR/Cas9, RNP, PGA, genome editing, *CXCR4*, HIV, NLS

УДК 599.742.2: [591.471+591.13]: [550.424:546.027](571.1)

СОДЕРЖАНИЕ ИЗОТОПОВ ^{13}C И ^{15}N В КОЛЛАГЕНЕ КОСТЕЙ МАЛОГО ПЕЩЕРНОГО МЕДВЕДЯ (MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE, *Ursus (Spelaearctos) rossicus* Borissiak, 1930) ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

© 2024 г. П. А. Косинцев

Рекомендовано академиком РАН А. В. Лопатиным

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принято к публикации 17.11.2023 г.

Проведен анализ данных о содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей малого пещерного медведя (*Ursus (S.) rossicus* Borissiak, 1930) из трех районов Западной Сибири. Кости датируются морской изотопной стадией (МИС) 3. Изучены кости половозрелых особей самцов и самок. Различия между некоторыми выборками проявляются только в значениях $\delta^{15}\text{N}$. Медведи из всех выборок относятся к одному трофическому уровню. Установлены трофические сдвиги между самками и самцами в одном районе и между самцами двух районов. Малый пещерный медведь Западной Сибири отличался от малого пещерного медведя Южного Урала значительно более хищным образом жизни. Уровень различий между медведями Урала и Сибири соответствует разным трофическим уровням.

Ключевые слова: *Ursus rossicus*, малый пещерный медведь, поздний плейстоцен, Западная Сибирь, стабильные изотопы, ^{13}C , ^{15}N , коллаген

DOI: 10.31857/S2686738924010179, EDN: ККМЫКС

Анализ содержания изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене субфоссильных костей является одним из основных методов изучения питания позвоночных животных в прошлом [1]. Этот метод позволяет оценить положение вида в трофической цепи, охарактеризовать изменения его питания во времени и пространстве. Большое количество данных о содержании изотопов ^{13}C и ^{15}N получено для ряда вымерших видов, в том числе для пещерных медведей (*Ursus (Spelaearctos)* spp.). Среди них наименее изученным является малый пещерный медведь (*U. (S.) rossicus* Borissiak, 1930), для которого имеются данные для одной выборки с территории Южного Урала [2, 3]. С территории Азии известны определения значений изотопов ^{13}C и ^{15}N для двух особей из Западной Сибири [4, 5].

Анализ морфологических данных показал, что в Азии, в позднем плейстоцене, обитал только малый пещерный медведь (*U. (S.) rossicus* Borissiak, 1930) [6–8], который по морфологии и размерам

зубов и костей скелета хорошо отличается от бурого медведя (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) [6, 9]. Ареал малого пещерного медведя в Азии занимал южную часть Западной и Средней Сибири до Прибайкалья [6, 10]. В Западной Сибири находки его остатков известны до широты $58^{\circ}30'$ с.ш. Фауны Западной Сибири, в состав которых входил малый пещерный медведь, датируются временем от последнего межледниковья (130000–100000 л.н., морская изотопная стадия 5 (МИС 5)) до конца МИС 3 (57000–29000 л.н.) [11]. По костям малого пещерного медведя из местонахождений Западной Сибири получено 6 радиоуглеродных дат: >46520 BP, ?; >45000 BP, GrA-39269; 52070 ± 571 BP, GV-02625; 48100 ± 498 BP, GV-02624; $45000 \pm 2100/1100$ BP, GrA-41645; 41340 ± 528 BP, GV-02626 [12]. Все местонахождения, из которых взяты кости для анализа, на основании видового состава фаун и радиоуглеродных дат датированы МИС 3 [11]. Все местонахождения Западной Сибири, в которых найдены остатки малого пещерного медведя, относятся к аллювиальному тафономическому типу.

Задачей работы была характеристика значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей самок и самцов малого пещерного медведя из разных районов Западной Сибири.

Институт экологии растений и животных УрО РАН,
Екатеринбург, Россия
E-mail: kpa@ipae.uran.ru

Изучено содержание изотопов ^{13}C и ^{15}N в коллагене костей малого пещерного медведя из местонахождений: Антипино ($57^{\circ}49'$ с.ш., $66^{\circ}33'$ в.д.), Нижняя Тавда ($57^{\circ}41'$ с.ш., $66^{\circ}12'$ в.д.), Мальково ($57^{\circ}08'$ с.ш., $65^{\circ}52'$ в.д.), Спирино ($56^{\circ}10'$ с.ш., $70^{\circ}35'$ в.д.), Меримы ($58^{\circ}01'$ с.ш., $68^{\circ}00'$ в.д.), Епанчино ($58^{\circ}05'$ с.ш., $68^{\circ}43'$ в.д.), Иртыш ($58^{\circ}03'$ с.ш., $69^{\circ}30'$ в.д.). Местонахождения образуют три географические группы: «западную» (Антипино, Нижняя Тавда, Мальково), «восточную» (Спирино) и «северную» (Меримы, Епанчино, Иртыш) (табл. 1).

Для анализа взяты 3 нижних челюсти, 2 первых шейных позвонка, 11 плечевых, 2 лучевых, 4 локтевых, 3 бедренных и 2 больших берцовых костей. Определение пола и возраста особей, которым принадлежали кости, проведено на основании анализа их размеров и состояния эпифизов (приросли – не приросли) [6, 13–16]. В выборках есть кости самцов и самок. Одна особь имеет возраст 3+ (полузрелая, subadultus), остальные особи имеют возраст 4 года и старше (взрослые, adultus). Все особи являются половозрелыми.

Определение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей проведено методом изотопной масс-спектрометрии с использованием изотопного масс-спектрометра DELTA V Advantage (Thermo Fisher Scientific, Германия), оснащенного элементарным

анализатором Flash 2000 (приборы предоставлены центром коллективного пользования ТомЦКП СО РАН) по стандартной методике. В качестве международного стандарта углерода принят эталон VPDB. В качестве международного стандарта азота принят газообразный N_2 атмосферного воздуха. Лабораторные рабочие газы сравнения CO_2 и N_2 калибровали по международному стандартному образцу МАГАТЭ – IAEA-600 Caffeine. Абсолютная погрешность трех последовательных измерений анализируемых образцов составляет для $\delta^{13}\text{C} \leq \pm 0.2\text{‰}$ и для $\delta^{15}\text{N} \leq \pm 0.4\text{‰}$.

Средние значения $\delta^{13}\text{C}$ у самцов и самок в «западной» и «восточной» выборках различаются не более чем на 0.5‰ , различия средних значений $\delta^{15}\text{N}$ в «западной» выборке составляют 0.5‰ , а в «восточной» – 2.0‰ (табл. 1). Географические различия средних значений $\delta^{13}\text{C}$ между группами самок из «западной» и «восточной» выборок не проявляются, а различия значений $\delta^{15}\text{N}$ составляют 0.5‰ (табл. 1). В трех выборках самцов отличия средних значений $\delta^{13}\text{C}$ составляют не более 0.9‰ , а средних значений $\delta^{15}\text{N}$ не более 1.7‰ (табл. 1). Географические различия средних значений $\delta^{13}\text{C}$ между объединенными выборками самцов и самок западного и восточного районов составляют 0.1‰ , а различия средних значений $\delta^{15}\text{N}$ составляют 0.4‰ . Ранее

Таблица 1. Значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей малого пещерного медведя (*U. (S.) rossicus*) Западной Сибири и Южного Урала

Выборки	Пол ¹	n	$\delta^{13}\text{C}$, ‰			$\delta^{15}\text{N}$, ‰		
			Min	Max	M	Min	Max	M
«Западная»	♂	10	–23.7	–22.2	–23.0	6.0	13.1	8.6
	♀	5	–23.7	–20.2	–22.5	5.1	13.9	8.9
	♂, ♀	15 ²	–23.7	–20.2	–22.7	5.1	13.9	8.7
«Восточная»	♂	4	–23.0	–22.1	–22.7	4.9	9.4	7.4
	♀	3	–22.6	–22.3	–22.5	6.9	11.9	9.4
	♂, ♀	7 ²	–23.0	–22.1	–22.6	4.9	11.9	8.3
«Северная»	♂	5	–22.9	–19.9	–22.1	5.8	12.8	9.1
Томское Приобье	?	1 ³		–19.4			10.7	
Алтай	?	1 ⁴		–21.4			2.6	
Южный Урал	?	16 ⁵	–25.6	–19.3	–22.3±1.93	3.2	8.1	5.4±1.34
	?	5 ⁶	–20.8	–22.8	–21.3±0.46	3.1	8.8	4.9±2.32
	?	21 ²	–25.6	–19.3	–22.1±1.74	3.1	8.8	5.2±1.57

¹ ♂ – самцы, ♀ – самки, ? – пол не определен.

² Объединенная выборка.

³ Kuzmin, Bondarev, Kosintsev et al., 2021.

⁴ Kosintsev, Bocherens, Kirillova et al., 2021

⁵ Силаев, Паршукова, Гимранов и др., 2020.

⁶ Gimranov Bocherens, Kavcik-Graumann et al., 2022.

получены значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей малого пещерного медведя из степного Алтая [4] и Томского Приобья [5]. Первая особь отличается очень низким значением $\delta^{15}\text{N}$, не встреченным в остальных выборках (табл. 1).

В целом значения $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ для всех выборок близки, за исключением выборки самцов из «восточного» района, для которой получены относительно небольшие значения $\delta^{15}\text{N}$ (табл. 1). Отнесение выборок к разным трофическим уровням предложено проводить при различии значений $\delta^{13}\text{C}$ от 0 до 2‰ и различии значений $\delta^{15}\text{N}$ более 3‰ [17]. Выявленные половые и географические различия значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ не достигают этих показателей, то есть все изученные выборки относятся к одному трофическому уровню.

Анализ распределения значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ показывает, что в «восточной» выборке их значения у самок и самцов не перекрываются (рис. 1). Распределение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ у самцов из «северной» и «западной» выборок перекрываются незначительно. Значительно перекрываются распределения значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ у самцов и самок из «западной» и «восточной» выборок и самцов из «северной» выборки (рис. 1). Это свидетельствует о заметных трофических сдвигах между самцами и самками в «восточной» выборке и между самцами из «северной» и «западной» выборок.

Распределение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене костей малого пещерного медведя Западной Сибири и Южного Урала заметно различаются (рис. 1). Во всех выборках Западной Сибири средние значения $\delta^{13}\text{C}$ попадают в пределы изменения значений $\delta^{13}\text{C}$ в выборке с Урала и отличаются от ее среднего значения не более, чем на 0.6‰ (табл. 1). Значения $\delta^{15}\text{N}$ во всех выборках Западной Сибири превышают его максимальное значение в выборке с Южного Урала. Эти различия проявляются между выборками и самцов и самок. Различия средних значений между разными выборками самцов и медведями Урала составляют 2.2‰, 3.7‰, 3.9‰, между выборками самок и медведями Урала составляют 3.7‰ и 4.2‰ (табл. 1). Различия средних значений для объединенных выборок самцов и самок Западной Сибири и выборки с Южного Урала составляют более 3.1‰ (табл. 1). Эти различия соответствуют разным трофическим уровням [17].

Различия между половыми и географическими группами медведей Западной Сибири и Урала обусловлены различием значений $\delta^{15}\text{N}$ (табл. 1, рис. 1). Величина $\delta^{15}\text{N}$ в коллагене определяется главным образом количеством белка, потребляемого животным [18, 19], в данном случае, количеством потребляемого мяса. Таким образом, отмеченные выше различия значений $\delta^{15}\text{N}$ отражают разную степень

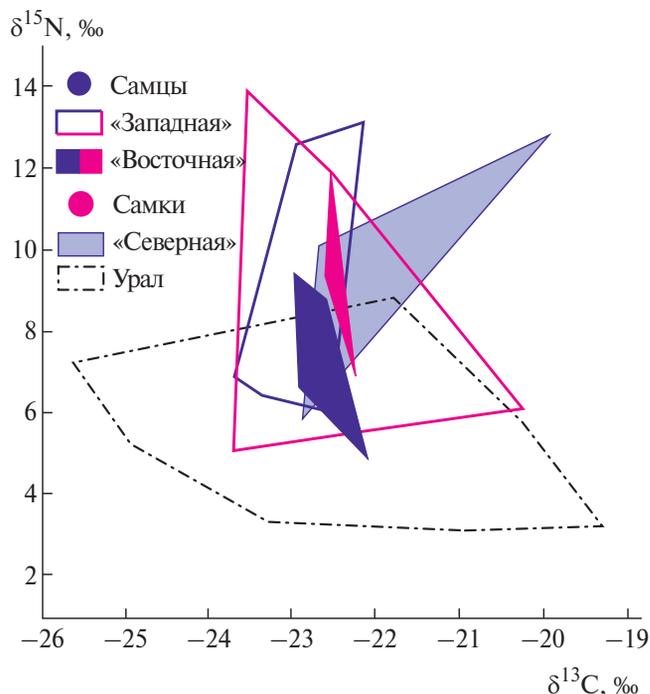


Рис. 1. Распределение значений $\delta^{13}\text{C}$ и $\delta^{15}\text{N}$ (‰) в коллагене костей малого пещерного медведя (*U. (S.) rossicus*) Западной Сибири и Южного Урала.

хищничества в разных половых и географических группах малого пещерного медведя. В Западной Сибири самки в «восточной» выборке вели более хищный образ жизни, чем самцы, а самцы «восточной» выборке вели наименее хищный образ жизни по сравнению с самцами и самками остальных выборок. Медведи Южного Урала вели значительно менее хищный образ жизни по сравнению с медведями Западной Сибири.

Взрослые самцы и самки малого пещерного медведя из разных географических районов Западной Сибири, не смотря на существование между некоторыми из них трофического сдвига, относятся к одному трофическому уровню. Малый пещерный медведь Западной Сибири отличался от медведя Южного Урала значительно более хищным образом жизни. Уровень различий между медведями Урала и Сибири соответствует разным трофическим уровням.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность к.т.н. Симоновой Г.В. за консультацию и музею Института экологии растений и животных УрО РАН за предоставленные для исследования образцы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-24-01025, <https://rscf.ru/project/22-24-01025/>.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *DeNiro M.J.* Postmortem preservation and alteration of *in vivo* bone collagen isotope ratios in relation to palaeodietary reconstruction // *Nature*. 1985. V. 317. № 31. P. 806–809.
2. *Силаев В.И., Паршукова М.Н., Гимранов Д.О. и др.* Минералого-геохимические особенности пещерной фоссиллизации ископаемых костей на примере пещеры Иманай (Южный Урал) // *Вестник пермского университета. Геология*. 2020. Т. 19. № 4. С. 323–358.
3. *Gimranov D., Bocherens H., Kavcik-Graumann N., et al.* The cave bears from Imanay Cave (Southern Urals, Russia) // *Historical Biology*. 2022. V. 35. № 5. P. 1–9.
4. *Kosintsev P.A., Bocherens H., Kirillova I.V., et al.* Palaeoecological and genetic analyses of Late Pleistocene bears in Asiatic Russia // *Boreas*. 2021. V. 51. № 2. P. 465–480.
5. *Kuzmin Y.V., Bondarev A.A., Kosintsev P.A. et al.* The Paleolithic diet of Siberia and Eastern Europe: evidence based on stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in hominin and animal bone collagen // *Archaeological and Anthropological Sciences*. 2021. V. 13. № 10. Art. 179. P. 1–12.
6. *Барышников Г.Ф.* Семейство медвежьих (Carnivora, Ursidae). СПб.: Наука, 2007.
7. *Боесков Г.Г., Григорьев С.Е., Барышников Г.Ф.* Новое доказательство существования пещерных медведей в плейстоцене Сибирской Арктики // *Доклады Академии Наук*. 2012, Т. 445. № 2. С. 226–230.
8. *Маликов Д.Г.* Новые материалы по малому пещерному медведю *Ursus rossicus borissiak*, 1930 среднего неоплейстоцена Куртаковского археологического района // *Амурский зоологический журнал*. 2018. № X (1). С. 80–87.
9. *Baryshnikov G., Foronova I.* Pleistocene small cave bear (*Ursus rossicus*) from the South Siberia, Russia // *Cadernos Lab. Xeoloxico de Laxe Coruna*. 2001. V. 26. P. 373–398.
10. *Оводов Н.Д.* Медведи Алтае-Саянской горной области // *Териофауна России и сопредельных территорий (VII съезд Териологического общества)*. М., 2003. С. 238–239.
11. *Косинцев П.А., Васильев С.К.* Фауна крупных млекопитающих позднего неоплейстоцена Западной Сибири // *Бюллетень Комиссии по изучению четвертичного периода*. М.: ГЕОС, 2009. № 69. С. 94–105.
12. *Васильев С.К., Пархомчук Е.В., Середнёв и др.* Позднеплейстоценовая мегафауна юга Западной и Средней Сибири: новые данные по радиоуглеродному датированию и новые находки из аллювиальных местонахождений в 2020 году // *Проблемы археологии, этнографии, антропологии Сибири и сопредельных территорий*. Новосибирск: Изд-во ИАЭТ СО РАН, 2020. Т. XXVI. С. 43–50.
13. *Воробьев А.А.* Размеры длинных трубчатых костей большого пещерного медведя Среднего Урала // *Современные проблемы популяционной, исторической и прикладной экологии: Материалы конференции молодых ученых; 23–27 апреля 2001 г.* Екатеринбург, 2001. С. 38–41.
14. *Воробьев А.А.* Этапы постнатального онтогенеза скелета большого пещерного медведя // *Биота горных территорий: История и современное состояние: Материалы конференции молодых ученых; 15–19 апреля 2002 г.* Екатеринбург: Академкнига, 2002. С. 22–28.
15. *Косинцев П.А., Воробьев А.А.* Биология большого пещерного медведя (*Ursus spelaeus* Ros. et Hein.) на Урале // *Мамонт и его окружение: 200 лет изучения / под ред. Ю.А. Розанова*. М.: Геос, 2001. С. 266–278.
16. *Fosse P., Cregut-Bonnoure E.* Ontogeny/growth of (sub) modern brown bear (*Ursus arctos*) skeleton: A guideline to appraise seasonality for cave bear (*Ursus spelaeus*) sites? // *Quaternary International*. 2014. V. 339–340. P. 275–288.
17. *Bocherens H.* Isotopic insights on cave bear palaeodiet // *Historical Biology*. 2019. V. 31, № 4. P. 410–421.
18. *Chisholm B.S.* Variation in Diet Reconstructions Based on Stable Carbon Isotopic Evidence // *The Chemistry of Prehistoric Human Bone*. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1989. P. 10–37.
19. *Bocherens H., Billiou D., Patou-Mathis M., et al.* Paleobiological implications of the isotopic signatures (^{13}C , ^{15}N) of fossil mammal collagen in Scladina Cave [Sclayn, Belgium] // *Quaternary Research*. 1997. V. 48. № 3. P. 370–380.

**CONTENT OF ^{13}C and ^{15}N ISOTOPES IN COLLAGEN OF BONES
OF THE SMALL CAVE BEAR (MAMMALIA, CARNIVORA, URSIDAE,
Ursus (Spelaearctos) rossicus Borissiak, 1930) OF WESTERN SIBERIA**

P. A. Kosintsev

Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

E-mail: kpa@ipae.uran.ru

Presented by Academician of the RAS A. V. Lopatin

An analysis of data on the content of ^{13}C and ^{15}N isotopes in the collagen of the bones of the small cave bear (*Ursus (S.) rossicus* Borissiak, 1930) from three regions of Western Siberia was carried out. The bones are dated to Marine Isotope Stage (MIS) 3. The bones of mature males and females were studied. Differences between some samples appear only in the $\delta^{15}\text{N}$ values. Bears from all samples belong to the same trophic level. Trophic shifts have been established between females and males in one area and between males in two areas. The small cave bear of Western Siberia differed from the small cave bear of the Southern Urals in a much more predatory way of life. The level of differences between the bears of the Urals and Siberia corresponds to different trophic levels.

Keywords: Ursus rossicus, small cave bear, Late Pleistocene, Western Siberia, stable isotope, ^{13}C , ^{15}N , collagen

УДК 577.218

НЕЙРОНАЛЬНАЯ И МЫШЕЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ СОПРОВОЖДАЮТСЯ СМЕНОЙ ЭКСПРЕССИРУЮЩИХСЯ ИЗОФОРМ PHF10

© 2024 г. Д. О. Байрамова^{1,2}, А. М. Азиева³, А. В. Феоктистов^{1,2},
академик РАН С. Г. Георгиева¹, Н. В. Сошникова^{1,2, *}

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 05.11.2023 г.

Принято к публикации 07.11.2023 г.

Комплекс ремоделирования хроматина PBAF играет важнейшую роль в регуляции экспрессии генов в процессе дифференцировки тканей и при развитии организма. Специфичность взаимодействия комплекса с хроматином определяется наличием в ряде его субъединиц доменов, узнающих определенные модификации N-концевых последовательностей гистонов. PHF10, субъединица комплекса PBAF, содержит DPF-домен, являющийся уникальным доменом взаимодействия с хроматином. В клетках позвоночных также присутствует изоформа PHF10, не имеющая домена DPF. В данной работе показано, что при нейрональной и мышечной дифференцировке клеток человека и мыши меняется экспрессия изоформ PHF10: формы, не имеющие DPF, замещают формы, в которых он присутствует. Замена изоформ PHF10 в комплексе PBAF может влиять на его избирательность в регуляции генов дифференцирующихся клеток.

Ключевые слова: нейрональная дифференцировка, ремоделирование хроматина, SWI/SNF, PBAF, PHF10, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738924010189, **EDN:** KHXBYO

Ремоделирование хроматина осуществляется специальными комплексами, которые изменяют положение нуклеосом относительно ДНК за счет энергии гидролиза АТФ. Среди них семейство комплексов типа SWI/SNF принимает участие в регуляции экспрессии генов [1]. Нокаут субъединиц комплекса является летальным для организма или приводит к дефектам развития определенных органов [2]. Семейство SWI/SNF включает в себя три типа комплексов, которые отличаются субъединичным составом: BAF, PBAF, GBAF [3]. Комплексы содержат порядка 10–12 субъединиц, из которых часть является общими, а другие специфичными для каждого из комплексов. Ряд субъединиц комплекса имеют домены, узнающие различные мо-

дификации N-концевых последовательностей гистонов, что определяет взаимодействие комплекса с конкретным районом хроматина [4].

Комплекс PBAF отличается от остальных комплексов семейства наличием модуля связывания хроматина, состоящего из четырех белков: BAF200, BAF180, BRD7 и PHF10. Каждый из этих белков содержит домены, распознающие модификации N-концов гистонов, что позволяет комплексу специфично локализоваться на хроматине.

Субъединица PHF10 играет важную роль в функционировании комплекса, так как нокаут гена *PHF10* у мышей является эмбриональной леталью [5]. PHF10 имеет внутреннюю структурированную часть, состоящую из WHD домена и двух альфа-спиралей (рис. 1, а и б).

Ранее мы показали, что у PHF10 имеются изоформы, отличающиеся N- и C-концами (рис. 1, а) [6]. В результате старта с альтернативных промоторов белковые изоформы могут содержать (PHF10-P1 и PHF10-S1) или не содержать (PHF10-Ps, PHF10-Ss) N-концевые 46 аминокислот. В результате альтернативной терминации C-конец изоформ оканчивается DPF-доменом (PHF10-P1 и PHF10-Ps,

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

²Центр точного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

³Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

*E-mail: so2615@gmail.com

обобщенное название PHF10-P) или вместо него – сайтом конъюгирования SUMO1 – PDSM мотивом (PHF10-SI и PHF10-Ss, обобщенное название PHF10-S). DPF принадлежит к группе PHD- доменов, взаимодействующих с N-концевыми последовательностями гистонов. DPF является уникаль-

ным доменом, присутствующим всего в нескольких белках [7]. Согласно моделированию DPF белка PHF10 способен связываться с H3K14ac N-концом гистона [8]. H3K14ac модификация характерна для активирующихся генов и локализуется на промоторах и кодирующей части генов [9].

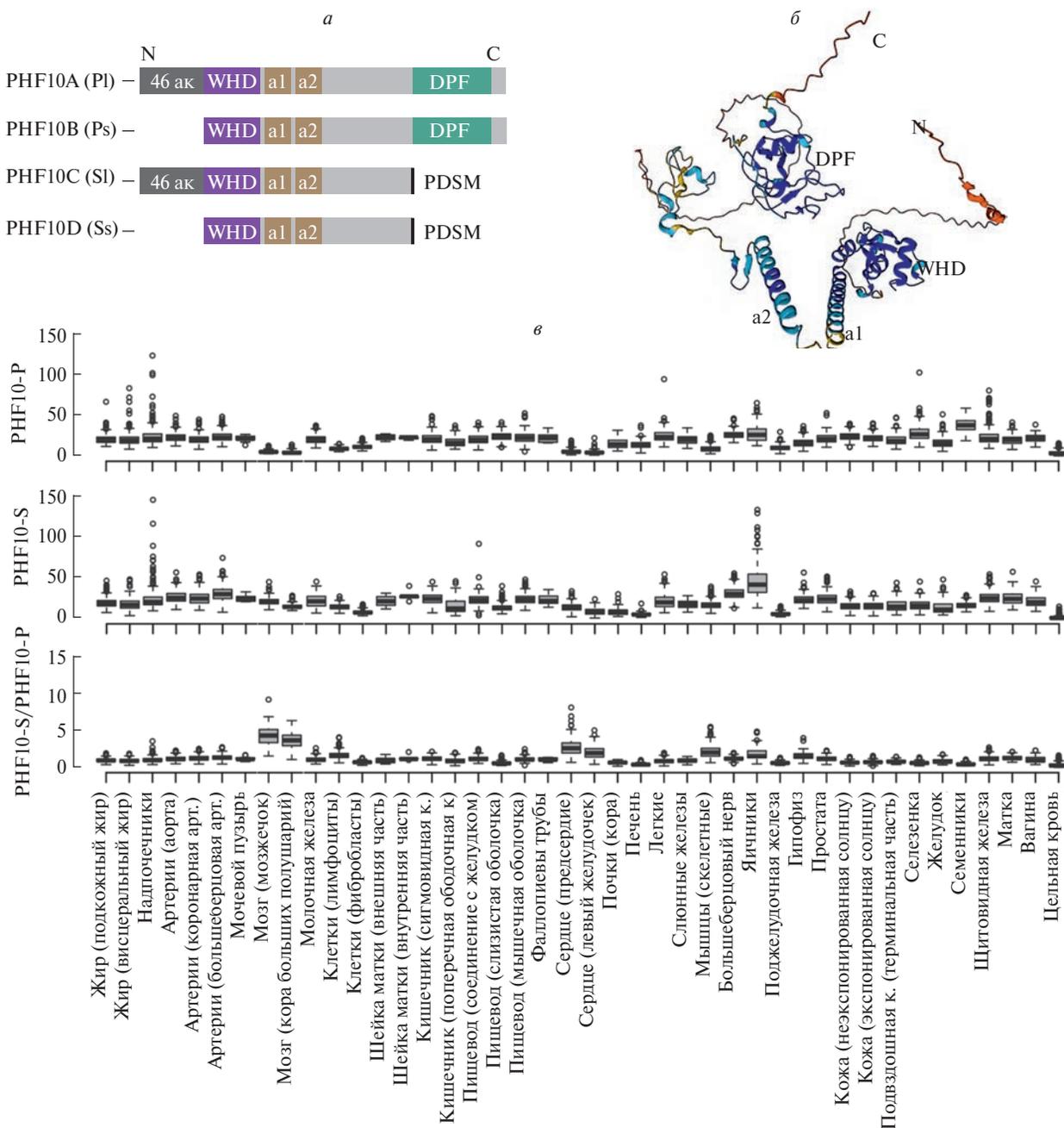


Рис. 1. (а) Схема изоформ PHF10. Обозначены характерные домены и мотивы изоформ PHF10. (б) Предсказанная структура PHF10-P1 (Q8WUB8) согласно Alpha Fold database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q8WUB8>). (в) Экспрессия изоформ PHF10-P, PHF10-S и их соотношение в различных тканях человека согласно базе данных GTEx (The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project data). По оси ординат TPM (количество транскриптов на миллион прочтений в образце).

Помимо различной доменной организации изоформы имеют различные паттерны фосфорилирования. Более всего между собой отличаются РНФ10-Р1 и РНФ10-*Ss* изоформы (рис. 1, *a*).

При миелоидной дифференцировке РНФ10-Р рекрутируются на промоторы специфических генов [10] и участвуют в привлечении РНК-полимеразы II [6]. Также для РНФ10-Р изоформ была показана важная роль в поддержании пролиферации нейрональных предшественников и фибробластов [11, 12]. Про роль РНФ10-*S* изоформ известно гораздо меньше. Мы установили, что они включаются в комплекс РВАФ альтернативно РНФ10-Р изоформам, фосфорилируются по другим аминокислотам и за счет этого гораздо стабильнее РНФ10-Р изоформ [13]. В большинстве клеточных линий онкогенного происхождения экспрессируются и РНФ10-Р и РНФ10-*S* изоформы, что затрудняет изучение их функций.

В данной работе мы выяснили, что из всех тканей человека наиболее обогащены РНФ10-*S* изоформами являются нервная и мышечная ткани. Также мы показали, что при дифференциров-

ке клеточных линий по нейрональному и мышечному пути начинают экспрессироваться РНФ10-*Ss* изоформы и значительно снижается экспрессия РНФ10-Р1 изоформ. Это явление «переключения экспрессии изоформ» является консервативным процессом и наблюдается на человеческих и мышечных культурах нейрональных клеток.

Для изучения функциональных особенностей изоформ мы проанализировали экспрессию DPF-содержащих и не содержащих изоформ и их соотношение в различных тканях человека, представленных в GTE_x (The Genotype-Tissue Expression Project data) базе данных (рис. 1, *b*) [14]. Оба типа изоформ экспрессируются практически во всех тканях и примерно на одном уровне. Однако в тканях мозга (кора больших полушарий и мозжечок на графике), сердца (предсердие и левый желудочек на графике) и в мышечных тканях (скелетные мышцы) экспрессия изоформ DPF- не содержащих изоформ (РНФ10-*S*) преобладает.

Поскольку ранее было показано, что DPF-содержащая форма нужна для пролиферации кле-

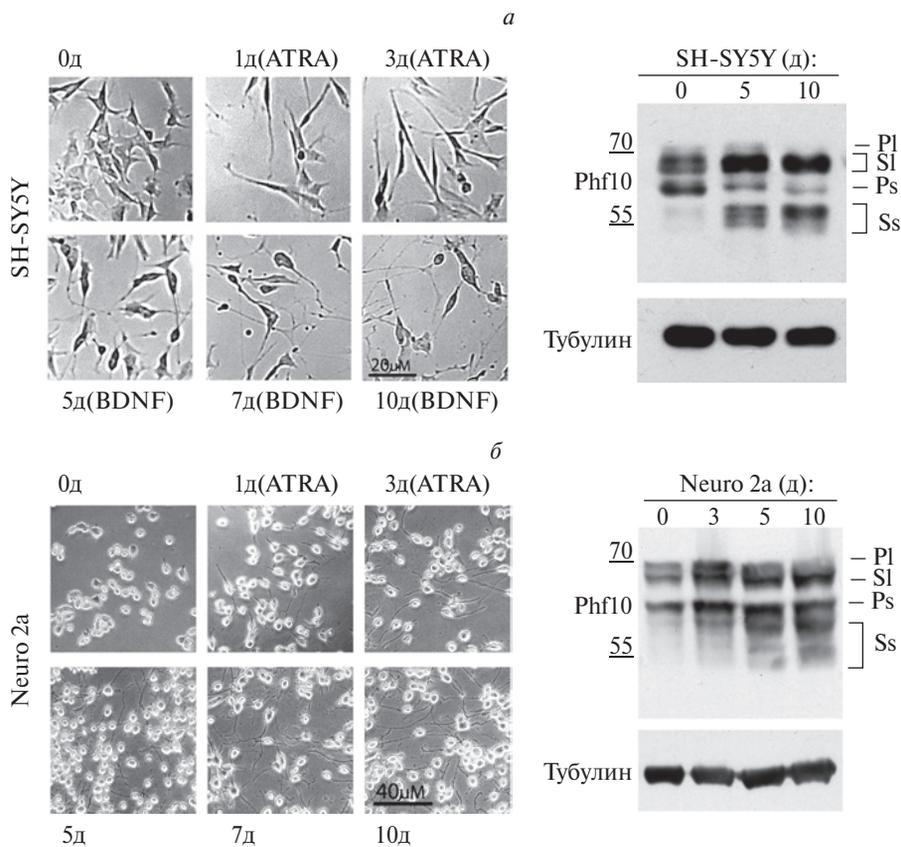


Рис. 2. (*a*) и (*b*) Нейрональная дифференцировка клеток человека линии SH-SY5Y (*A*) и клеток мыши линии Neuro 2a (*b*): левая панель – визуализация с помощью негативного контрастирования фенотипа клеток в течение десяти дней дифференцировки; правая панель – Вестерн-блоттинг изоформ РНФ10 без дифференцировки, в середине и по окончании дифференцировки. Изоформы обозначены справа. Слева показан маркер молекулярных масс – 55 и 70 кДа. Окраска антителами к тубулину использовалась как контроль нанесения в обоих случаях.

ток, мы предположили, что ее замена в тканях на изоформу, не содержащую DPF, может быть связана с дифференцировкой клеток. Для дальнейшего исследования связи этих процессов были выбраны несколько клеточных линий и проведена их дифференцировка. Линию человека SH-SY5Y нейронального происхождения дифференцировали в течение трех дней с помощью ATRA (all-trans retinoic acid) (10M) с последующим добавлением фактора BDNF (50нг/мл) в нейробазальной среде с добавлением 1x B27 и Глутамакса. На всем протяжении дифференцировки с помощью световой микроскопии фиксировали изменения клеточного фенотипа и постепенное формирование нейритов (рис. 2, б, левая панель). Также мы отбирали клетки, лизировали и проводили Вестерн-блоттинг с окрашиванием антителами к PHF10, узнающими все изоформы PHF10, полученными нами ранее [6]. Количество белка выравнивали по экспрессии тубулина (рис. 2, а, правая панель). Уже на пятый день мы детектировали уменьшение экспрессии DPF-содержащей изоформы PHF10-Ps изоформ и увеличение PHF10-SI, которая не содержит DPF. Кроме того, началась экспрессия PHF10-Ss изоформы, которых не было в недифференцированных клетках. На десятый день мы переставали детектировать экспрессию PHF10-PI и PHF10-Ps становилась еще меньше, однако значительно усиливалась экспрессия PHF10-Ss (рис. 2, а, правая панель). Таким образом, при нейрональной дифференцировке клеток человека мы наблюдали изменение экспрессии изоформ PHF10: PHF10-PI переставала экспрессироваться, а PHF10-Ss начинала и вместе с PHF10-SI становилась преобладающими в дифференцированных SH-SY5Y-клетках.

Дифференцировку другой линии нейронального происхождения, клеток мышцы Neuro2A проводили в течение десяти дней с помощью ATRA. Фенотип этих клеток несколько отличался от SH-SY5Y, однако они также давали нейриты и переставали делиться к концу дифференцировки (рис. 2, б, левая панель). Экспрессию изоформ Phf10 также детектировали с помощью Вестерн-блоттинга и окрашивания антителами против Phf10 (рис. 2, б, правая панель). К десятому дню дифференцировки мы также наблюдали прекращение экспрессии Phf10-PI изоформы, увеличение экспрессии Phf10-SI и мощную экспрессию изоформы Phf10-Ss. Однако в отличие от SH-SY5Y экспрессия Phf10-Ps не менялась, что возможно связано с тем, что некоторые процессы и сигнальные пути в культуре клеток Neuro2A могут отличаться от *in vivo* дифференцировки. В целом тенденция смены экспрессии изоформ Phf10-PI на Phf10-Ss наблюдалась и в данных клетках мышцы, что свидетельствует о консервативности молекулярных механизмов, регулирующих «переключение изоформ» и важности PHF10-Ss изоформ в нервной ткани млекопитающих.

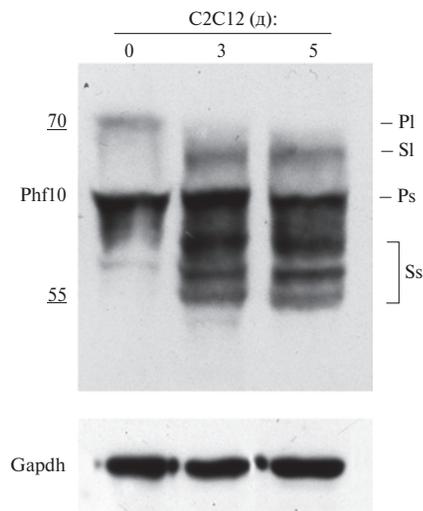


Рис. 3. Вестерн-блоттинг изоформ Phf10 в процессе миогенной дифференцировки клеток мыши линии C2C12. Изоформы обозначены справа. Слева показан маркер молекулярных масс – 55 и 70кДа. Окраска антителами к белку Gapdh использовалась как контроль нанесения.

Также была проведена дифференцировка линии immortalized мышечных скелетных миобластов C2C12 по мышечному пути с помощью замены в клеточной среде 20% бычьей сыворотки на 1% лошадиную сыворотку [15]. Методом Вестерн-блоттинга уже на третий и на пятый дни дифференцировки были обнаружены изменения уровней экспрессии изоформ Phf10. Баланс изоформ смещался в сторону изоформ, не содержащих DPF: прекращалась экспрессия Phf10-PI, а уровень Phf10-Ss и Phf10-SI изоформ возрастал (рис. 3).

Таким образом, при нейрональной и миогенной дифференцировке клеток млекопитающих (мышь и человек) происходит смена экспрессии изоформ PHF10. Изоформы, не содержащие DPF замещают изоформы с DPF-доменом. В частности, PHF10-PI перестает экспрессироваться, и заменяется на PHF10-Ss изоформу, которая не детектируется в недифференцированных клетках, но становится преобладающей в конечно-дифференцированных клетках.

При дифференцировке клеток происходит изменения в транскрибирующихся генах: меняются их эпигенетические модификации, структура хроматина и организация в пространстве. Это приводит к тому, что экспрессия некоторых генов, в частности генов пролиферации, ингибируется и активируется экспрессия тканеспецифических генов. Ранее было показано, что некоторые субъединицы PBAF имеют гомологи, которые экспрессируются в определенных клетках и тканях [3]. Таким обра-

зом, состав комплексов SWI/SNF может быть специфичен для определенных типов клеток.

Изоформы PHF10 включаются в состав комплекса PBAF альтернативно и придают комплексу определенную специфичность в отношении хроматина, с которым комплекс предпочитает связываться. DPF домен изоформ PHF10-P потенциально связывает H3K14ac N-конец гистона [8]. H3K14ac локализуется на промоторах и кодирующей части генов и возникает на тканеспецифичных генах, в процессе активации их *de novo* [9]. PHF10-Ss изоформа не содержит этот домен, но вместо этого домена способна ковалентно конъюгировать SUMO1 [6]. SUMO1 может связываться с SIM мотивами (Sumo interaction motives) других белков. Помимо этого, PHF10-P1 и PHF10-Ss имеют разные паттерны фосфорилирования: у PHF10-P1 фосфорилирование более десяти серинов и треонинов в неструктурированной части N-конца PHF10, а у PHF10-Ss такому интенсивному фосфорилированию подвергается неструктурированная часть ближе к C-концу [13]. Разные модификации также могут способствовать избирательности комплекса PBAF, включающие разные изоформы, в отношении взаимодействующих белков и транскрипционных факторов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-14-00258).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moshkin Y. M., et al. // *Mol Cell Biol.* 2012. V. 32. № 3. P. 675–688.
2. Sokpor G., et al. // *Front Mol Neurosci.* 2017. V. 10. P. 243.
3. Centore R. S., et al // *Trends Genet.* 2020. V. 36. № 12. P. 936–950.
4. Singh A., et al. // *Cell Biochem Biophys.* 2023. V. 81. № 2. P. 167–187.
5. Krasteva V., et al. // *Exp Hematol.* 2017. V. 48. P. 58–71.
6. Brechalov A. V., et al. // *Cell Cycle.* 2014. V. 13 № 12. P. 1970–1979.
7. Soshnikova N. V., et al. // *Acta Naturae.* 2020. V. 12. № 4. P. 57–65.
8. Chugunov A. O., et al. // *Int J Mol Sci.* 2021. V. 22. № 20.
9. Regadas I., et al. // *Mol Cell.* 2021. Vol. 81. № 8. P. 1766–1780.
10. Viryasova G. M., et al. // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2019. V. 1866. № 12. P. 118525.
11. Lessard J., et al // *Neuron.* 2007. V. 55. № 2. P. 201–215.
12. Banga S. S., et al. // *Cytogenet Genome Res.* 2009. V. 126. № 3. P. 227–242.
13. Tatarskiy V. V. et al. // *Sci Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 5645.
14. GTEx Consortium // *Nat Genet.* 2013. V. 45. № 6. P. 580–585.
15. Jing L., et al. // *Bio Protoc.* 2012. V. 2. № 10.

NEURONAL AND MUSCLE DIFFERENTIATION OF MAMMALIAN CELLS IS ACCOMPANIED BY A CHANGE OF PHF10 ISOFORM EXPRESSION

D. O. Bayramova^{a,b}, A. M. Azieva^c, A. V. Feoktistov^{a,b},
Academician of the RAS S. G. Georgieva^a, N. V. Soshnikova^{a,b,#}

^aDepartment of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^bCenter for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^cNational Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: so2615@gmail.com

The PBAF chromatin remodeling complex of the SWI/SNF family plays a critical role in the regulation of gene expression during tissue differentiation and organism development. The subunits of the PBAF complex have domains responsible for binding to N-terminal histone sequences. It determines the specificity of binding of the complex to chromatin. PHF10, a specific subunit of the PBAF complex, contains a DPF domain, which is a unique chromatin interaction domain. A PHF10 isoform that lacks the DPF domain is also present in vertebrate cells. This work shows that during neuronal and muscle differentiation of human and mouse cells, the expression of PHF10 isoforms changes: the form that does not have DPF replaces the form in which it is present. Replacement of PHF10 isoforms in the PBAF complex may affect its selectivity in the regulation of genes in differentiating cells.

Keywords: neural differentiation, chromatin remodeling, SWI/SNF, PBAF, PHF10, gene expression

УДК: 575:577.59:636.9

ПОЛИМОРФИЗМ МЕЛАНОФИЛИНА У ХОРЬКОВ РАЗНОГО ОКРАСА

© 2024 г. Член-корреспондент Г. Ю. Косовский*, В. И. Глазко,
О. И. Абрамов, Т. Т. Глазко

Поступило 20.10.2023 г.

После доработки 08.11.2023 г.

Принято к публикации 10.11.2023 г

У млекопитающих основной вклад в изменчивость пигментации вносят две группы генов, непосредственно связанные с метаболическими путями синтеза пигментов и контролирующие транспорт в меланоцитах меланосом к кератиноцитам. С целью выявления генетических основ вариантов такой изменчивости выполнено сравнение нуклеотидных последовательностей гена меланофилина у двух групп хорьков – серебристого окраса и животных дикого типа с использованием секвенирования 16 экзонов. У носителей серебристого окраса выявлена мононуклеотидная делеция в 9-м экзоне, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию ниже по течению стоп-кодона. Мутантный белок почти полностью лишен С-концевого домена, ответственного за контакт меланосом с актином при их продвижении к периферии меланоцитов, но сохраняет лидирующий домен, участвующий в формировании меланосом. Сочетание сохранности N-домена и дефекта С-домена мутантного белка впервые позволяет объяснить неполное доминирование белка дикого типа у гетерозигот.

Ключевые слова: меланофилин, секвенирование, делеция, экзоны, окрас, хорьки

DOI: 10.31857/S2686738924010197, EDN: KHDSXD

ВВЕДЕНИЕ

Пигментация кожи и волос является важным показателем у млекопитающих, часто связанным с целым рядом физиологических характеристик, в том числе с предрасположенностью к врожденным и инфекционным заболеваниям [1]. Изменчивость окраса шерсти у животных сельскохозяйственных видов, как правило, имеет прямое отношение к породной принадлежности. Окрас шерсти имеет высоко полигенную основу, к настоящему времени описано 378 генов, которые вовлечены в формирование окраски шерсти у млекопитающих [2, 3]. Среди них можно выделить группы генов, продукты которых участвуют в синтезе собственно меланинов в меланоцитах и другие, ответственные за формирование меланосом и их продвижения к кератиноцитам. Обнаружено, что существенный вклад в разнообразие окраса млекопитающих вносят гены второй группы, в частности, мутации гена

меланофилина (*mlph*), продукт которого участвует в транспорте зрелых меланосом и их накоплению на дендритных концах меланоцитов. Мутации гена *mlph* описаны у разных видов и связаны с ослаблением пигментации. Такое ослабление описано у ряда видов птиц [4, 5], собак [6], кроликов [7], кошек [8], американских норок [9, 10], крупного рогатого скота бельгийской голубой породы [11], овец [12, 13]. У карликовых пород кроликов нарушение сплайсинга и появление стоп-кодона гена *mlph* приводило к выпадению из мРНК 3 и 4 экзонов, формированию укороченного белка и, соответственно, уменьшению скопления меланосом [14]. Мононуклеотидная делеция в экзоне 5 гена *mlph*, приводящая к сдвигу рамки считывания, может приводить к такому же разбавлению цвета шерсти кроликов [15]. У хорька не проводились исследования влияния мутаций гена *mlph* на окрас животных.

У кролика последовательность гена *mlph* включает 15 экзонов, белок MLPN кролика по содержанию 562 аминокислот (NP_001284414) оказался короче по сравнению с белками человека и мыши, состоящими из 600 (NP_077006) и 590 (NP_443748) аминокислот соответственно. N- и С-домены MLPN, связывающиеся с такими белками, вовлеченными в транспорт меланосом, как Rab27A и актин, консервативны у человека и мыши, а срединный до-

ФГБНУ Научно-исследовательский институт пушиного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева, Московская обл., Раменский р-н, пос. Родники, Россия.

*E-mail: gkosovsky@mail.ru

мен, связывающий миозин VA, имеет выраженную видовую специфику [16].

Таким образом, ген *mlph* постепенно становится наиболее многообещающим геном-кандидатом для исследования вариантов пигментации у млекопитающих.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы было выполнение секвенирования гена *mlph* группы хорьков с разными окрасами, сравнение результатов у животных с серебристым фенотипом с хорьками дикого типа, а также оценка потенциального влияния отличий в секвенированных последовательностях на окрас животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения анализа гена меланофелина взяты 5 образцов шкурок классического и 5 образцов серебристого хорька (зверохозяйство “Русский Соболь”, Пушкино), в дальнейшем обозначенные как дикий и мутантный типы соответственно.

Для выделения ДНК использовался метод фенол-гуанидин-хлороформной экстракции, реагенты для выделения ДНК/РНК приобретены в фирме ООО “Евродиагностика Био” и использованы в соответствии с протоколом производителя.

Для подбора праймеров выполнен анализ нуклеотидной последовательности гена меланофелина у хорька (Genbank number >NW_025422021.1) с учетом необходимости амплификации не только экзонов, но и небольших участков прилегающих к ним интронов. Разбивка изучаемого гена на интроны и экзоны проведена в программе Splign (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/splign/splign.cgi?textpage=online&level=form>). Подбор праймеров к экзонам выполнен в программе Primer 3 (<https://primer3.ut.ee/>). Валидация и отбор выбранных праймеров произведен через он-лайн базу GenBank программой Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Праймеры синтезированы в ООО “Евроген”.

Смесь для реакции ПЦР готовили в следующих пропорциях: ПЦР буфер 10x – 2.5 мкл, образец ДНК – 5 мкл, нуклеотиды (0.2 мМ) – 2.5 мкл, праймеры (20 пмоль) – 2.5 мкл, ДНК полимеразы – 1 е.а. Базовая программа амплификации – 95°C, старт – 94°C – 10 сек., 62°C – 10 сек. – 40 циклов, 72°C – 10 сек., 24°C – хранение. Электрофорез проводился в ТАЕ буфере или ТБЕ буфере, на 1.8% агазоре, с добавлением 10 мкл раствора 1% бромистого этидия на 100 мл геля.

После получения однородных и чистых ПЦР продуктов, ампликоны передавались в компанию ООО “Синтол” для секвенирования. Получен-



Рис. 1. Хроматограмма секвенса, содержащая мутацию. Сверху приведен аналогичный участок гена *mlph* у хорька дикого типа, снизу – мутантный тип (выделено прямоугольником).

ные хроматограммы сиквенса проанализированы программой Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>), выравнивание и сравнение последовательностей выполнено программой ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Выявленные полиморфизмы верифицированы в ручном режиме при помощи анализа хроматограмм сиквенса.

Анализ полученных хроматограмм сиквенсов позволил получить следующие данные. Хорьки серебристого окраса отличались от темноокрашенных дикого типа мутациями гена *mlph* по типу инверсии 2х нуклеотидов и делецией одного, примерно в середине 9-го экзона (рис. 1). Мутантная последовательность приводит к образованию стоп кодона на примерно 200 аминокислот раньше у серебристых хорьков в гомозиготе относительно белка дикого типа.

Нами проведена оценка нуклеотидной последовательности дикого и серебристого аллельных вариантов путем компьютерного построения зрелой РНК дикого и мутантного типов с последующей реконструкцией соответствующих аминокислотных

последовательностей с использованием программы Transcription and Translation Tool (<https://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/trans.htm>). Полученные результаты представлены на рис. 2.

Можно увидеть (рис. 2), что обнаруженная мутация в 9 экзоне приводит к сдвигу рамки считывания по сравнению с диким типом (рис. 2, выделены курсивом). Первая мутантная аминокислота имеет номер 327 и представляет замену аминокислоты серин у дикого типа MLPN на аминокислоту треонин у мутантного типа. Далее в аминокислотной позиции 373 образуется стоп-кодон, приводя к формированию укороченной формы белка MLPN у хорьков серебристой окраски.

Белок MLPN имеет 3 функциональных домена: N-участок содержит домен, связывающийся с белком Rab27A, который, в свою очередь, взаимодействует с меланосомами. Центральный участок связывается с моторным протеином MyoVa, C-концевой участок взаимодействует с актином при доставке меланосом к дендритам меланоцитов [17]. Обнаруженная мутация находится в аминокислотной позиции 327, а измененная после-

Аминокислотная последовательность белка меланофилина дикого типа

MGRKLDLSKLTDEEAKHVWEVQRDFDLRRKEERLEGLKGRIKKESSQRELLADTAH
 LNETHCARCLQPYRLLATPRRQCLDCRLFTCQNC SHAHP EEQGWLCDPCHLARVVKIGS
 LEWYHQHLRARFKRFGSAKVIRSLCGRLQGAGLPDRARGSPDIHSGPDASAGEGSGDSE
 QTDEDGELDTAAQAQPIGSKKKRSLIHDLD FEADSDDDSTWSGSHPPDSSPVPAAMDLSLQ
 VPCAQFTTDEPCA K DASPEAMVAPGCHPPPEEQTDSLSPAGQDTLTELCPGESRR TAL
 GTAAAAGKSITR SERLPSQYLAEMDTSEDDGE SPGAPHA AFHPCGGGGH T P S Q S Q C L P G C
EPTDADRE E E T L R R K L E E L T S H I S D Q G A S E E E G S K E E E A E L D R S P S I R D L P G A G L E V S G A V G Q
TYRQETIPGDPQDLVQPSRTTDKELLEDRVAVTASEVHQVESEVSNIKSKIAALQAAGLTVK
PSGKPRRKS NLPIFLPRLAERLDRNPKDPNADPMEEMTVAPYLLRRKFTNSPKSQGKDGISFH
RQ SAYRGS L T Q R N P N S R K G V A N H S F A K P V M T H Q P

Аминокислотная последовательность белка меланофилина
 мутантного «серебристого» типа

MGRKLDLSKLTDEEAKHVWEVQRDFDLRRKEERLEGLKGRIKKESSQRELLADTAH
 LNETHCARCLQPYRLLATPRRQCLDCRLFTCQNC SHAHP EEQGWLCDPCHLARVVKIGS
 LEWYHQHLRARFKRFGSAKVIRSLCGRLQGAGLPDRARGSPDIHSGPDASAGEGSGDSE
 QTDEDGELDTAAQAQPIGSKKKRSLIHDLD FEADSDDDSTWSGSHPPDSSPVPAAMDLSLQ
 VPCAQFTTDEPCA K DASPEAMVAPGCHPPPEEQTDSLSPAGQDTLTELCPGESRR TAL
 GTAAAAGKSITR SERLPSQYLAEMDTSEDDGE T P G L P T L P S T H A E E E A T P R P R V S V S Q A A S P
Q M R T E K R R P S G G S W R S

Рис. 2. Сравнение аминокислотных последовательностей дикой и мутантной форм меланофилина. Для наглядности мы выделили одинаковые у двух форм последовательности аминокислот зеленым цветом, а различающиеся – желтым и курсивом. Первая измененная аминокислота выделена также подчеркиванием.

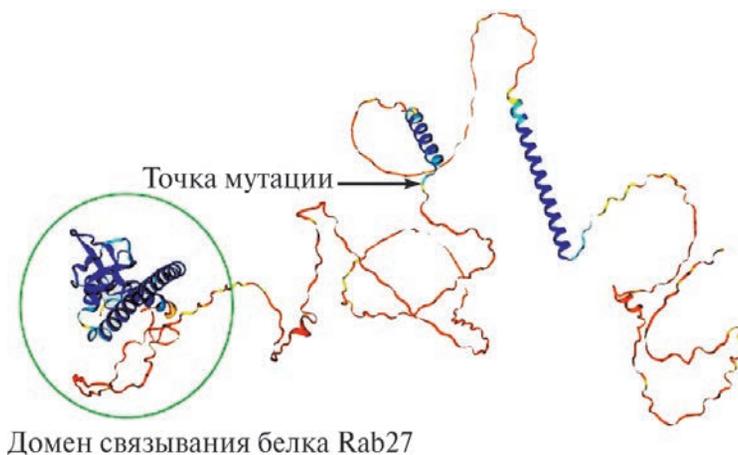


Рис. 3. Структура меланофилина дикого типа. Слева кружком выделен домен связывания с белком Rab27A. Далее по последовательности присутствуют две альфа-цепи. Первая из них относится к домену связывания миозина, вторая — входит в состав функционального домена связывания актина. Точка мутации, присутствующая в аналогичной последовательности мутантного белка, отмечена стрелкой.

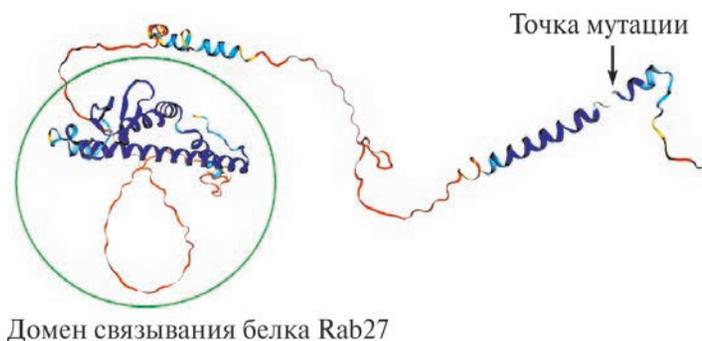


Рис. 4. Структура меланофилина мутантного типа. Кружком выделен домен связывания белка Rab27a. Мутантная аминокислота отмечена стрелкой. Последовательность аминокислот после точки мутации не соответствует аналогичной последовательности в диком типе. Присутствующие на данном рисунке две альфа-цепи не являются аналогичными альфа-цепям в белке дикого типа.

довательность длится до аминокислоты номер 372 и затем обрывается. Мутантный белок полностью теряет С концевой домен связывания с актином, а также имеет измененный домен связывания с миозиновым белком MyoVa.

Выполнено 3D моделирование структур форм MLPN дикого и мутантного типов при помощи программы для построения трехмерных моделей (<https://swissmodel.expasy.org>), результаты которого представлены на рис. 3 и 4.

Можно увидеть, что выявленная мутация характеризуется глубокими конформационными изменениями в структуре белка MLPN, существенными также для изменений его функциональных харак-

теристик. Первое очевидное отличие — мутантный белок гораздо короче своего дикого аналога (372 аминокислотных остатков против 579). Далее, в диком типе две альфа-спирали аминокислотных остатков расположены после точки мутации (рис. 3), в мутантном же типе происходит не только обрыв синтеза белка из-за стоп-кодона, но и изменения третичной структуры в области, предшествующей точке мутации. Это происходит, по-видимому, из-за наличия в мутантном белке небольшого участка с измененной последовательностью аминокислот после точки мутации и до стоп-кодона (рис. 4). В результате взаимодействия с новой последовательностью (рис. 3), конформация домена, связывающегося с миозином, изменяется — появ-

ляются две новые альфа-спирали, отсутствующие в белке дикого типа.

Далее нами проведен подробный трехмерный анализ структуры N-концевого домена белка MLPN, связывающегося через Rab27A с органеллами, накапливающими меланин – меланосомами (на рис. 3 и 4 выделены кружками). Этот домен полностью сохраняет свою третичную структуру, не подвергается конформационным изменениям в результате наличия измененного участка после точки мутации.

Полученные данные согласуются с фенотипическими наблюдениями о том, что серебристый окрас наследуется по типу неполного доминирования. То есть в гетерозиготных особях по данной мутации наблюдается не полная потеря цвета, а лишь ослабление, обесцвечивание окраски. Можно ожидать, что это происходит в результате эффекта конкурентного ингибирования дикой формы MLPN и мутантной. Мутантный белок лишен способности к транспорту, но сохраняет интактным домен связывания с меланосомами. В результате происходит конкуренция между двумя формами белка за связывание с меланосомами и полноценному дикому белку удается транспортировать к дендритам меланоцитов гораздо меньшее количество меланосом. В результате мы имеем следующую фенотипическую картину: дикие по MLPN хорьки окрашены типично, гомозиготы по мутантному типу почти полностью белые, гетерозиготы имеют ослабленный окрас и белые пятна в различных частях шкурки.

В общем, в результате выполненного исследования обнаружены отличия между нуклеотидными последовательностями экзона 9 MLPN у хорьков с серебристым окрасом и животными дикого типа. Выявленная мутация – мононуклеотидная делеция в 9 экзоне MLPN – сдвигает рамку считывания и укорачивает длину белка. Впервые описан один из источников изменчивости пигментации млекопитающих с неполным доминированием белка дикого типа за счет сохранения функциональной активности лидирующего домена, ответственного за формирование меланосом, но повреждения терминального домена, участвующего в их транспорте, у мутантного белка.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов для проведения экспериментов, образцы шкур получены из зверохозяйства (“Русский Соболь”, Пушкино). От каждого автора было получено информированное добровольное согласие.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ermini L., Francis J. C., Rosa G. S., et al.* Evolutionary selection of alleles in the melanophilin gene that impacts on prostate organ function and cancer risk // *Evol Med Public Health.* 2021. V. 9 (1). P. 311–321.
2. *Alshanbari F., Castaneda C., Juras R., et al.* (2019) Comparative FISH-Mapping of MC1R, ASIP, and TYRP1 in New and Old World Camelids and Association Analysis With Coat Color Phenotypes in the Dromedary (*Camelus dromedarius*) // *Front Genet.* 2019. V. 10. P. 340.
3. *Jia X., Ding P., Chen S., et al.* Analysis of MC1R, MITF, TYR, TYRP1, and MLPN Genes Polymorphism in Four Rabbit Breeds with Different Coat Colors // *Animals (Basel).* 2021. V. 11 (1). P. 81.
4. *Vaez M., Follett S. A., Bed'hom B., et al.* A single point-mutation within the melanophilin gene causes the lavender plumage colour dilution phenotype in the chicken // *BMC Genet.* 2008. V. 9. P. 7.
5. *Bed'hom B., Vaez M., Coville J. L., et al.* The lavender plumage colour in Japanese quail is associated with a complex mutation in the region of MLPN that is related to differences in growth, feed consumption and body temperature // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 442.
6. *Bauer A., Kehl A., Jagannathan V., et al.* A novel MLPN variant in dogs with coat colour dilution. *Anim Genet.* 2018. V. 49 (1). P. 94–97.
7. *Demars J., Iannuccelli N., Utzeri V. J., et al.* New Insights into the Melanophilin (MLPN) Gene Affecting Coat Color Dilution in Rabbits // *Genes (Basel).* 2018. V. 9 (9). P. 430.
8. *Ishida Y., David V. A., Eizirik E., et al.* A homozygous single-base deletion in MLPN causes the dilute coat color phenotype in the domestic cat // *Genomics.* 2006. V. 88 (6). P. 698–705.
9. *Cirera S., Markakis M. N., Christensen K., et al.* New insights into the melanophilin (MLPN) gene controlling coat color phenotypes in American mink // *Gene.* 2013. V. 527 (1). P. 48–54.
10. *Manakhov A. D., Andreeva T. V., Trapezov O. V., Kolchanov N. A., Rogaev E. I.* Genome analysis identifies the mutant genes for common industrial Silverblue and Hedlund white coat colours in American mink // *Sci Rep.* 2019. V. 9 (1). P. 4581.
11. *Li W., Sartelet A., Tamma N., et al.* Reverse genetic screen for loss-of-function mutations uncovers a frameshifting deletion in the melanophilin gene accountable for a distinctive coat color in Belgian Blue cattle // *Anim Genet.* 2016. V. 47 (1). P. 110–113.
12. *Posbergh C. J., Staiger E. A., Huson H.* A Stop-Gain Mutation within MLPN Is Responsible for the Lilac Dilution Observed in Jacob Sheep // *Genes (Basel).* 2020. V. 11 (6). P. 618.

13. *Kalds P., Zhou S., Gao Y., et al.* Genetics of the phenotypic evolution in sheep: a molecular look at diversity-driving genes // *Genet Sel Evol.* 2022. V. 54 (1). P. 61.
14. *Lehner S., Gähle M., Dierks C., et al.* Two-exon skipping within MLPH is associated with coat color dilution in rabbits // *PLoS One.* 2013. V. 8 (12). P. e84525.
15. *Fontanesi L., Scotti E., Allain D., et al.* A frameshift mutation in the melanophilin gene causes the dilute coat colour in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) breeds // *Anim Genet.* 2013. V. 45 (2). P. 248–55.
16. *Demars J., Iannuccelli N., Utzeri V.J., et al.* New Insights into the Melanophilin (MLPH) Gene Affecting Coat Color Dilution in Rabbits // *Genes (Basel).* 2018. V. 9 (9). P. 430.
17. *Hume A. N., Tarafder A.K., Ramalho J. S., et al.* A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes // *Mol Biol Cell.* 2006. V. 17 (11). P. 4720–4735.

MELANOPHILIN POLYMORPHISM IN FERRETS OF DIFFERENT COLORS

**Corresponding Member of the RAS G. Yu. Kosovsky[#], V. I. Glazko,
O. I. Abramov, T. T. Glazko**

*Afanas'ev Research Institute of Fur-Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding,
pos. Rodniki, Ramenskii Region, Moscow Province, Russian Federation*

[#]*E-mail: gkosovsky@mail.ru*

In mammals, the main contribution to the variability of pigmentation is made by two groups of genes directly related to the metabolic pathways of pigment synthesis and controlling the transport of melanosomes in melanocytes to keratinocytes. In order to identify the genetic basis of pigmentation variants, the nucleotide sequences of the melanophilin gene were compared in two groups of ferrets – silver-colored and wild-type animals using sequencing of 16 exons. In carriers of silver color, a single nucleotide deletion was detected in the 9th exon, leading to a shift in the reading frame and the formation of a stop codon downstream. The protein encoded by the mutant allele is almost completely devoid of the C terminal domain of the protein responsible for the contact of melanosomes with actin during their moving to the periphery of melanocytes, but it retains the leading domain involved in the formation of melanosomes. The combination of the preservation of the N domain and the defect of the C domain of the mutant protein for the first time makes it possible to explain the incomplete dominance of the wild-type protein in heterozygotes.

Keywords: melanophilin, sequencing, deletion, exons, color, ferrets

УДК 577.175.14

***N*⁶-(5-ФЕНИЛПЕНТАН-1-ИЛ)АДЕНИН – НОВЫЙ НЕКОНКУРЕНТНЫЙ РЕЦЕПТОРСPECИФИЧНЫЙ ANТИЦИТОКИНИН**

© 2024 г. А. А. Зенченко^{1,*}, Е. М. Савельева², М. С. Дреничев¹,
Г. А. Романов², В. Е. Ословский¹

Представлено академиком РАН С.Г. Георгиевой

Поступило 15.10.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принято к публикации 17.11.2023 г.

Впервые был получен *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин – синтетическое производное аденина с рецепторспецифичным антицитокениновым действием. Данное соединение проявляет выраженный антицитокениновый эффект, снижая цитокенин-индуцированную экспрессию репортерного гена GUS, при взаимодействии с цитокениновым рецептором CRE1/АНК4 модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Гораздо слабее данный эффект проявляется с родственным рецептором АНК2 и не проявляется вовсе с рецептором АНК3. Мы показали, что *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин не связывается с лиганд-связывающими сайтами рецепторов цитокенинов арабидопсиса, что не позволяет отнести его к истинным цитокениновым антагонистам. Несмотря на пока неизученный механизм действия, данное соединение может найти своё применение в качестве компонента растительного регулятора роста. Как и истинные антицитокенины, оно усиливает рост корней проростков арабидопсиса, по-видимому, подавляя действие эндогенных цитокенинов на «корневой» рецептор CRE1/АНК4.

Ключевые слова: Цитокенины, антицитокенины, регуляторы роста растений, производное пурина

DOI: 10.31857/S2686738924010207, **EDN:** KGJSNF

Цитокенины – группа классических фитогормонов. Цитокениновая сигнальная система обнаружена практически у всех видов растений, в том числе у эволюционно древних [1]. Показано, что цитокенины влияют на множество процессов на протяжении всех этапов онтогенеза растений [2, 3]. Возможность управления этой системой открывает широкие перспективы для развития сельского хозяйства. Цитокенины положительно влияют на скорость роста побега, стимулируют развитие хлоропластов, задерживают старение листьев, повышают устойчивость растений к повреждающим факторам внешней среды [4]. Однако основной сложностью на пути масштабного использования цитокенинов в растениеводстве является их негативное действие на рост корня [5].

Локальные манипуляции с цитокениновым сигналингом, не связанные с генетическими мо-

дификациями растений, возможны за счёт использования растительных стимуляторов и регуляторов роста. В состав таких препаратов могут быть включены рецепторспецифичные антицитокенины, способные действовать орган- и тканеспецифично.

Рецепторы – ключевые белки, определяющие силу и направленность сигналинга гормонов, в том числе цитокенинов. В растениях рецепторы существуют в виде семейства белков, члены которого обладают разной лигандной специфичностью и разной преимущественной локализацией в органах и тканях [6]. Селективное подавление работы «корневых» цитокениновых рецепторов (CRE1/АНК4 у арабидопсиса [7]) с помощью антицитокенинов способно стимулировать рост корней [8], потенциально не влияя на стимулирующую активность цитокенинов в наземных частях растений.

В немногочисленных публикациях, сообщающих об обнаружении соединений с антицитокениновым эффектом, были описаны либо основания-антагонисты [8, 9], либо соединения более сложного строения, не имеющие высокого сродства к лиганд-связывающему сайту цитокениновых рецепторов [10–12]. В данной работе нами получен *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин – новое *N*⁶-заме-

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва, Россия

² Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской Академии наук, Москва, Россия

*E-mail: kolomatchenkoa@yandex.ru

шенное производное аденина с антицитокининовым действием по отношению к рецептору CRE1/АНК4. Данное соединение является структурным аналогом природного цитокинина *N*⁶-бензиладенина (БА) и характеризуется наличием гидрофобного заместителя, содержащего длинный пятичленный алифатический линкер, соединяющий фенильный остаток с аминогруппой в *N*⁶-положении аденина. Однако в отличие от уже известных антицитокининов-оснований полученное соединение не является истинным цитокининовым антагонистом.

*N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин был получен с использованием метода региоселективного алкилирования *N*⁶-ацетил-2',3',5'-три-*O*-ацетиладенозина (**1**) в условиях реакции Мицунобу с последующим деблокированием в основных условиях с получением нуклеозидного производного *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденозина (**2**), который далее подвергали кислотному гидролизу *N*-гликозидной связи с получением целевого *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденина (**3**) (рис. 1). Структура полученного соединения была подтверждена данными ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения (HRMS).

Цитокининовая и антицитокининовая активность полученного *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** была исследована в тест-системе на основе проростков *Arabidopsis thaliana*. Тестирование проводили с использованием двойных инсерционных мутантов по рецепторам цитокининов, у которых в каждом мутантном клоне активен только один из

трех рецепторов (АНК2, АНК3 или CRE1/АНК4). Все используемые растения трансформированы геном *GUS*, который поставлен под контроль промотора гена первичного ответа на цитокинины *ARR5*.

Цитокининовую активность соединения **3** определяли в физиологической концентрации 10⁻⁶ М по уровню *GUS*-активности, отражающей интенсивность экспрессии конструкции *Parr5: GUS* [13], и рассчитывали в процентах от активности природного цитокинина БА в той же концентрации. Из всех полученных значений предварительно вычитали уровень *GUS*-активности, индуцированной эндогенными цитокининами. В результате было показано, что данное соединение не проявляет выраженной фитогормональной активности ни для одного из рецепторов цитокининов арабидопсиса.

Для проверки наличия и силы антицитокининовой активности испытывали способность соединения **3** подавлять физиологическое действие БА. При проведении биотеста на проростках мутантного арабидопсиса, экспрессирующего единственный рецептор CRE1/АНК4, было показано, что **3** достоверно ингибирует действие БА при их совместном добавлении к проросткам. При этом антицитокининовый эффект **3** зависит от его соотношения с цитокинином. При концентрации, превышающей концентрацию БА в 500 раз, *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин подавляет активацию рецептора CRE1/АНК4 цитокинином на ~92%, тогда как при более низких соотношениях эффект выражен слабее или отсутствует (рис. 2). На проростках, экс-

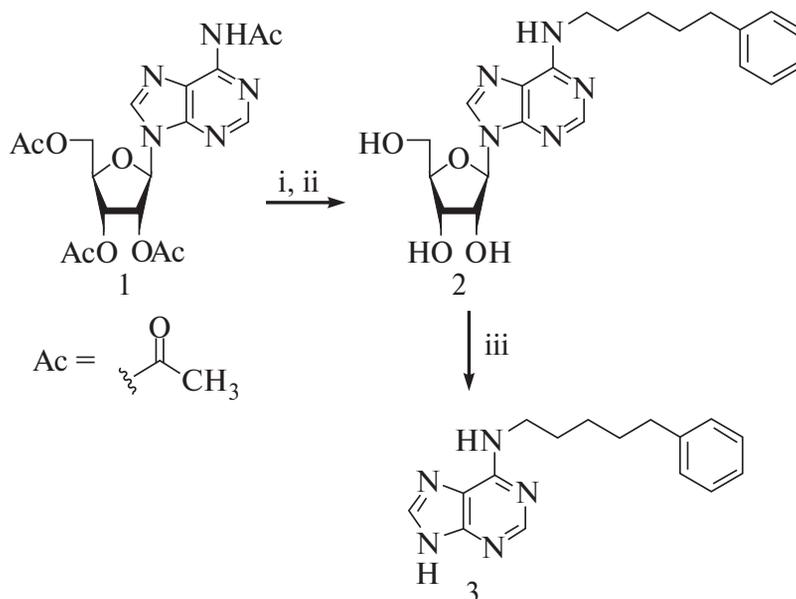


Рис. 1. Синтез *N*⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденина. Реагенты и условия: i. R-OH, Ph₃P, DIAD, THF, 20 °C, 48 ч; ii. 5M PrNH₂/MeOH, 20 °C, 24 ч; iii. HCl, 100 °C, 3 ч.

прессурирующих единственный рецептор АНК2, антицитокининовый эффект **3** был зафиксирован при разнице концентраций в 500 раз и составил менее 30%. При разнице концентраций в 100 раз и менее подавление действия БА для рецептора АНК2 не наблюдается. В отношении рецептора АНК3 N⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин не проявляет антицитокининового эффекта.

Способность N⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** непосредственно взаимодействовать с лиганд-связывающими сайтами цитокининовых рецепторов арабидопсиса было проверено радиолигандным методом с использованием растительных мембран из транзигентно трансформированных растений *Nicotiana benthamiana* [14]. Было показано, что исследуемое соединение не обладает сколько-нибудь значимой афинностью к сайтам связывания цитокининов указанных белков и, соответственно, не может считаться истинным цитокининовым антагонистом.

Мы проверили действие N⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденина **3** на корнеобразование растений арабидопсиса *Colombia-0* в условиях *in vitro*. Растения были введены в стерильную культуру на стадии семян и прорастивались в воде до возраста 4 дней. После этого они были перемещены на вертикальные чашки Петри с агаризованной средой MS (½ по макросолям). Добавление в среду соединения **3** в концентрации 10 μM достоверно приводило (на 5-й день прорастивания) к увеличению средней длины главных корней на 9% по сравнению со средой без добавок.

Таким образом, N⁶-(5-фенилпентан-1-ил)аденин является, по всей видимости, антицитокинином, специфично взаимодействующим пока неизвестным способом с рецептором CRE1/АНК4; это взаимодействие напоминает аллостерическую регуляцию активности ферментов. В перспективе, обнаруженное соединение может быть использовано в качестве регулятора роста растений в сельском хозяйстве.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-24-00527. Выражаем благодарность Министерству науки и высшего образования Российской Федерации (темы № 0103-2019-0004 и № 122042700043-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не имеют конфликта интересов.

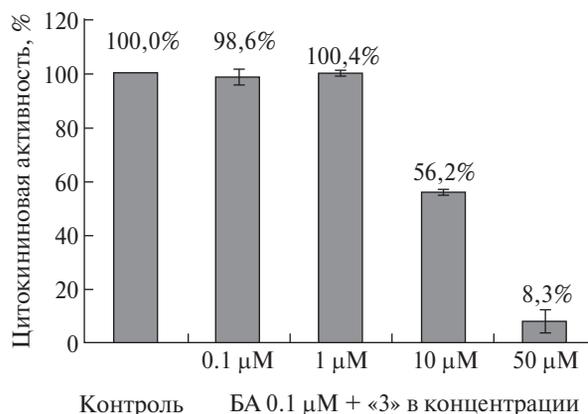


Рис. 2. Действие различных концентраций соединения **3** на интенсивность экспрессии конструкции *Parr5:GUS*, активируемой БА (0.1 μM), при взаимодействии с рецептором CRE1/АНК4. Контроль – действие БА 0.1 μM на тот же рецептор.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Spíchal L.* Cytokinins – recent news and views of evolutionally old molecules // *Funct. Plant Biol.* 2012. Vol. 39. P. 267–84.
2. *Werner T., Schmülling T.* Cytokinin action in plant development // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2009. Vol. 12. P. 527–538.
3. *Gruhn N., Heyl A.* Updates on the model and the evolution of cytokinin signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2013. Vol. 16. P. 569–574.
4. *Kieber J.J., Schaller G.E.* Cytokinins // *Arabidopsis Book*, 2014. Vol. 12. P. e0168.
5. *Schaller G.E., Bishopp A., Kieber J.J.* The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development // *Plant Cell*. 2015. Vol. 27. P. 44.
6. *Higuchi M., Pischke M.S., Mähönen A.P., et al.* In planta functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. Vol. 101. P. 8821–8826.
7. *Riefler M., Novak O., Strnad M., et al.* Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism // *Plant Cell*. 2006. Vol. 18. P. 40.
8. *Spíchal L., Werner T., Popa I., et al.* The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition // *FEBS J.* 2009. Vol. 276. P. 244–53.
9. *Nisler J., Zatloukal M., Popa I., et al.* Cytokinin receptor antagonists derived from 6-benzylaminopurine // *Phytochem.* 2010. Vol. 71 (7). P. 823–30.
10. *Arata Y., Nagasawa-Iida A., Uneme H., et al.* The phenylquinazoline compound S-4893 is a non-competitive cytokinin antagonist that targets Arabidopsis cytokinin receptor CRE1 and promotes root growth in Arabidopsis and rice // *Plant Cell Physiol.* 2010. Vol. 51 (12). P. 2047–2059.
11. *Krivosheev D.M., Kolyachkina S.V., Mikhailov S.N., et al.* N⁶(Benzyloxymethyl)adenosine is a novel anticytokinin

- kinin, an antagonist of cytokinin receptor CRE1/AHK4 of *Arabidopsis* // Doklady Biochem. Biophys. 2012. Vol. 444. P. 178–181.
12. Savelieva E. M., Zenchenko A. A., Drenichev M. S., et al. In planta, in vitro and in silico studies of chiral N⁶-benzyladenine derivatives: discovery of receptor-specific S-enantiomers with cytokinin or anticytokinin activities // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23 (19). P. 11334.
13. Zvereva S. D., Romanov G. A. Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection // Russ. J. Plant Physiol. 2000. Vol. 47. P. 424–432.
14. Savelieva E. M., Lomin S. N., Romanov G. A. A modified method for quantification of cytokinin-receptor binding using isolated plant microsomes enriched with cognate transmembrane receptors // Russ. J. Plant Physiol. 2022. Vol. 69. P. 6.

N⁶-(5-PHENYLPENTAN-1-YL)ADENINE – A NEW NON-COMPETITIVE RECEPTOR-SPECIFIC ANTI-CYTOKININ

**A. A. Zenchenko^{a, #}, E. M. Savelieva^b, M. S. Drenichev^a,
G. A. Romanov^b, V. E. Oslovsky^a**

^aEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^bTimiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: kolomatchenkoa@yandex.ru

Presented by Academician of the RAS S.G. Georgieva

For the first time, N⁶-(5-phenylpentan-1-yl)adenine, a synthetic adenine derivative with a receptor-specific anticytokinin effect, was obtained. This compound exhibits a pronounced anticytokinin effect, reducing cytokinin-induced expression of the *GUS* reporter gene, when interacting with the cytokinin receptor CRE1/AHK4 of the model plant *Arabidopsis thaliana*. This effect manifests itself much weaker with the related AHK2 receptor and is not observed at all with the AHK3 receptor. We have shown that N⁶-(5-phenylpentan-1-yl)adenine does not bind to the ligand-binding sites of the *Arabidopsis* cytokinin receptors, which does not allow it to be classified as a true cytokinin antagonist. Despite the currently unknown mechanism of action, this compound may find its use as a component of plant growth regulators. Like true anticytokinins, it enhances root growth of *Arabidopsis* seedlings, apparently suppressing the action of endogenous cytokinins on the “root” receptor CRE1/AHK4.

Keywords: Cytokinins, anticytokinins, plant growth regulators, purine derivative

УДК 577.218

КОНТАКТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЭКСПРЕССИЕЙ RHF10D СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА RBAF В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Ю. П. Симонов¹, В. В. Татарский², академик РАН С. Г. Георгиева¹,
Н. В. Сошникова^{1,3,*}

Поступило 03.11.2023 г.
После доработки 17.11.2023 г.
Принято к публикации 17.11.2023 г.

Белок RHF10 входит в состав хроматин-ремоделирующего комплекса RBAF, регулирующего экспрессию широкого спектра генов в развивающемся и взрослом организме. RHF10 экспрессируется в виде нескольких изоформ, отличающихся доменной структурой. Изоформа RHF10A, содержащая С-концевой DPF-домен необходима для экспрессии генов пролиферации, функции остальных изоформ менее изучены. В данной работе мы установили, что при контактном ингибировании пролиферации клеток мыши и человека, прекращается экспрессия изоформы RHF10A и вместо нее экспрессируется изоформа RHF10D, не содержащая DPF-домен и 46 N-концевых аминокислот. Функция коротких RHF10D изоформ может быть связана с установлением межклеточных контактов.

Ключевые слова: Экспрессия генов, контактное ингибирование, ремоделинг хроматина, RBAF комплекс, RHF10, изоформы RHF10

DOI: 10.31857/S2686738924010211, EDN: KDLLXE

Комплексы семейства SWI/SNF (подсемейства BAF и RBAF) реструктурируют хроматин, используя энергию гидролиза АТФ. Комплексы перемещают нуклеосомы вдоль ДНК, увеличивая или уменьшая нуклеосомную плотность. Помимо основного фермента АТФазы комплексы содержат модуль для связывания нуклеосомы, ARP модуль и модуль, распознающий N-концевые последовательности гистонов (рис. 1, а) [1]. Субъединицы последнего определяет специфичность взаимодействия комплекса с хроматином. Например, комплекс подсемейства BAF включает субъединицу DPF3, которая

способна связывать H3K4me1. Эта модификация лизина N-конца гистона H3 является маркером энхансеров и, соответственно, рекрутирует комплексы BAF на энхансеры [2].

Данная работа посвящена изучению изоформ субъединицы RHF10 комплекса подсемейства RBAF. RHF10 экспрессируется в виде четырех изоформ, которые альтернативно включаются в состав модуля, распознающего модификации N-концов гистонов. Изоформы RHF10 отличаются N- и С-концевыми последовательностями (рис. 1, б). На С-конце двух из них (RHF10A и RHF10B изоформы) содержится DPF-домен, который, как было предсказано моделированием, по гомологии связывает H3K14ac модификацию [3]. В двух других изоформах (RHF10C и RHF10D) DPF заменен на PDSM-мотив, способный ковалентно присоединять SUMO1 убиквитин-подобный белок [4]. Также у двух изоформ (RHF10B и RHF10D) отсутствуют 46 N-концевых аминокислот. Изоформа RHF10A является активатором пролиферации и необходима для поддержания пролиферации нейрональных предшественников и фибробластов человека [5], а в дифференцированных нейронах мыши и нейтрофилах человека RHF10 представлен короткой

¹ Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Россия

² Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

³ Центр точного геномного редактирования и
генетических технологий для биомедицины Института
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта,
Москва, Россия

*E-mail: so2615nat@gmail.com

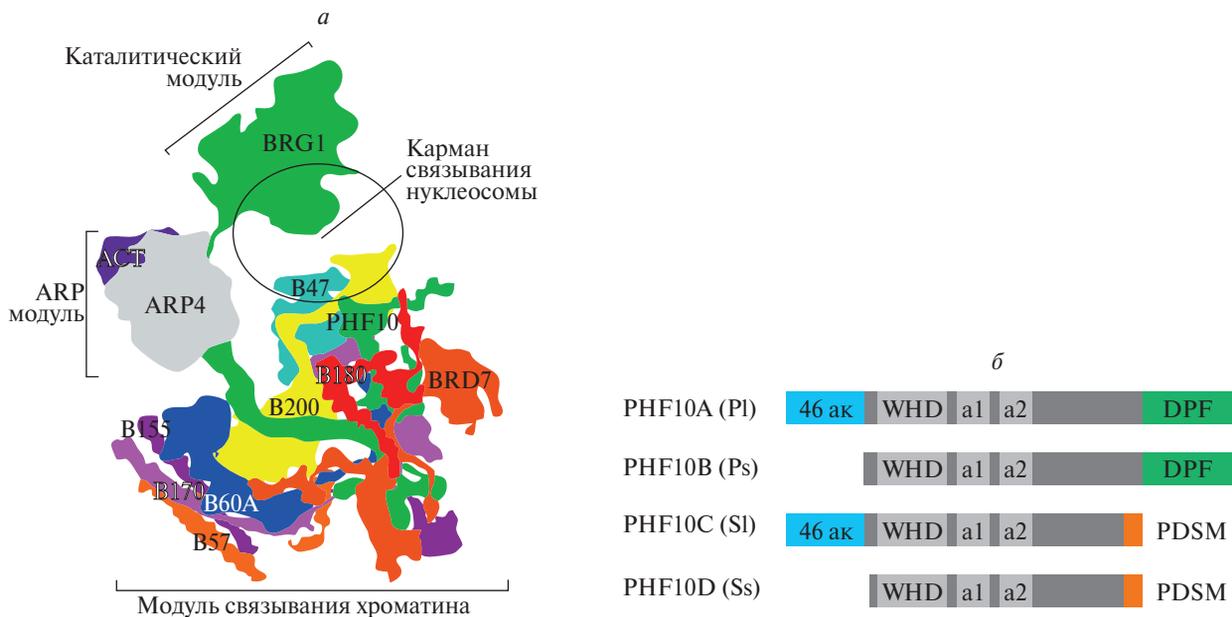


Рис. 1. (а) Схематичное изображение комплекса РВАФ. Разными цветами указаны разные субъединицы и обозначены модули комплекса (адаптировано из [1]). (б) Доменная организация изоформ РНФ10. Обозначены различные домены. Зеленым, синим и оранжевым указаны последовательности, которыми отличаются изоформы.

РНФ10D изоформой, лишенной N-концевой последовательности и DPF-домена [6, 7]. В данной работе мы показали, что аналогичная смена изоформ происходит при контактном ингибировании роста в клетках человека и мыши различного происхождения.

Контактное ингибирование (торможение) пролиферации – фундаментальное свойство, при котором нормальные клетки прекращают делиться, когда занимают все пространство, отведенное им после достижения полной конfluence [8]. При этом остановка деления и выход из клеточного цикла в организме также ассоциированы с дифференцировкой клеток. Однако, в отличие от дифференцировки, контактное ингибирование является обратимым в физиологических условиях, требующих быстрого роста и пролиферации клеток, таких как эмбриональное развитие, заживление ран или регенерация тканей. Патологическая потеря контактного торможения приводит к неконтролируемому росту клеток (характерно для солидных опухолей) и увеличивает способность клеток проникать в ткани хозяина (как при метастазировании) [9]. В условиях *in vitro* при работе на клеточных линиях контактное ингибирование пролиферации возникает при достижении клетками высокой плотности роста.

В данной работе было изучено влияние контактного ингибирования пролиферации, возникающего при высокой плотности клеток, на экспрессию изоформ РНФ10. Показано, что в иммортализованных мышечных фибробластах МЕФ и клеточной линии человека низкодифференцированной карциномы кишечника RKO при контактном торможении происходит снижение экспрессии изоформ РНФ10А. При этом начинается интенсивная экспрессия самой короткой изоформы, РНФ10D, у которой отсутствует DPF-домен и 46 N-концевых аминокислот. Замена изоформ в составе комплекса РВАФ может влиять на паттерны ремоделируемых генов и функциональные особенности комплексов РВАФ в пролиферативно активных и неактивных клетках.

Чтобы определить, происходит ли изменение экспрессии изоформ РНФ10 при контактном ингибировании пролиферации, была выбрана иммортализованная линия мышечных эмбриональных фибробластов МЕФ. Клетки данной линии при увеличении плотности выходят из клеточного цикла. Клетки МЕФ были рассажены в 60 мм чашки в плотности 100 000 клеток, и дальнейшее увеличение их плотности контролировали с помощью световой микроскопии (рис. 2, а). Клетки были собраны на первый, третий и на четвертый день после пасса-

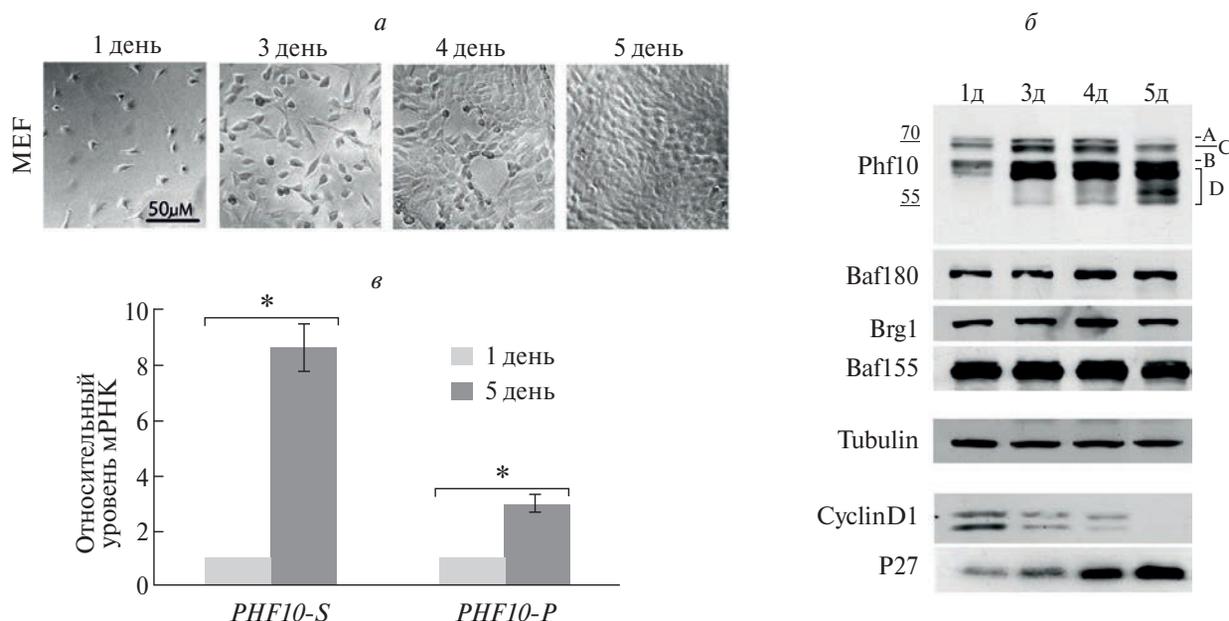


Рис. 2. (а) Мышьиные эмбриональные фибробласты MEF через 1, 3, 4 и 5 дней после пассажа на 60 мм чашки Петри. (б) Вестерн-блоттинг изоформ Phf10 (указаны справа на верхней панели), субъединиц комплекса PBAF: Baf180, Brg1, Baf155 в лизатах MEF, отобранных в различной плотности. Окрашивание антителами к β-тубулину использовали в качестве контроля нанесения. Изменение экспрессии Циклина Д1 (CyclinD1) и P27 характеризует свойство клеток пролиферировать. (в) Изменение уровня мРНК изоформ Phf10, содержащих DPF-домен (Phf10P = Phf10A + Phf10B) и содержащих PDSM-мотив (Phf10-S = Phf10C + Phf10D) на С-конце. По оси Y показано изменение уровня РНК относительно контроля при нормировании на уровень экспрессии гена *RPLP0*.

Во всех экспериментах измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. * – $p < 0.005$ сравнение с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

жа, а также на пятый день (когда клетки достигли полной конfluence). Экспрессию изоформ Phf10, других белков комплекса PBAF и маркеров клеточного цикла (циклин Д и P27) анализировали на Вестерн-блоте (эксперимент был проведен в двух повторностях). С увеличением плотности в клетках прекращалась экспрессия циклина Д (CyclinD), который вместе с CDK4,6-киназами стимулирует прогрессию клеточного цикла, и увеличивалась экспрессия P27 – ингибитора CyclinD-CDK4,6. Смещение равновесия экспрессии в сторону P27 характеризует клетки в состоянии временной остановки пролиферации (quiescence) [10]. В делящихся клетках MEF через день после пассажа экспресировались Phf10A, Phf10B и на небольшом уровне Phf10C (рис. 2, б). Однако уже на третий день, параллельно с началом возникновения контактов между клетками (рис. 2, а) наблюдалось сильное увеличение экспрессии Phf10D. При достижении клетками полной конfluence на пятый день экспрессия Phf10A прекращалась, немного возрастала Phf10B и очень сильно возрастала экспрессия

Phf10D изоформы (на вестерне они визуализируется в виде нескольких полос, так как изоформы Phf10 интенсивно фосфорилируются) (рис. 2, б). Экспрессия других субъединиц PBAF комплекса – специфической субъединицы Baf180 и коровых субъединиц Brg1 и Baf155 не менялась (рис.2, б).

Изменение экспрессии изоформ Phf10 подтверждаются измерением уровня РНК методом количественной ПЦР, выполненным на матрице кДНК с суммарной клеточной мРНК. Используемые праймеры позволяют отличить суммарное количество транскриптов DPF-содержащих изоформ Phf10A и Phf10C (вместе обозначаются как Phf10-P) от транскриптов изоформ Phf10B и Phf10D (вместе обозначаются как Phf10-S), не содержащих DPF-домен. Экспрессии транскриптов, кодирующих изоформы Phf10-S увеличивались более чем в восемь раз, а транскриптов, кодирующих Phf10-P, примерно в три раза за счет Phf10B-изоформ (рис. 2, в).

Таким образом, в клетках MEF при ингибировании пролиферации, вызванным контактным тор-

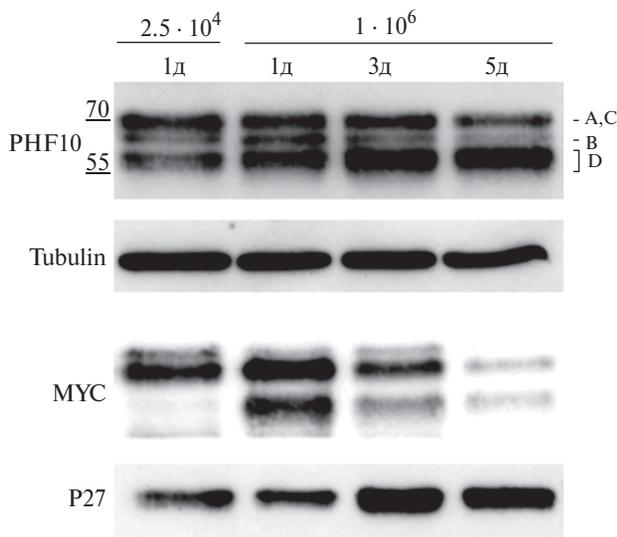


Рис. 3. Вестерн-блоттинг изоформ PNF10 (указаны справа на верхней панели) в лизатах клеток RKO, отобранных в различной плотности. Окрашивание антителами к β -тубулину использовали в качестве контроля нанесения. Изменение экспрессии MYC и P27 характеризуют свойство клеток пролиферировать.

можением, прекращается экспрессия PNF10A и начинается активная экспрессия PNF10D изоформы.

Чтобы понять является ли переключение изоформ при контакдном ингибировании процессом, происходящим в различных клетках и у различных видов млекопитающих, мы выбрали линию низкодифференцированной карциномы кишечника человека RKO (ATCC CRL-2577). Эта линия не дифференцируется, но при достижении высокой плотности останавливается в делении и выходит в состояние временной остановки пролиферации. Клетки были рассажены на 60 мм чашки Петри с более низкой и более высокой плотностью: в количестве 250 000 и 1 млн клеток на чашку. Клетки, рассажены в высокой плотности, растили еще пять дней, анализируя экспрессию PNF10 и других факторов методом Вестерн-блоттинга (эксперимент был проведен два раза).

Уже через сутки после пассажа роста в клетках, высаженных с более высокой плотностью, наблюдали повышенную экспрессию PNF10D по сравнению с клетками низкой плотности (рис. 3, сравнить $2.5 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^6$ через 1 день). С течением времени в клетках, высаженных в высокой плотности, увеличивалась экспрессия ингибитора пролиферации P27 и падала экспрессия транскрипционного фактора MYC, который стимулирует транскрипцию генов, отвечающих за прохождение G/S «чекпойнта»

и прогресс клеточного цикла (рис. 3) [11]. Это указывает, что в клетках RKO при увеличении плотности наблюдалась остановка пролиферации. Экспрессия PNF10D увеличивалась уже через трое суток после пассажа (сравнить $1 \cdot 10^6$ через 1 и 3 дня), а через пять дней PNF10D становились преобладающими среди всех изоформ PNF10. Экспрессия PNF10A, C и B уменьшалась в клетках RKO, находящихся в контактном ингибировании по сравнению с пролиферирующими клетками. Таким образом, в культуре клеток человека, как и в фибробластах мыши при возникновении контактного ингибирования начинается интенсивная экспрессия PNF10D изоформы и происходит заметное снижение экспрессии PNF10A и PNF10C-изоформ.

Механизмы, управляющие контактным ингибированием, во многом не изучены, однако известно, что в ответ на механический сигнал, генерируемый «тянущими силами» внеклеточного матрикса, или при образовании плотных межклеточных контактов (tight junction и adherent junction), или при взаимодействии клеток, опосредованном е-кадгеринами (e-cadherins), активируется сигнальный путь Hippo, в процессе реализации которого киназы LATS1/2, MST1/2 фосфорилируют транскрипционные факторы YAP/TAZ, которые перемещаются из ядра в цитоплазму и деградируют. При этом часть генов ингибируется, часть активируется [12–14]. В ядре YAP/TAZ взаимодействуют с TEAD транскрипционными факторами, и совместно стимулируют экспрессию генов, отвечающих за рост клеток и организма, и ингибируют проапоптотические гены [12].

Наши результаты показывают, что при увеличении плотности клеток и контактом ингибировании пролиферации происходит изменение экспрессии изоформ PNF10: в клетках сильно падает уровень изоформы PNF10A и начинается экспрессия изоформы PNF10D, которая становится доминантной. Таким образом, в PBAF происходит замена изоформ, так как ранее мы показали, что все изоформы PNF10 включаются в комплекс. Изоформы PNF10D структурно сильно отличаются от PNF10A (рис. 1, б), у PNF10D отсутствует DPF-домен, участвующий во взаимодействии с гистонами. Изоформы также отличаются паттернами фосфорилирования, что указывает на их различную регуляцию. Ранее нами и другими исследователями было установлено, что длинная DPF-содержащая изоформа PNF10A необходима для пролиферации клеток [4, 5, 15]. В частности, комплекс PBAF, содержащий PNF10A, является коактиватором транскрипционного фактора MYC, который необходим для активации генов S-фазы и прогрессии клеточного цикла [11]. Возможно, комплекс PBAF, включающий PNF10A-изоформу, также является коактиватором YAP/TAZ транскрипционных факторов. Было по-

казано, что функция коротких PHF10D-изоформ может связана с дифференцировкой нейрональных и миелоидных клеток и понижение ее уровня ведет в этих клетках к понижению транскрипции генов участвующих в дифференцировке [6, 7]. Учитывая результаты данной работы, можно предположить, что в ряде клеток PHF10D может также отвечать за установлением межклеточных контактов. Включение PHF10D-изоформы в состав PBAF-комплекса позволяет ему связываться с хроматином генов, активно транскрибирующихся в конечно-дифференцированных непролиферирующих клетках, устанавливающих большое количество контактов с соседними клетками.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-14-00258) и грантом № CRP/22/014.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chen K., Yuan J., Sia Y., Chen Z.* Mechanism of action of the SWI/SNF family complexes // *Nucleus*. 2023. V. 14.
2. *Local A., Huang H., Albuquerque C. P., Singh N., Lee A. Y., Wang W., Wang C., Hsia J. E., Shiau A. K., Ge K., Corbett K. D., Wang D., Zhou H., Ren B.* Identification of H3K4me1-associated proteins at mammalian enhancers // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. P. 73–82.
3. *Chugunov A. O., Potapova N. A., Klimenko N. S., Tatarskiy V. V., Georgieva S. G., Soshnikova N. V.* Conserved Structure and Evolution of DPF Domain of PHF10-The Specific Subunit of PBAF Chromatin Remodeling Complex // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22.
4. *Brechalov A. V., Georgieva S. G., Soshnikova N. V.* Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. P. 1970–1979.
5. *Lessard J., Wu J. I., Ranish J. A., Wan M., Winslow M. M., Staahl B. T., Wu H., Aebersold R., Graef I. A., Crabtree G. R.* An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // *Neuron*. 2007. V. 55. P. 201–215.
6. *Viryasova G. M., Tatarskiy Jr V. V., Sheynov A. A., Tatarskiy E. V., Sud'ina G. F., Georgieva S. G., Soshnikova N. V.* PBAF lacking PHD domains maintains transcription in human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2019. V. 1866. P. 118525.
7. *Soshnikova N. V., Azieva A. M., Klimenko N., Khamidullina A. I., Feoktistov A. V., Sheynov A. A., Brechalov A. V., Tatarskiy V. V., Georgieva S. G.* A novel chromatin-remodeling complex variant, dcPBAF, is involved in maintaining transcription in differentiated neurons // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1271598.
8. *Eagle H., Levine E. M.* Growth regulatory effects of cellular interaction // *Nature*. 1967. V. 213. P. 1102–1106.
9. *McClatchey A. I., Yap A. S.* Contact inhibition (of proliferation) redux // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. P. 685–694.
10. *Fan Y., Meyer T.* Molecular control of cell density-mediated exit to quiescence // *Cell Rep.* 2021. V. 36. P. 109436.
11. *Benaud C. M., Dickson R. B.* Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc // *Oncogene*. 2001. V. 20. P. 4554–4567.
12. *Gumbiner B. M., Kim N.-G.* The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. P. 709–717.
13. *Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giullitti S., Michielin F., Elyassore N., Dupont S., Piccolo S.* A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. 2013. V. 154. P. 1047–1059.
14. *Zeng Q., Hong W.* The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals // *Cancer Cell*. 2008. V. 13. P. 188–192.
15. *Banga S. S., Peng L., Dasgupta T., Palejwala V., Ozer H. L.* PHF10 is required for cell proliferation in normal and SV40-immortalized human fibroblast cells // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 126. P. 227–242.

CONTACT INHIBITION OF PROLIFERATION IS ACCOMPANIED BY EXPRESSION OF THE PHF10D SUBUNIT OF THE CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF IN MOUSE AND HUMAN CELL LINES

Yu. P. Simonov^a, V. V. Tatarskiy^b, academician of the RAS S. G. Georgieva^a, N. V. Soshnikova^{a,c,#}

*^aDepartment of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^bInstitute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

*^cCenter for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]E-mail: so2615nat@gmail.com

PHF10 is a subunit of the PBAF complex, which regulates the expression of many genes in developing and maturing organisms. PHF10 has four isoforms that differ in domain structure. The PHF10A isoform, containing a DPF domain at the C-terminus and 46 amino acids at the N-terminus, is necessary for the expression of gene proliferation; the functions of the other isoforms are less studied. In this work, we have established that upon contact inhibition of mouse and human cell proliferation caused by the establishment of a tight junction and adherence junction between cells, the expression of the PHF10A isoform stops and instead the PHF10D isoform is expressed, which does not contain DPF-domain and N-terminal sequence. The function of the PHF10D isoform may be associated with the establishment of intercellular contacts.

Keywords: Gene expression, contact inhibition, chromatin remodeling, PBAF complex, PHF10 isoforms

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
ПИ № ФС77-77141 от 6 ноября 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 00.00.2024 г.

Формат 60 × 88¹/₈

Усл. печ. л. 00.00

Уч.-изд. л. 00.0

Тираж 00 экз.

Зак. 0000

Бесплатно

Учредитель: Российская академия наук

Издатель: Российская академия наук, 119991 Москва, Ленинский просп., 14

Исполнитель ФГБУ «Издательство «Наука»: 121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

Отпечатано в ФГБУ «Издательство «Наука»: 121099, г. Москва, Шубинский пер., д. 6, стр. 1.

16+

Журналы РАН, выходящие в свет на русском языке

Автоматика и телемеханика
 Агрохимия
 Азия и Африка сегодня
 Акустический журнал
 Астрономический вестник. Исследования солнечной системы
 Астрономический журнал
 Биологические мембраны
 Биология внутренних вод
 Биология моря
 Биоорганическая химия
 Биофизика
 Биохимия
 Ботанический журнал
 Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук
 Вестник древней истории
 Вестник Российской академии наук
 Вестник российской сельскохозяйственной науки
 Водные ресурсы
 Вопросы истории естествознания и техники
 Вопросы ихтиологии
 Вопросы языкознания
 Вулканология и сейсмология
 Высокомолекулярные соединения. Серия А
 Высокомолекулярные соединения. Серия Б
 Высокомолекулярные соединения. Серия С
 Генетика
 Геология рудных месторождений
 Геомагнетизм и аэрономия
 Геоморфология и палеогеография
 Геотектоника
 Геохимия
 Геоэкология. Инженерная геология. Гидрогеология. Геокриология
 Государство и право
 Дефектоскопия
 Дифференциальные уравнения
 Доклады Российской академии наук. Математика, информатика, процессы управления
 Доклады Российской академии наук. Науки о жизни
 Доклады Российской академии наук. Науки о Земле
 Доклады Российской академии наук. Физика, технические науки
 Доклады Российской академии наук. Химия, науки о материалах
 Журнал аналитической химии
 Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова
 Журнал вычислительной математики и математической физики
 Журнал неорганической химии
 Журнал общей биологии
 Журнал общей химии
 Журнал органической химии
 Журнал прикладной химии
 Журнал физической химии
 Журнал эволюционной биохимии и физиологии
 Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Записки Российского минералогического общества
 Зоологический журнал
 Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа
 Известия Российской академии наук. Механика твердого тела
 Известия Российской академии наук. Серия биологическая
 Известия Российской академии наук. Серия географическая
 Известия Российской академии наук. Серия литературы и языка
 Известия Российской академии наук. Серия физическая
 Известия Российской академии наук. Теория и системы управления
 Известия Российской академии наук. Физика атмосферы и океана
 Известия Российской академии наук. Энергетика
 Известия Русского географического общества
 Исследование Земли из Космоса
 Кинетика и катализ
 Коллоидный журнал
 Координационная химия
 Космические исследования
 Кристаллография
 Латинская Америка
 Лёд и Снег
 Лесоведение
 Литология и полезные ископаемые
 Мембраны и мембранные технологии
 Металлы
 Микология и фитопатология
 Микробиология
 Микроэлектроника
 Молекулярная биология
 Нейрохимия
 Неорганические материалы
 Нефтехимия
 Новая и новейшая история
 Общественные науки и современность
 Общество и экономика
 Океанология
 Онтогенез
 Палеонтологический журнал
 Паразитология
 Петрология
 Письма в Астрономический журнал
 Письма в Журнал экспериментальной и теоретической физики
 Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования
 Почвоведение
 Приборы и техника эксперимента
 Прикладная биохимия и микробиология
 Прикладная математика и механика
 Проблемы Дальнего Востока
 Проблемы машиностроения и надежности машин
 Проблемы передачи информации
 Программирование
 Психологический журнал
 Радиационная биология. Радиоэкология
 Радиотехника и электроника
 Радиохимия
 Расплавы
 Растительные ресурсы
 Российская археология
 Российская история
 Российская сельскохозяйственная наука
 Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова
 Русская литература
 Русская речь
 Сенсорные системы
 Славяноведение
 Современная Европа
 Социологические исследования
 Стратиграфия. Геологическая корреляция
 США и Канада: экономика, политика, культура
 Теоретические основы химической технологии
 Теплофизика высоких температур
 Успехи современной биологии
 Успехи физиологических наук
 Физика Земли
 Физика и химия стекла
 Физика металлов и металлловедение
 Физика плазмы
 Физикохимия поверхности и защита материалов
 Физиология растений
 Физиология человека
 Химическая физика
 Химия высоких энергий
 Химия твердого топлива
 Цитология
 Человек
 Экология
 Экономика и математические методы
 Электрохимия
 Энтомологическое обозрение
 Этнографическое обозрение
 Ядерная физика