

ISSN 0555-1099

Том 59, Номер 6

Ноябрь - Декабрь 2023



ПРИКЛАДНАЯ БИОХИМИЯ и МИКРОБИОЛОГИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 59, номер 6, 2023

Использование новых стратегий биоинформатики на этапе проектирования растений с редактированным геномом (обзор)	
И. В. Яковлева, А. М. Камионская	525
Механизмы формирования и персистенции продукции IgE и потенциальные инновационные средства терапии аллергопатологий (обзор)	
Д. Б. Чудаков, М. В. Коновалова, М. А. Стрельцова, О. А. Шустова, А. А. Генералов, Г. В. Фаттахова	538
Метакрилатные редокс системы анаэробных бактерий	
О. В. Архипова	551
Влияние Nε-ацетилирования на ферментативную активность глициральдегид-3-фосфатдегидрогеназы <i>Escherichia coli</i>	
Н. С. Плеханова, И. Б. Альтман, М. С. Юркова, А. Н. Федоров	564
Оптимизация аэробного синтеза янтарной кислоты из глюкозы рекомбинантными штаммами <i>Escherichia coli</i> по варианту цикла трикарбоновых кислот, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы	
А. Ю. Скороходова, А. Ю. Гулевич, В. Г. Дебабов	573
Конъюгационная система доставки векторов для молекулярного клонирования в клетки бактерий рода <i>Bacillus</i>	
А. С. Гуринович, И. А. Федюшко, М. А. Титок	581
Характеристика штаммов группы <i>Bacillus cereus</i> complex, выделенных из вечной мерзлоты в Якутии, для оценки микробиологических рисков при изменении климата	
Ю. О. Гончарова, В. В. Евсеева, Р. И. Миронова, К. В. Хлопова, А. Г. Богун, А. А. Сизова, В. И. Соломенцев, Г. М. Титарева, И. В. Бахтеева, Т. Б. Кравченко, А. В. Брушков, В. С. Тимофеев, С. Г. Игнатов	589
Использование метаболически инертных клеток <i>Mycobacterium abscessus</i> для изучения эффективности лекарственных препаратов	
Б. А. Мартини, Е. Г. Салина	599
Создание продуцента рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 <i>Trametes hirsuta</i> в <i>Penicillium canescens</i>	
О. С. Савинова, А. М. Чулкин, К. В. Моисеенко, Т. В. Федорова	605
Новый Ni ²⁺ -аффинный вариант eGFP со свободными C- и N-концами	
А. Г. Тарабарова, М. С. Юркова, А. Н. Федоров	614
Микробиологическое 1,2-дегидрирование 11-трифторацетата 6α-метилгидрокортизона	
Т. С. Савинова, А. Ю. Аринбасарова, А. В. Казанцев, О. С. Савинова, Н. В. Лукашёв	622
Памяти Лены Ивановны Воробьёвой (1.06.1931–22.06.2023)	631

CONTENTS

Vol. 59, No. 6, 2023

Using New Bioinformatics Strategies at the Design Stage of Genome-edited Plants <i>I. V. Yakovleva, A. M. Kamionskaya</i>	525
Mechanisms of Formation and Persistence of Ige Products and Potential Innovative Means of Therapy for Allergic Pathologies <i>D. B. Chudakov, M. V. Kononova, M. A. Streltsova, O. A. Shustova, A. A. Generalov, and G. V. Fattakhova</i>	538
Methacrylate Redox Systems of Anaerobic Bacteria <i>O. V. Arkhipova</i>	551
Effect of Nε-acetylation on the Enzymatic Activity of <i>Escherichia Coli</i> Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase <i>N. S. Plekhanova, I. B. Altman, M. S. Yurkova, and A. N. Fedorov</i>	564
Optimization of Aerobic Synthesis of Succinic Acid from Glucose by Recombinant <i>Escherichia Coli</i> Strains Through the Variant Tricarboxylic Acid Cycle Mediated by the Action of 2-ketoglutarate-decarboxylase <i>A. Yu. Skorokhodova, A. Yu. Gulevich, and V. G. Debabov</i>	573
Conjugation Vector Delivery System for Molecular Cloning into Cells of Bacteria of the Genus <i>Bacillus</i> <i>A. S. Gurinovich, I. A. Fedyushko, and M. A. Titok</i>	581
Characteristics of <i>Bacillus cereus</i> complex Group Strains Isolated from Permafrost in Yakutia for Assessment of Microbiological Risks During Climate Change <i>Y. O. Goncharova, V. V. Evseeva, R. I. Mironova, K. V. Khlopova, A. G. Bogun, A. A. Sizova, V. I. Solomentsev, G. M. Titareva, I. V. Bahtejeva, T. B. Kravchenko, A. V. Brushkov, V. S. Timofeev, and S. G. Ignatov</i>	589
Use of Metabolic Inert <i>Mycobacterium abscessus</i> Cells to Study the Efficiency of Drugs <i>B. A. Martini and E. G. Salina</i>	599
The Obtaining of Recombinant Producer of <i>Trametes hirsuta</i> Versatile Peroxidase VP2 in <i>Penicillium canescens</i> <i>O. S. Savinova, A. M. Chulkin, K. V. Moiseenko, and T. V. Fedorova</i>	605
New eGFP Mutant with Intact C- and N-termini and Affinity for Ni^{2+} <i>A. G. Tarabarova, M. S. Yurkova, and A. N. Fedorov</i>	614
Microbial 1,2-dehydrogenation of 6 Alpha-methylhydrocortisone 11-trifluoroacetate <i>T. S. Savinova, A. Yu. Arinbasarova, A. V. Kazantsev, O. S. Savinova, and N. V. Lukashev</i>	622

УДК 577.21

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВЫХ СТРАТЕГИЙ БИОИНФОРМАТИКИ НА ЭТАПЕ ПРОЕКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМНОМ (ОБЗОР)

© 2023 г. И. В. Яковлева¹ *, А. М. Камионская¹

¹ Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина, Федеральное государственное учреждение
“Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук”, Москва, 117312 Россия

*e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Идентификация рисков, связанных с новыми сельскохозяйственными продуктами растительного происхождения, полученными технологией геномного редактирования, — важный компонент генной инженерии. Острая дискуссия продолжается во всем мире о сходстве и различиях между “старыми” рисками “классических” ГМО и “новыми”, связанными с геномным редактированием растений, отсутствием методов идентификации новых рисков и их оценки. В настоящей статье разрабатывается новый перспективный инструмент обеспечения биобезопасности — концепция “безопасного проектирования”, вводящая хорошо известные стандарты безопасности в биоинженерию растений. Суть этой стратегии состоит в проведении редизайна для последовательной минимизации или предотвращения рисков, а также нецелевых эффектов геномного редактирования на этапе концепта. Учитывая, что корреляция между предсказанными *in silico* и определенными экспериментально нецелевыми эффектами гРНК является основной проблемой, осложняющей применение системы CRISPR, большинство исследований сегодня сосредоточено на эффективности дизайна гРНК. Напротив, настоящая работа сфокусирована на биоинформатическом поиске и изучении потенциальных промоторов, рассматриваемых как источник потенциальных рисков в случае их нецелевого редактирования и соответствующего изменения транскрипционной активности. Эти стратегии представлены нами в виде схемы оценки рисков для целей регулирования новых генетических технологий.

Ключевые слова: геномное редактирование растений, оценка рисков, биобезопасность, биоинформатика, нецелевые эффекты

DOI: 10.31857/S0555109923060211, **EDN:** CYEAXH

Достижения в технологии геномного редактирования произвели революцию в геномной селекции растений [1]. В настоящее время во всем мире ведутся острые дискуссии [2–4] по сопоставлению сходств и различий “старых” рисков “классических” ГМ растений и “новых”, связанных с геномным редактированием, по принципиальной возможности использования существующих методов для выявления и оценки новых рисков, а также проблем, связанных с трансграничным перемещением новых сельскохозяйственных культур и растительных продуктов.

Поскольку стандарты, а также лабораторные и биоинформатические методы детекции результатов геномного редактирования растений не разработаны, остается ключевой вопрос: как можно идентифицировать, контролировать и маркировать отредактированные культуры на рынке?

В данном обзоре основное внимание уделяется следующим вопросам:

— анализ потенциальных рисков сельскохозяйственных культур, полученных геномным редактированием, с целенаправленной и нецелевой модификацией для того, чтобы установить существуют ли какие-либо критические риски растений с отредактированным геномом по сравнению с традиционными культурами;

— обсуждение частоты нецелевого редактирования при использовании технологии CRISPR/Cas в сопоставлении со спонтанным мутагенезом и классической селекцией с использованием химических и физических факторов воздействия;

— возможность использования нового биоинформатического метода — множественного выравнивания для сильно различающихся последовательностей (MAHDS, Multiple Alignment for Highly

Divergent Sequences) [5] для прогнозирования потенциальных промоторов и связанных с ними рисков. Учитывая, что корреляция между предсказанными *in silico* и определенными экспериментально нецелевыми эффектами гРНК является основной проблемой, осложняющей применение системы CRISPR, большинство исследований сегодня [6, 7] сосредоточено на эффективности дизайна гРНК. Напротив, настоящая работа сфокусирована на интеграции биоинформатического метода MANDS [5] в новую схему оценки рисков растений с отредактированным геномом. Разработка концепции “безопасного проектирования” для растений с отредактированным геномом — новый подход, который привносит в биоинженерию растений известные идеи “безопасности” и “стандартов безопасности”.

Представленная здесь новая методология и новые инструменты для оценки рисков продуктов геномного редактирования растительного происхождения могут быть использованы в разработке научной и методологической базы регулирования геномной инженерии.

МЕТОДОЛОГИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Был проведен обзор литературных источников, относящихся к сфере данной работы с использованием данных PubMed, Google Scholar, Web of Science и Elibrary. Поиск проводился на английском языке по следующим ключевым словам и сочетаниям: «растения с отредактированным геномом», «оценка рисков», «безопасное проектирование», «биобезопасность», «регулирование», «биоинформатика», «нецелевое редактирование», «контроль», а также с помощью “+”, “И” и “ИЛИ” для уточнения результата. Временной период 2018–2022 гг. был выбран, поскольку в работах Моджеевского с соавт. [8, 9] был ранее представлен анализ литературных источников за период 2000–2018 гг. Отбор статей (аннотации и/или полного текста) осуществлялся по критериям соответствия теме обзора:

- использование модельных растений или сельскохозяйственных культур;
- геномное редактирование растений, осуществленное с помощью CRISPR;
- геномное редактирование растения (SDN1 и SDN2), подтвержденное (точечная мутация, делеция или вставка);
- установленные нецелевые эффекты;
- оценка соотношения различных типов мутационного генома в растениях.

Почему оценка рисков имеет решающее значение? Пандемия COVID-19 заставила страны усилить свои позиции по целостности национальных и глобальных систем биобезопасности [10], идентификации рисков и определении границ их до-

пустимости, установлении правил трансграничной передачи. Форсированная пандемией была запущена глобальная инициатива “Единая биобезопасность” (One Biosecurity) [11], представляющая собой междисциплинарный подход к политике и исследованиям в области биобезопасности, основанный на взаимосвязи между здоровьем человека, животных и растений для эффективного предотвращения и смягчения воздействия междисциплинарных рисков, которые выходят за привычные границы здравоохранения, сельского хозяйства и окружающей среды. Целесообразно сменить действующую парадигму предотвращения рисков с помощью пограничных проверок и карантинных мер на оценку рисков, выходящую за секторальные и национальные границы и оценивающую глобальный риск, установить международные правила глобальной биобезопасности и биозащиты.

Отсутствие методов выявления продукции растительного происхождения, полученной геномным редактированием, и контроля за ее оборотом создает угрозу неконтролируемого оборота линий сельскохозяйственных культур с незадекларированными генетическими изменениями, особенно, для импортируемой продукции.

Разработка научных подходов к оценке биобезопасности новой сельскохозяйственной продукции растительного происхождения. По словам Генерального секретаря ООН А. Гутерриша, более 88 миллионов человек в мире страдали от сильного голода в 2020 г., что на 20% больше, чем в 2019 [12]. Перед лицом указанных тенденций, а также резко возросшего мирового спроса на продукты питания и топливо, вызванных сегодня экономическим кризисом, геномное редактирование сельскохозяйственных культур открывает огромные возможности для повышения их урожайности [13–15].

Для продукции генетических технологий базовым элементом, определяющим безопасность конечной продукции, являются научно-обоснованные риски [16, 17]. В соответствии с устоявшимся определением Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) “научно обоснованный риск — это потенциально вредное воздействие, вызванное опасным событием (или рядом событий)” [18].

С научной точки зрения, следуя “принципу эквивалентности”, продукты с эквивалентными характеристиками должны обладать одинаковым уровнем рисков, связанным с внутренними характеристиками продукта, независимо от метода его получения. Однако признание факта, что генетическая модификация через трансгенез потенциально может представлять определенные риски, послужило основанием для введения специального регулирования, применяемого во всем мире к ГМ продуктам растительного происхожде-

ния, считающимися “новыми, неизвестными” [19–21]. Не изменило ситуацию и то, что сумма научных знаний (familiarity), накопленная за 25 лет широкомасштабных международных исследований рисков ГМО, делает ГМ растения не менее “известными”, чем продукция традиционных методов селекции.

Разработка подходов по дифференциации потенциальных рисков трансгенных организмов (ГМО) и организмов с направленными изменениями генома. Потенциальные риски и методология оценки рисков классических (трансгенных) ГМ растений неоднократно подробно описывались в различных международных документах, например, в Руководстве UNEP/CBD (Программа Организации Объединенных Наций по окружающей среде/Конвенция о биологическом разнообразии) по оценке рисков живых модифицированных организмов [22], многотомном руководстве Института Эдмондса (Вашингтон, США) [23], Директиве ЕС № 2001/18/ЕС [24], стандарте Персидского залива – GSO 2141:2011 [25], а также в национальных правовых актах, например, в российской “Методике производства экспертиз (исследований) биологической безопасности генно-инженерно-модифицированных растений для выращивания (выпуска в окружающую среду) на территории Российской Федерации” [26]. Для дальнейшего анализа воспользуемся новейшими определениями, введенными в связи с появлением новой технологии – геномного редактирования рядом стран: США [27], Аргентина [28], Япония [29–31]. Примером обновления понятийного аппарата генной инженерии может послужить и проект российского Федерального закона № 134176-8 “О внесении изменений в Федеральный закон “О государственном регулировании в сфере генно-инженерной деятельности” (2022 г.) [32]. Ключевым моментом новых международных определений является концепция дифференциации “трансгенных” организмов и “организмов с направленными геномными изменениями – организмов с редактированным геномом”.

Не претендуя на исчерпывающие определения, можно достаточно обоснованно разделить получаемые генной инженерией растения на различающиеся группы объектов:

- трансгенный организм – это растение, генотип которого был изменен методами генной инженерии и которое содержит вставки рекомбинантных ДНК (или РНК);

- редактированный организм – растение, генотип которого был изменен при помощи методов генной инженерии и в котором не содержатся вставки рекомбинантных ДНК (или РНК), или содержатся вставки, идентичные последовательностям, встречающимся в естественном генофонде этого растения.

Трансгенные линии растений, независимо от используемой технологии получения, однозначно подпадают под установленную действующую регуляторную сферу ГМО. Однако приведенная дифференциация ставит вопрос о неприменимости действующих нормативных положений и методик, касающихся оценки рисков, к растениям с редактированным геномом, так как краеугольным камнем в действующих руководствах является вставка рекомбинантных ДНК (или РНК). Очевидно, что требуется серьезный пересмотр схемы принятия решений в отношении регулирования или дерегулирования редактированных линий растений и изменение инструментальной базы для оценки связанных с ними потенциальных рисков [28].

Логично предположить, что в соответствии с определением, редактированные линии растений будут содержать генно-инженерный материал, идентичный последовательностям, встречающимся в естественном генофонде. Можно согласиться, что удаление или замена одной пары оснований – это результат, который можно получить и с помощью традиционной селекции [33, 34]. Правомерным кажется и предположение, что любые риски, связанные с такими редактированными растениями, будут аналогичными, равными или даже меньшими, чем риски, связанные с культурами, полученными известными методами селекции, или уже коммерциализованными продуктами [35].

Система CRISPR/Cas [36] – высокоэффективный и достаточно точный инструмент геномного редактирования растений, однако установлено, что редактирование сопровождается и нежелательными нецелевыми эффектами (off-targets). Необходимо оценить: реализуются ли случаи, когда off-targets вызывают потенциальные риски, критические для биобезопасности.

Результаты анализа литературных данных. На основе разработанных критериев было отобрано, в целом, 137 статей. В большинстве статей (77) для разработки направляющей гРНК и прогнозирования потенциальных нецелевых сайтов редактирования использовались стандартные инструменты биоинформатики, такие как CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) и Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>). Ряд авторов использовали альтернативные методы с инструментами поиска локального выравнивания (BLAST) для прогнозирования потенциальных нецелевых сайтов. Анализ показал, что только 20% статей (28) описывают нецелевые эффекты геномного редактирования, причем потенциальные нецелевые сайты, предсказанные *in silico*, были проанализированы после редактирования методом глубокого секвенирования (NGS, next generation sequencing).

Большинство описанных в источниках нецелевых эффектов геномного редактирования представляли собой небольшие вставки или делеции (1–22 п.н.) или точечные нуклеотидные замены, тогда как крупные делеции (>100 п.н.) встречались редко [37].

Проведенный анализ также показал, что обнаруженные экспериментально нецелевые сайты геномного редактирования имели не более 3 несовпадений (1–3 п.н.) с целевым геном-мишенью и располагались, в основном, в белок-кодирующих областях, чаще в гомологах целевого гена.

Следует отметить, что в 92% отобранных статей предсказанные нецелевые сайты были амплифицированы методом ПЦР, а ампликоны проанализированы секвенированием и выравниванием с эталонными последовательностями. Только в 9 статьях приведены данные полногеномного секвенирования отредактированных линий растений (WGS, whole genome sequencing).

Рассмотрим далее источники нецелевого редактирования генома растений и сопряженные с ними потенциальные риски.

Метод доставки. Одним из источников потенциальных рисков для отредактированных растений является способ доставки. Доставка в клетки растений компонентов геномного редактирования осуществляется двумя основными методами: в составе вирусного вектора или биобаллистической трансформацией.

Нуклеаза Cas9 наиболее популярна для редактирования растений. Однако конструкции CRISPR (кассеты ДНК, экспрессирующие белок Cas и направляющая РНК) могут деградировать или случайно интегрироваться в неизвестные сайты в геноме растения, вызывая побочные эффекты — неспецифические изменения, тем самым повышая риски редактирования.

Покажем, что вероятность реализации этого потенциального риска мала, но последствия могут быть серьезными. В работе [38] авторы продемонстрировали, что в случае использования конструкции Cas9/sgRNA, в целевом гене *eIF4E* у трансформированных растений огурца поколения T1 наблюдались лишь небольшие делеции и однонуклеотидные полиморфизмы (SNP), а в предполагаемых нецелевых сайтах делеции не были обнаружены. При этом гомозиготное потомство T3 с отредактированным геном *eIF4E* продемонстрировало иммунитет к инфекции, вызываемой вирусом пожелтения жилок огурца (*Ipomovirus*), и устойчивость к потивирусам: вирусу желтой мозаики цуккини (ZYMV) и вирусу кольцевой пятнистости папайи (PRSV). В этом случае общий уровень риска можно оценить как низкий.

Напротив, исследование [39] показало, что при геномном редактировании гексаплоидных протопластов пшеницы, направленном на популярную

биологическую мишень EPSPS (5-енолпирувил-шикимат-3-фосфатсинтаза), крупные вставки (≥ 20 п.н.) последовательности, встроенной из ДНК вектора, обнаруживались с низкой частотой до 8.5% от общего числа инделей. Но последствия для отредактированной линии пшеницы могут быть очень серьезными, поскольку реализовалась SDN3 модификация, и линия может получить статус ГМО с соответствующим регулированием.

Успешный способ снизить нецелевые эффекты геномного редактирования — разработка репертуара Cas9 с высокой точностью и альтернативной (или ослабленной) специфичностью распознавания PAM (protospacer adjacent motif), в частности, с целью устранения требования NGG PAM (где N — любое основание). Например, в работе [40] был разработан новый вариант *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9), названный SpG, способный проявлять устойчивую активность с расширенным таргетингом — NGN PAM.

Противоположно, было показано [41], что в некоторых случаях риск нецелевого редактирования возрастает. Так, нуклеаза Cas12a осуществляла нецелевое редактирование в модельных экспериментах *in vivo* и создавала множественные двухцепочечные разрывы в рандомизированных сайтах с диапазоном несовпадений до 4 п.н. по сравнению с сайтом-мишенью.

Интересный пример успешного снижения нецелевых эффектов — использование мультиплексной системы CRISPR/Cas9 для одновременного нокаутирования генов *miR482b* и *miR482c* у томата с целью приобретения устойчивости к *Phytophthora infestans* [42]. Две из полученных отредактированных линий растений томата содержали нокаутированные гены *miR482b* и *miR482c*, а одна отредактированная линия — только *miR482b*. Однако у всех трех отредактированных линий томата симптомы фитофтороза были снижены по сравнению с аналогами дикого типа. Все три линии томатов, т.е. L1, L2 и L3, были изучены с целью поиска нецелевых эффектов, а три потенциальных нецелевых сайта (с высокой вероятностью нецелевых эффектов) — секвенированы *in silico*. Нецелевых изменений в предсказанных *in silico* сайтах обнаружено не было.

Однако следует отметить, что в данном исследовании, как и во многих других, для выявления нецелевых эффектов редактирования использовался широко распространенный, так называемый “предвзятый” подход, когда анализируется только целевой фрагмент, а систематическое исследование для выявления нецелевых эффектов в масштабах всего генома не проводится.

В плане снижения рисков весьма перспективно использование рибонуклеопротеинового комплекса (РНП) для прямой доставки CRISPR/Cas9 в протопласты, но на сегодня для растительных

объектов метод описан, в основном, для развития устойчивости к болезням сорта винограда Шардоне и сорта яблони Голден Делишес [43]. Редактированием гена MLO-7 была достигнута устойчивость к мучнистой росе у сортов винограда, и три гена: DIPM-1, DIPM-2 и DIPM-4 были редактированы у растений яблони для повышения устойчивости к бактериальному ожогу. Такой подход позволяет новым отредактированным сортам избегать регулирования по действующим в США правилам для ГМО. А в ряде стран: Аргентине, на Филиппинах, в Японии улучшенным отредактированным сортам яблок и винограда соответствует новый статус — “организм с отредактированным геномом”, что гарантирует упрощенное регулирование, отделенное от ГМО.

Во избежание регуляторных проблем и рисков, связанных с наличием трансгенов, введенные кассеты экспрессии для геномного редактирования растений могут быть удалены путем последующей генетической сегрегации. Например, в работе [44] предложен протокол для тонкой регуляции экспрессии генов на уровне трансляции у растений путем редактирования эндогенных открытых рамок считывания с использованием системы CRISPR/Cas9. С использованием этого метода, может быть легко получено поколение T0 без встроенного трансгена.

Однако метод генетической сегрегации имеет определенные ограничения, так как он не применим к культурам, размножаемым бесполом путем, таким, как картофель.

Направляющая РНК. Подбор направляющей РНК для уникальной последовательности в геноме растения обеспечивает высокую специфичность редактирования. Однако было показано, что комплекс Cas9-sgRNA способен взаимодействовать и с другими последовательностями нуклеотидов в геноме, обладающими высокой гомологичностью с последовательностью-мишенью [45].

Это второй серьезный источник нецелевых эффектов редактирования. Например, при изучении мутагенеза с помощью CRISPR/Cas9 на модельном растении *Nicotiana benthamiana* [46] было показано, что система CRISPR/Cas9 может быть не такой специфичной, как TALEN-индуцированный мутагенез, поскольку целевая последовательность sgRNA составляет всего 20 п.н. В общей сложности в геномной базе данных *N. benthamiana* (с использованием BLASTN) было идентифицировано 98 потенциальных нецелевых последовательностей, обладающих гомологией к сайту-мишени длиной в 20 п.н. Анализ 18 из идентифицированных сайтов-мишеней, имеющих 14–17 п.н., идентичных целевой последовательности, не представил доказательств нецелевого редактирования. Тогда как оставшиеся представляли собой нецелевые модификации.

В дальнейшем было показано, что для взаимодействия комплекса Cas9-sgRNA с геномной ДНК наиболее критична комплементарность первых 12 нуклеотидов, примыкающих к последовательности PAM, а несовпадения нецелевой последовательности с гРНК составляют 1–3 п.н.

В недавнем обзоре [47] было обнаружено, что нецелевые модификации наблюдались у 12 видов сельскохозяйственных культур, в том числе, большое число исследований (10 из 28) посвящено идентификации нецелевых эффектов геномного редактирования риса. Например, в случае трансформации риса (*Oryza sativa*) с помощью системы CRISPR/Cas9, опосредованной *Agrobacterium tumefaciens*, для одной направляющей гРНК были идентифицированы индели во множестве сайтов.

Как было показано, риск нецелевого редактирования возрастает со сложностью генома растений и наиболее вероятен в случае основных продовольственных культур: пшеницы, ячменя, кукурузы, обладающих большими и сложными геномами. Напротив, низкий уровень нецелевой активности нуклеазы Cas9 продемонстрирован для отредактированных линий растений томатов, винограда, цитрусовых и бананов, устойчивых к вирусам, грибам и бактериям [47, 48].

Частота нецелевых эффектов геномного редактирования. При рассмотрении частоты нецелевых эффектов, которые могут произойти в результате геномного редактирования сельскохозяйственных культур, важно проводить сравнение с частотой изменений генома, которые происходят у растений в естественных условиях. Независимо от источника генетических изменений мутация у высших растений может приводить к ошибкам, некоторые из которых могут вызывать прямые токсические эффекты, снижая синтез белка, разрушая клеточные мембраны, подавляя рост растений, приводя к слиянию хромосом или вызывая генетические изменения в популяции растений, которые могут быть переданы следующим поколениям. Растения постоянно подвергаются экологическому стрессу, в том числе действию ультрафиолетового излучения, озона и абиотических стрессов (засухи, затопления, загрязнения воздуха и почвы), которые могут вызывать целый ряд повреждений ДНК, в том числе одноцепочечные (SSB) и двухцепочечные разрывы (DSB) вследствие реакции на стресс [49]. DSB считаются одной из наиболее серьезных форм повреждения ДНК, поскольку они могут вызвать гибель клеток, потерю генетической информации или генотоксические эффекты, в случае, если не могут быть точно восстановлены. У высших растений DSB, в основном, восстанавливаются по механизму нехомологичного соединения концов. Для поддержания стабильности генома, фертильности и генетического

разнообразие в кодирующих регионах должны существовать точные механизмы репарации ДНК, а подверженная ошибкам репарация служит источником естественных мутационных вариаций, важных для эволюции растений и полезных для улучшения сельскохозяйственных культур [50]. В процессе селекции традиционно создавались мутации растений с использованием химических или физических факторов воздействия, случайным образом индуцируя DSB в геноме и редко получая желаемые фенотипы.

Например, было показано, что при радиационном облучении может быть достигнута частота мутаций от 6.63×10^{-3} на п.н. до 3×10^{-8} на п.н. [48]. С помощью радиационного мутагенеза было произведено более 3000 сортов сельскохозяйственных культур, которые используются во всем мире без нормативной оценки рисков (за исключением Канады) [51]. В соответствии с Базой данных ФАО/МАГАТЭ по мутантным сортам (<https://nucleus.iaea.org/sites/mvd>) на данный момент в мировом масштабе зарегистрировано 873 мутантных сорта риса, 307 сортов ячменя, 265 сортов пшеницы, 182 сорта сои и т.д.

С другой стороны, в полученной нами выборке литературных источников были выделены пять исследований [52–56], в которых проводилось полногеномное секвенирование растений с редактированным геномом, и результаты WGS отредактированных растений сравнивались с данными по спонтанным мутациям, а также с частотой мутаций, индуцированных нецелевым химическим мутагенезом или облучением. В качестве примера можно привести сравнение частоты спонтанных и химически индуцированных мутаций с частотой нецелевых эффектов геномного редактирования для модельного растения *Arabidopsis thaliana*.

В недавнем исследовании [53] частота спонтанных гаплоидных однонуклеотидных мутаций (SNM) для *Arabidopsis thaliana* (сравнение с эталоном “1001 геном”) составляла 6.95×10^{-9} на сайт на поколение (25 поколений). Частота вставок/делеций составляла 1.30×10^{-9} на сайт на поколение. Тогда как в случае ЭМС (этилметансульфонат)-индуцированной химической мутации арабидопсиса (экотип *Landsberg erecta*) было показано [57], что частота мутаций примерно на три порядка выше: 11×10^{-6} на сайт на поколение.

Что касается геномного редактирования *A. thaliana*, то среди 28 исследований, упомянутых ранее, только в двух сообщалось о нецелевых эффектах. В работе [52] авторы получили двойные мутанты, имеющие одну идентичную нецелевую вставку (с частотой мутаций по данным WGS, равной 9.8–97.3%), которая имела два несовпадения с геном-мишенью.

Таким образом, модификации генома с использованием CRISPR/Cas9 или других реаген-

тов геномного редактирования гораздо более сайт-специфичны, чем аналогичные модификации, получаемые с использованием традиционных в селекции растений подходов, а частота DSB, обнаруженных в нецелевых сайтах, вероятно, сопоставима или ниже, чем частота мутаций, индуцированных естественным путем [8, 9].

Риск геномного редактирования промоторов. Модуляция экспрессии генов — острая тема для онтогенеза растений, так как при модификации (или вставке) промоторных последовательностей возможно изменение профиля экспрессии любых генов в геноме растения, что может привести к изменениям в его развитии. Благодаря этому, культура может приобрести новые биологические свойства, которых не было запрограммировано в референсном геноме. Следовательно, мы можем рассматривать неспецифическое редактирование промоторных последовательностей как источник потенциальных рисков.

В то же время, Сонг с соавторами [58] исследовали прикладное значение SNP в промоторах для селекции сельскохозяйственных растений. При изучении накопления антоцианов в сортах зеленой капусты ими было показано, что SNP в положении 1118 (в геномной ДНК BoDFR1 длиной 1580 п.н.) влияет на уровень (высокий или низкий) экспрессии антоцианов. Следовательно, SNP в промоторной области может служить ПЦР-маркером в селекции, направленной на сохранение темно-зеленой окраски листьев во время сбора урожая независимо от времени года.

Этот пример показывает, что идентификация промоторных последовательностей в геноме эукариот с помощью компьютерных методов — важная задача биоинформатики. Однако проблема точного прогнозирования на сегодня не решена, так как даже самые лучшие алгоритмы могут предсказать один ложноположительный промотор на 103–104 основания ДНК. В результате невозможно отличить истинный промотор в геноме от ложных предсказаний.

Для обнаружения неспецифических (или скрытых) изменений в геноме растений нами разрабатывается “математический метод расчета множественного выравнивания для сильно различающихся последовательностей (MAHDS)” [59]. MAHDS позволяет строить статистически значимые выравнивания для нуклеотидных последовательностей, накопивших более 2.5 случайных замен (х) на один нуклеотид относительно друг друга, а именно в диапазоне от 2.4 до 4.4.

Оригинальные российские математические методы множественного выравнивания промоторных последовательностей позволяют осуществить расчет статистически значимых классов потенциальных промоторов и оценить затем их пересечения с потенциальными сайтами нецелевого редакти-

рования. Данные расчеты для генома риса находятся в стадии разработки [60, 61]. Например, в статье [62] проведено множественное выравнивание последовательностей промоторов генома риса (как модельного растительного генома), и найдено 37390 промоторов, предположительно неизвестных генов. Множественные выравнивания нуклеотидных последовательностей можно рассчитать на сайте <http://victoria.biengi.ac.ru/mahds/auth> (по состоянию на 07 июня 2023 г.).

Таким образом, данный метод — точный инструмент для выявления потенциальных промоторов неизвестных генов и прогнозирования возможных рисков.

КОНЦЕПЦИЯ БЕЗОПАСНОГО ПРОЕКТИРОВАНИЯ ДЛЯ РАСТЕНИЙ С РЕДАКТИРОВАННЫМ ГЕНОМ

Концепция безопасного проектирования (далее — **БП**) еще не получила широкого признания в биотехнологии, однако с 2009 г. она набирает популярность в синтетической биологии. Принципиальные позиции БП, которые делают этот подход применимым и перспективным для обеспечения безопасности продукции генетических технологий, в частности, геномного редактирования, следующие:

- БП устанавливает, что на стадии концепта определяются варианты дизайна для минимизации или предотвращения рисков, а затем они интегрируются в разработку;

- БП включает безопасность как цель и полезный признак конечного продукта;

- пассивное БП включает интегрирование в геном инструментов тестирования, контроля или самоуничтожения;

- БП направлено на безопасность продукта и связанных процессов на протяжении всего жизненного цикла: от фазы исследований и разработок (R&D) до производства, использования, переработки и утилизации.

Циклы проектирования в концепции БП повторяются, каждый раз достигая снижения неприемлемых рисков за счет использования различных стратегий.

Рассмотрим далее две стратегии, представляющие интерес для концепции БП в геномном редактировании растений.

Стратегия 1: разработка взаимосвязи генотип-фенотип для уменьшения нецелевых эффектов (off-targets). Реализация этого принципа происходит на начальной стадии разработки: стадии концепта.

Для реализации редактирования CRISPR/Cas9 используются инструменты биоинформатики с целью создания гидовой РНК с оптимизированной длиной последовательности и нуклеотидным

составом для высокоспецифичного распознавания сайта связывания в гене-мишени. В случаях, когда предполагается внесение вставок (технология SDN3), для обеспечения безопасности продукта допускается использование при проектировании только безопасных генетических элементов из списков GRAS (General Recognized as Safe, FDA) в США и QPS (Qualified Presumption of Safety, EFSA) в ЕС.

Однако анализ базы данных ЕС по культурам с редактированным геномом [64] обнаружил, что большинство отредактированных сельскохозяйственных растений — продукты технологии SDN1: рис, кукуруза, соя и пшеница. Садовые растения (томаты, яблони, ягодные культуры, папайя и др.), обладающие, например, устойчивостью к биотическому стрессу и болезням, также получены по технологии SDN1. Как уже было показано выше, частота нецелевых мутаций в этих случаях довольно низка.

Однако комплексный анализ рисков должен включать и иные факторы, например, изменение уровня нецелевых мутаций с течением времени.

Документально подтверждено [65], что с течением времени повышается эффективность редактирования генома с использованием CRISPR/Cas9 в культивируемых зародышах сои. Этот факт может указывать на продолжающуюся экспрессию Cas9 во время эмбрионального развития и роста растений, а также на возможность дозозависимого (концентрация × время) эффекта, способного увеличивать число нецелевых мутаций. Аналогичные исследования были проведены на соматических зародышах какао [66], когда технологией геномного редактирования было создано несколько стабильно трансформированных геномов соматических эмбрионов. После клонирования и секвенирования биоинформатически спрогнозированных нецелевых сайтов был задокументирован низкий уровень нецелевого редактирования. В то же время возникает вопрос, может ли продолжаться редактирование в случае стабильной интеграции sgRNA и Cas9? Существует вероятность, что анализ мутантного дерева какао, достигшего зрелости, продемонстрирует иной результат с точки зрения уровня нецелевых изменений и степени риска.

Интересной темой пассивного безопасного проектирования, пока еще слабо разработанной для растений, является тестирование генетических переключателей на стадии концепта, в частности для временной регуляции экспрессии. В настоящее время наиболее широко используемые химические переключатели относятся к группе гормонов, регулирующих рост и развитие растений, что позволяет точно управлять клеточными процессами [67]. Примером могут служить переключатели на основе Cas9-репрессора регуляторных гормональных жасмонат- и ауксин-зависимых сигнальных

путей, внедренные в арабидопсис (*Arabidopsis thaliana*). Этот инструмент, используемый для регуляции гормональных сигнальных путей, позволяет управлять стрессоустойчивостью и урожайностью сельскохозяйственных культур. Однако химические переключатели ограничены с точки зрения пространственно-временной активации системы из-за множества молекул-индукторов, диффузии и общих токсических эффектов.

Стратегия 2: разработка математических методов обнаружения искусственных перестроек в геноме растений. Подходы WGS дают возможность однозначно характеризовать результаты редактирования по всему геному. Однако в настоящее время качество и объем геномной информации для растений недостаточны, и существуют неопределенности в выявлении мутаций из-за однонуклеотидных вариаций (аллелей) и невозможности полной сопоставимости изучаемого генома и эталонного [5]. Локализация потенциальных нецелевых сайтов в кодирующих областях, интронах, промоторах, межгенных областях также очень важна, поскольку от этого зависит степень риска нежелательных последствий нецелевого редактирования. Необходимость выявления нецелевых эффектов редактирования генома привела к разработке методов обнаружения, которые ранее применялись к прокариотическим системам, но еще не были распространены на сельскохозяйственные культуры.

Недавняя сравнительная оценка биоинформатических моделей прогнозирования [6] показала, что для наборов данных различных организмов (человек, мышь, рыба данио) корреляция между предсказанной и фактической эффективностью гРНК сильно отличается. Одновременно было установлено, что на данный момент отсутствуют воспроизводимые правила дизайна гРНК для различных объектов редактирования.

Учитывая эти нерешенные проблемы, метод MANDS поиска неаннотированных потенциальных промоторов предоставляет новые возможности для разработки правил дизайна гРНК для растений. Во-первых, предсказанные потенциальные промоторы указывают на местонахождение и позволяют идентифицировать возможные гены. Во-вторых, если в предсказанных потенциальных промоторах обнаруживается непреднамеренная мутация (расположенная не ближе, чем 1000 п. н. upstream от известных генов), то она должна быть включена в процесс оценки рисков и принятия решения. Причина состоит в следующем: известно [68], что одиночные SNP демонстрируют различную аффинность связывания факторов транскрипции с альтернативными аллелями, и нецелевые изменения в промоторных последовательностях могут иметь функциональные последствия, связанные с формированием фенотипа.

Потенциальное место безопасного проектирования в системе регулирования отредактированных растений. Обобщая предложенные стратегии БП для растений, получаемых геномным редактированием, рассмотрим их место в системе регулирования и контроля объектов растительного происхождения. Предлагаемый подход БП может быть включен как дополнительная инструментальная оценка безопасности (на стадии проектирования и НИОКР) в действующую систему регистрации растений, полученных традиционной селекцией. В табл. 1 приведены этапы и методы предварительной оценки рисков при разработке и подготовке регистрационного досье растений с отредактированным геномом.

На стадии концепта нового отредактированного растения (этап 1) стратегия БП предусматривает выполнение для генома эталонного растения следующих процедур *in silico*:

Шаг 1: поиск и идентификация потенциальных нецелевых сайтов (ПНС) редактирования стандартными методами BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Cas-OFFinder (<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>), или CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>) или другими. Анализ выявленных ПНС, принимая во внимание их локализацию: в кодирующих областях, интронах, промоторах, межгенных участках, так как от этого зависит степень риска возникновения нежелательных последствий нецелевого редактирования;

Шаг 2: прогнозирование потенциальных промоторных последовательностей (ПП) с помощью нового вычислительного метода (MANDS);

Шаг 3: выявление пересечений потенциальных промоторных последовательностей и потенциальных нецелевых сайтов. В случае если потенциальные нецелевые мутации попадают в область потенциальных промоторов, предсказанных MANDS, прогнозируемый риск отредактированного растения может быть высоким;

Шаг 4: редизайн с целью снижения потенциальных рисков. Итерации дизайна гРНК и выбор Cas для снижения рисков.

В то же время следует учитывать, что безопасность является общественной ценностью, и восприятие биобезопасности может различаться у разных заинтересованных сторон. Имеются в виду предварительные консультации разработчиков с регистрирующими органами и общественностью на этапе 1 с целью доказательства реализуемости концепта. Такой подход применяется на практике, например, в Аргентине [28]. Концепция БП допускает участие различных экспертов и заинтересованных сторон в каждом редизайне, выявлении рисков и определении факторов, необходимых для обеспечения безопасности.

Таблица 1. Схема оценки рисков для растений с редактированным геномом

Этап	Риски	Стратегии	Методы /подходы	План испытаний
Этап 1. Разработка концепции и дизайна редактированного растения.	Потенциальные теоретические риски геномного редактирования	Дизайн и конструирование гРНК для снижения нецелевых эффектов. Выбор Cas белка: нативные Cas9, Cas12a, Cas13 или их мутантные формы. Тип редактирования: нокаут ген, точечные мутации, делеции, инсерции, др.	Биоинформатика. Использование официально рекомендованных безопасных организмов. Транскриптомика. Протеомика. Метабономика.	Шаг 1. Предсказание потенциальных нецелевых сайтов (ПНС) с использованием стандартных методов BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), Cas-OFFinder (http://www.genome.net/cas-offinder/), CRISPR-P 2.0 (http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2)
			Математический метод MANDS	Шаг 2. Предсказание потенциальных промоторов (ПП) неизвестных генов, идентификация регуляторных последовательностей.
			Биоинформатика	Шаг 3. Анализ пересечений ПП и ПНС.
				Шаг 4. Итерации дизайна гРНК и выбор Cas для снижения рисков.
Доказательство реализуемости концепта	Регуляторные, этические, социальные риски	Консультации с регуляторами, специалистами и широкой общественностью	Консультации	Предварительная заявка. Рабочие совещания с селекционерами, регуляторами, производителями, молекулярными биологами, специалистами по этике и праву, представителями общественности.
	Геномное редактирование	Нецелевые эффекты. Редактирование промоторов.	Экспериментальная оценка нецелевых эффектов.	ПЦР, ПЦР-РВ, NGS, WGS Анализ и идентификация нежелательных мутаций в ПНС. Шаг 1. Амплификация, секвенирование (NGS) и анализ области длиной 250–300 п.н., центрированной относительно разрыва. Результаты позволят анализировать вставки или замену оснований в месте разрыва, вставку ДНК в ПНС и мутации в результате репарации. Шаг 2. WGS геномов исходного и отредактированного растений.
	Регенерация растения	Нежелательные последствия редактирования нецелевых сайтов.	Экспериментальная оценка рисков поколения T0.	Экспериментальное исследование взаимосвязи генотип-фенотип в поколениях T0.
	Размножение	Желательный / нежелательный фенотип. Наследуемость.	Оценка поколения T0, наследуемости.	Экспериментальное исследование желательного/нежелательного фенотипа растения.

На этапе 2, когда растение с отредактированным геномом уже получено, стратегией БП предлагается, как более быстрый и экономичный вариант, проведение экспериментального анализа предсказанных потенциальных нецелевых сайтов. Принятие решения может рассматривать и учитывать различные варианты.

Первый случай, когда нецелевые изменения в ПНС не выявлены, это позволяет перейти к дальнейшим лабораторным исследованиям соответствия внесенных редактированием целевых изменений генома растения его фенотипу.

Во втором случае, при обнаружении в ПНС нецелевых изменений, можно рекомендовать следующий этап: проведение WGS исходного и отредактированного геномов растения и их сравнительный анализ с поиском положения внесенных делеций, вставок или больших хромосомных перестроек. В зависимости от полученных данных может проводиться оценка рисков и принятие решения о биобезопасности отредактированной культуры.

Редактированные растения, получившие оценку “низкий риск”, потенциально могут проходить процедуры регистрации по аналогии с традиционными сортами. Например, в России за государственную регистрацию и регистрационные испытания нового сорта или гибрида, отвечает Государственная комиссия по испытанию и охране селекционных достижений (ФГБУ “Госсорткомиссия”, Россия). В случае пищевого применения культуры проводятся дополнительные испытания и регистрация в соответствии с Техническим регламентом Таможенного союза 021/2011 “О безопасности пищевых продуктов”. В комплекс исследований для растений, полученных традиционной селекцией, входят: токсичность, аллергенность, нутриентный состав, пищевая ценность и др. в зависимости от категории продукта (детское питание, функциональное питание, продукты питания и др.). Несомненно, что в каждой стране есть свои нормативные требования к традиционным сортам и продуктам питания.

Следует отметить, что, в целом, в разных странах модели правового регулирования и подходы к контролю безопасности использования растений с отредактированным геномом существенно различаются. Бразилия и Аргентина стали пионерами биотехнологических инноваций, выведя отредактированные растения из-под ограничительного регулирования. В Аргентине, в соответствии с законодательством, регистрация, контроль и надзор в области геномных технологий осуществляется на основе риск-ориентированного подхода, разработанного с учетом научно-технических критериев, прежде всего наличия новой комбинации генетического материала в растении [28]. Несомненно, 2022 г. был плодотворным для выпуска

новых правил для отредактированных растений. Так, новые Филиппинские правила [69] предусматривают процесс дифференциации регулирования растений с отредактированным геномом от ГМО. Эти правила гласят, что продукты, в которых отсутствует новая комбинация генетического материала, будут соответствовать по нормативно-правовому статусу традиционной продукции. Индия [70] объявила об освобождении отредактированных растений, не несущих чужеродных генов, от обязательной обработки как ГМО. ЕС длительное время занимал противоположную позицию, но 5 июля 2023 г. Европейская комиссия внесла “Предложение о Регламенте для растений, полученных с помощью некоторых новых геномных технологий (NGT), и пищевых продуктах и кормах из них, а также о внесении поправок в Регламент (ЕС) 2017/625” [71]. Впервые в ЕС вводится новый термин — “Растение *NGT*”, который означает “генетически модифицированное растение, полученное путем направленного мутагенеза, цисгенеза, интрагенеза или их комбинации, при условии, что растение *NGT* не содержит какого-либо генетического материала, выходящего за пределы генофонда селекционеров, и который мог быть временно вставлен при разработке”. В рамках этого определения “растения *NGT категории 1*” считаются эквивалентными растениям, выведенным традиционным путем, и больше не потребуют предварительной оценки рисков на индивидуальной основе.

В России система регулирования вступает в новый этап: реформирование концепции российского законодательства в сторону регулирования, ориентированного не на процесс — генную инженерию, а на безопасность “продукта” генетических технологий (продукт-ориентированное регулирование) [72].

Австралия в 2021 г. обновила свой Закон о генных технологиях 2000 г., однако концепция процесс-ориентированного подхода была сохранена: “метод, используемый для модификации организма — центральный для определения того, является ли организм ГМО” [73]. В то же время “Регулятор генных технологий” (OGTR) исключает растения с модификацией типа SDN-1 из регулирования ГМО, в то время как организмы с модификацией SDN-2 и SDN-3 относит к ГМО. Австралийские правила не принимают во внимание число нуклеотидных замен, вставок, делеций, а также возможность обнаружения полученной нуклеотидной последовательности у совместимых видов.

Законодательство некоторых стран не так чувствительно к научно-техническим прорывам. Хороший пример — Канада, где используется модель оценки безопасности продукции независимо от способа получения, и также независимо разработа-

тываются критерии оценки безопасности любого нового продукта, поступающего на рынок. В новом канадском руководстве от 18 мая 2022 г. [74] установлено, что к редактированным культурам следует относиться как к традиционным культурам (т.е., без проведения предварительной оценки безопасности, применяемой к ГМ растениям) в тех случаях, когда пищевой продукт на их основе не является новым продуктом питания.

Технология геномного редактирования продолжает развиваться, и сегодня с ее помощью можно эффективно получать желаемые изменения генома, ведущие к получению новых видов и сортов растений. Данный обзор показал, что нецелевые эффекты, связанные с технологией геномного редактирования, не являются критическими, их можно выявить и минимизировать за счет улучшения таргетинга и методологий безопасного проектирования.

Разработанные стратегии безопасного проектирования с использованием нового инструмента биоинформатики (MAHDS) применимы в качестве биоинформатической поддержки принятия решений о редизайне на стадии концепта редактированного растения и достижения оптимального баланса риск-желаемый фенотип. Этот подход будет в перспективе способствовать ограничению процедур по оценке рисков и сосредоточению процесса принятия решений на биоинформатическом анализе, WGS и молекулярной характеристике продуктов геномной инженерии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhu Y. // Biomed Res. Int. 2022. 2022:9978571. <https://doi.org/10.1155/2022/9978571>
2. Eriksson D., Custers R., Edvardsson Björnberg K., Hansson S.O., Purnhagen K., Qaim M. et al. // Trends Biotechnol. 2020. V. 38. P. 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.12.002>
3. Parrott W. // Physiol Plant. 2018. V. 164. № 4. P. 406–411. <https://doi.org/10.1111/ppl.12756>
4. Yunzhen L., Wenhao Y. // Sci. China Life Sci. 2020. V. 63. № 9. P. 1406–1409. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1693-4>
5. Korotkov E.V., Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M. // Appl. Biochem. Microbiol. 2021b). V. 57. № 2. P. 271–279. <https://doi.org/10.1134/S000368382102006X>
6. Konstantakos V., Nentidis A., Krithara A., Paliouras G. // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50. № 7. P. 3616–3637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac192>
7. Yan J., Chuai G., Zhou C., Zhu Ch., Yang J., Zhang Ch., Gu F., Xu H., et al. // Brief. Bioinformatics. 2018. V. 19. P. 721–724. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx001>
8. Modrzejewski D., Hartung F., Sprink T., Krause D., Kohl Ch., Wilhelm R. // Environ. Evid. 2019. V. 8. P. 27. <https://doi.org/10.1186/s13750-019-0171-5>
9. Modrzejewski D., Hartung F., Lehnert H., Sprink T., Kohl C., Keilwagen J., Wilhelm R. // Front Plant Sci. 2020. V. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.574959>
10. MacLeod A., Spence N. // Emerg. Top Life Sci. 2020. V. 4. № 5. P. 449–452. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200343>
11. Hulme Ph.E. // BioScience. 2021. V. 71. № 7. P. 708–721. <https://doi.org/10.1093/biosci/biab019>
12. UN News. <https://news.un.org/en/story/2021/03/1087032>
13. CAST 2022. Council for Agricultural Science and Technology. <https://www.cast-science.org>
14. Lassoued R., Macall D., Hessel H., Phillips P.W.B., Smyth S.J. // Transgenic Res. 2019. V. 28. P. 247–256. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00118-5>
15. Hua K., Zhang J., Botella J.R., Ma C., Kong F., Liu B., Zhu J.K. // Mol Plant. 2019. V. 12. № 8. P. 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.06.009>
16. Brende B. In The Global Risks Report 2020 World Economic Forum, Washington, USA, 2019, 15th Ed. Zeneva, Switzerland. P. 9–10.
17. Bogner A., Torgersen H. // Policy. Front Plant Sci. 2018. V. 9. P. 1884. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01884>
18. Hellstrom T. // Technol. Soc. 2009. V. 31. P. 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.techsoc.2009.06.002>
19. Dragavtsev V. Academician Dragavtsev's Protest Against the Presidium of the Russian Academy of Sciences "Give GMO Norms". <https://rossaprimavera.ru/article/04f0c499>
20. Fagan J., Antoniou M., Robinson Cl. // GMO Myths & Truths: A Citizen's Guide to the Evidence on the Safety and Efficacy of Genetically Modified Crops and Foods. Earth Open Source. 2020.
21. Chuchulina E.O. // Bulletin of Science. 2019. V. 4. № 6. P. 130–134.
22. CBD 2012. Guidance on Risk Assessment of Living Modified Organisms. Convention on Biological Diversity. UNEP/CBD/BS/COP-MOP/6/13/Add.1; 2012. <https://www.cbd.int/doc/meetings/bs/mop-06/official/mop-06-13-add1-en.pdf>
23. Guidelines for Assessing the Impact of Genetically Modified Organisms on the Environment and Health; In 2 Parts; 2005. Part 1. Introductory information, Accompanying Texts to Block Diagrams; ISEU: Moscow, Russia. 2005.
24. European Commission 2001. Directive 2001/18/EC of The European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32001L0018&from=EN>.
25. GSO 2141:2011. 2011 General Requirements for Genetically Modified Unprocessed Agricultural Products. <https://www.gso.org.sa/store/standards/GSO:563263/-GSO%202141:2011>.

26. Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation On Approval of the Methodology for the Production of Examinations (studies) of Biological Safety of Genetically Engineered Plants for Growing (release into the environment) on the Territory of the Russian Federation. 2020. <http://base.garant.ru/400229383/>.
27. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service 2020. Fed. Regist. 85: 29790. <https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2020-05-18/html/2020-10638.htm>.
28. Lema M.A. // J. Regul. Sci. 2021. V. 9. № 1. P. 1–15. <https://doi.org/10.21423/jrs-v09i1lema>
29. USDA_a 2019. MAFF Guidance for the Handling of Genome Edited Organisms under the Cartagena Act. — https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=MAFF%20Guidance%20for%20the%20Handling%20of%20Genome%20Edited%20Organisms%20under%20the%20Cartagena%20Act_Tokyo_Japan_11-15-2019.
30. USDA_b 2019. Final MAFF Guidelines for the Handling of Genome Edited Feed and Feed Additives. — https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Final%20MAFF%20Guidelines%20for%20the%20Handling%20of%20Genome%20Edited%20Feed%20and%20Feed%20Additives%20_Tokyo_Japan_03-22-2020.
31. USDA_c 2019. Japan Modifies Handling Procedures for Genome Edited Foods. <https://www.fas.usda.gov/data/japan-japan-modifies-handling-procedures-genome-edited-foods>.
32. Draft Federal Law № 134176-8. 2022. “On Amendments to the Federal Law “On State Regulation in the Sphere of Genetic Engineering Activities”. https://sozd.duma.gov.ru/bill/134176-8#bh_histtras.
33. Schiemann J., Robiński J., Schleissing S., Spök A., Sprink T., Wilhelm R.A. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 284. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00284>
34. Globus R., Qimrom U. // Cell Biochem. J. 2018. V. 119. № 2. P. 1291–1298. <https://doi.org/10.1002/jcb.26303>
35. Metje-Sprink J. // Front. Plant Sci. 2019. V. 9. P. 133–141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01957>
36. Ahmad N., Rahman M., Mukhtar Z., Zafar Y., Zhang B. // J Cell Physiol. 2020. V. 235. № 2. P. 666–682. <https://doi.org/10.1002/jcp.29052>
37. Sturme M.H.J., van Berg J.P., Bouwman L.M.S., De Schrijver A., de Maagd R.A., Kleter G.A., Battaglia-de Wilde E. // ACS Agric. Sci. Technol. 2022. V. 2. P. 192–201. <https://doi.org/10.1021/acsagascitech.1c00270>
38. Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M. et al. // Mol. Plant Pathol. 2016. V. 17. № 7. P. 1140–1153. <https://doi.org/10.1111/mpp.12375>
39. Arndell T., Sharma N., Langridge P., Baumann U., Watson-Haigh N.S., Whitford R. // BMC Biotechnol. 2019. V. 19. № 1. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0565-z>
40. Walton R.T., Christie K.A., Whittaker M.N., Kleinstiver B.P. // Science. 2020. V. 368. P. 290–296. <https://doi.org/10.1126/science.aba8853>
41. Murugan K., Seetharam A.S., Severin A.J., Sashital, D.G. // J. Biol. Chem. 2020. V. 295. № 17. P. 5538–5553. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012933>
42. Hong Y., Meng J., He X., Zhang Y., Liu Y., Zhang C., Qi. H., Luan Y. // Phytopathology. 2021. V. 11. № 6. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-20-0360-R>
43. Malnoy M., Viola R., Junget M.-H., Koo O.J., Kim S., Kim J.S. et al. // Front. Plant Sci. 2016. V. 7. P. 1904. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01904>
44. Si X., Zhang H., Wang Y., Chen K., Gao C. // Nat. Protoc. 2020. V. 15. P. 338–363. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0238-3>
45. Graham N., Patil G.B., Bubeck D.M., Dobert R.C., Glenn K.C., Gutsche A.T. et al. // Plant Physiol. 2020. V. 183. № 40. P. 1453–1471. <https://doi.org/10.1104/pp.19.01194>
46. Hahn F., Nekrasov V. // Plant Cell Rep. 2019. V. 38. № 4. P. 437–441. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2355-9>
47. Ahmad Sh., Wei X., Sheng Zh., Hu P., Tang Sh. // Brief Funct. Genomics. 2020. V. 19. № 01. P. 26–39. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elz041>
48. Faal G.P., Farsi M., Seifi A., Kakhki A.M. // Mol. Biol. Rep. 2020. V. 47. P. 3369–3376. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05409-3>
49. Waterworth W.M., Drury G.E., Bray C.M., Westet Ch.E. // New Phytol. 2011. V. 192. P. 805–822. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03926.x>
50. O’Conner S., Li L. // Front. Plant Sci. 2020. V. 11. P. 600117. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.600117>
51. Ellens K.W., Levac D., Pearson C., Savoie A., Strand N., Louter J., Tibelius C. // Transgenic Res. 2019. V. 28 (Suppl. 2). P. 165–168. <https://doi.org/10.1007/s11248-019-00153-2>
52. Xu W., Fu W., Zhu P., Li Z., Wang C., Wang C. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 17. P. 4125. <https://doi.org/10.3390/ijms20174125>
53. Weng M.L., Becker C., Hildebrandt J., Neumann M., Rutter M.T., Shaw R.G. et al. // Genetics. 2019. V. 211. № 2. P. 703–714. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301721>
54. Young J., Zastrow-Hayes G., Deschamps S. et al. // Sci. Rep. 2019. V. 9. P. 6729. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43141-6>
55. Tang X., Liu G., Zhou J., Ren Q., You Q., Tian L. et al. // Genome Biol. 2018. V. 19. P. 84. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1458-5>
56. Li J., Manghwar H., Sun L., Wang P., Wang G., Sheng H. et al. // Plant Biotechnol J. 2019. V. 17. № 5. P. 858–868. <https://doi.org/10.1111/pbi.13020>
57. Tsai H., Missirian V., Ngo K.J., Tran R.K., Chan S.R., Sundaresan V., Comai L. // Plant Physiol. 2013. V. 161. № 4. P. 1604–1614. <https://doi.org/10.1104/pp.112.213256>

58. Song H., Park J.-I., Hwang B.-H., Yi H., Kim H., Hur Y. // *Agronomy*. 2020. V. 10. № 4. P. 602. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040602>
59. Korotkov E.V., Suvorova Y.M., Nezhdanova A.V., Gaidukova S.E., Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M., Korotkova M.A. // *Symmetry*. 2021. V. 13. № 6. P. 917–937. <https://doi.org/10.3390/sym13060917>
60. Suvorova Y.M., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V. // *BMC Bioinform.* 2022. V. 22(1). P. 42. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-03977-0>
61. Korotkov E.V., Kamionskaya A.M., Suvorova Yu.M. // *Biotechnologiya*. 2020. V. 36. № 4. P. 15–20. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2020-36-4-15-20>
62. Korotkova M.A., Kamionskaya A.M., Korotkov E.V. In: *Proceedings of the J. Physics: Conference Series; The VI Int. Conference on Laser&Plasma Researches and Technologies; LaPlas, USA; Moscow, Russia 2020*. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1686/1/012031>
63. Salieri B., Barruetaña L., Rodríguez-Llopis I., Jacobsen N.R., Manier N., Trouiller B. et al. // *NanoImpact*. 2021. V. 23. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2021.100335>
64. EU-SAGE 2022. <https://www.eu-sage.eu/genome-search>
65. Wolt J.D. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 215–241. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts>
66. Fister A.S., Landherr L., Maximova S.N., Guiltinan M.J. // *Front Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 26. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00268>
67. Andres J., Blomeier T., Zurbriggen M.D. // *Plant Physiol.* 2019. V. 179. P. 862–884. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01362>
68. Hirsch C.D., Springer N.M. // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 2017. V. 1860. P. 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2016.05.010>
69. Philippines 2022. Memorandum Circular No. 8, Series of 2022. https://www.da.gov.ph/wp-content/uploads/2022/06/mc08_s2022_Revised.pdf
70. DBTt 2022. Guidelines for the Safety Assessment of Genome Edited Plants; Government of India, Ministry of Science & Technology, DBTt; 2022. <https://dbtindia.gov.in/latest-announcement/guidelines-safety-assessment-genome-edited-plants-2022>
71. Proposal for a Regulation on Plants Obtained by Certain new Genomic Techniques and their Food and Feed, and Amending Regulation (EU) 2017/625. <https://www.europeansources.info/record/proposal-for-a-regulation-on-plants-obtained-by-certain-new-genomic-techniques-and-their-food-and-feed-and-amending-regulation-eu-2017-625/>
72. Yakovleva I.V., Kamionskaya A.M. // *Trends Biotechnol.* 2022. V. 40. № 6. P. 635–638. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.12.004>
73. OGTR 2021. Department of Health of Australia. Overview – status of organisms modified using gene editing and other new technologies. <https://www.ogtr.gov.au/resources/publications/overview-status-organisms-modified-using-gene-editing-and-other-new-technologies>
74. Health Canada 2022. Guidance on the Novelty Interpretation of Products of Plant Breeding, 2022. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/guidance-documents/guidelines-safety-assessment-novel-foods-derived-plants-microorganisms/guidelines-safety-assessment-novel-foods-2006.html#a5>

Using New Bioinformatics Strategies at the Design Stage of Genome-edited Plants

I. V. Yakovleva^{a, *} and A. M. Kamionskaya^a

^a Skryabin Institute of Bioengineering, Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology”
of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: iacgea@biengi.ac.ru

The identification of risks associated with novel agricultural products of plant origin obtained *via* genome editing is an important aspect of genetic engineering. An extensive discussion is currently ongoing worldwide to clarify the similarities and differences between the “old” risks of “classic” GM plants and the “new” ones associated with genome editing, the lack of existing methods for identification and assessment of new risks. We propose here the concept of “safe by design” as applied to protection that is a new interesting tool that introduces good known standards of safety into plant bioengineering. This approach states that design options are identified to minimize or prevent risks and off-target of genome editing at the concept stage. The correlation between experimentally determined and *in silico* predicted off-target gRNA activity is a major challenge in the CRISPR system application. Today the most studies are focused on efficiency of gRNA design, while we pay attention specifically to the bioinformatics search and study of potential promoters, as the potential risk associates with a possible unplanned change in the transcriptional activity of promoters. We conveyed these strategies in the form of a risk assessment framework for regulation of new genetic technologies.

Keywords: plant genome editing, risk assessment, biosafety, bioinformatics, off-targets

УДК 616-056.3;615-035.1;615-275.4

МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ И ПЕРСИСТЕНЦИИ ПРОДУКЦИИ IgE И ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ИННОВАЦИОННЫЕ СРЕДСТВА ТЕРАПИИ АЛЛЕРГОПАТОЛОГИЙ (ОБЗОР)

© 2023 г. Д. Б. Чудаков¹ *, М. В. Коновалова¹, М. А. Стрельцова¹,
О. А. Шустова¹, А. А. Генералов¹, Г. В. Фаттахова¹

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

*e-mail: boris-chudakov@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 17.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Обзор посвящен анализу основных механизмов формирования IgE-продуцирующих клеток в организме и краткому обзору основных средств-кандидатов для использования в инновационных методах терапии IgE-зависимых патологий. Представлены данные, согласно которым роль IgE⁺ плазматических клеток и различных субпопуляций В-лимфоцитов памяти в формировании и персистенции состояния сенситизации на безвредный аллерген различается в зависимости от используемой модельной системы или исследуемого клинического случая. Следовательно средства, мишенями которых являются сигнальные пути, участвующие в регуляции как плазматических клеток, так и В-лимфоцитов памяти особенно перспективны в терапии аллергических заболеваний. Авторы делают выводы, что в качестве таких мишеней наиболее перспективны компоненты клеточного ответа на окислительный стресс и связанные с ним генотоксический стресс и стресс ЭПР, поскольку все они прямо или косвенно влияют на процессы, регулирующие обе эти субпопуляции и вовлечены в процесс формирования и поддержания локального аллергического воспаления. В обзоре приведены данные, указывающие на особую перспективность использования в этой связи наночастиц благородных металлов и комплексов редкоземельных металлов лантаноидов, ввиду их способности индуцировать в малых дозах долговременные эффекты в связи с изменением свойств клеток врожденного иммунитета и длительным накоплением в организме.

Ключевые слова: IgE, В-лимфоциты, астма, клеточный стресс, окислительный стресс, низкомолекулярные фармакологические ингибиторы, неорганические наночастицы

DOI: 10.31857/S0555109923060028, **EDN:** CUKZYG

В настоящее время по всему миру, в особенности в развитых странах, наблюдается значительное увеличение числа больных с аллергическими заболеваниями, обусловленными формированием продукции IgE на безвредные антигены [1, 2]. К подобным патологиям относятся аллергическая астма, аллергический ринит, атопический дерматит, аллергический конъюнктивит [1–4]. Несмотря на то, что изучением механизмов, ответственных за формирование и персистенцию продукции IgE, занимаются многие исследовательские группы, как в России [5, 6], так и за рубежом [1, 7], механизмы данных процессов пока еще не достаточно поняты. Одной из важнейших пока не разрешенных проблем является вопрос о роли различных субпопуляций В-лимфоцитов и плазматических клеток в персистенции состояния IgE-опосредованной сенсibilизации организма к аллергенам и механизмы формирования таких субпопуляций. Без понимания этих вопросов невозможна разра-

ботка новых методик аллерген-специфической иммунной терапии, которые были бы направлены не просто на индукцию синтеза протективных антител, блокирующих связывание аллергена с IgE на поверхности базофилов и тучных клеток [8, 9], но и на элиминацию существующих продуцентов и их непосредственных предшественников.

Согласно классической точке зрения, формирование В-лимфоцитов, продуцирующих изотипы, отличные от IgM и IgD, происходит всегда в герминальных центрах – структурах, формируемых в В-клеточных фолликулах корковой зоны лимфатических узлов [10, 11]. В процессе первичного иммунного ответа из этих структур развиваются как плазматические клетки – терминально дифференцированные клетки, характеризующиеся развитым секреторным аппаратом и ответственные за продукцию антител, так и В-лимфоциты памяти, сохраняющие экспрессию мембранных изоформ

соответствующих Ig, не продуцирующие растворимых антитела, но способные при новой встрече с антигеном к пролиферации и дифференцировке в процессе вторичного иммунного ответа [12, 13]. Вследствие малочисленности IgE^+ В-лимфоцитов и наличия на поверхности большинства В-лимфоцитов и плазматических клеток низкоаффинного рецептора к IgE молекулы CD23, способной связывать IgE, продуцируемой другими клетками, определение “истинных” IgE^+ В-лимфоцитов и плазматических клеток сильно затруднено [14, 15]. Несмотря на достаточно большой промежуток времени, в течение которого вопрос изучался разными исследовательскими группами, конкретные клеточные субпопуляции, ответственные за персистенцию IgE-опосредованной сенсибилизации, и их точная локализация пока не определены однозначно. Результаты исследований аллергических моделей с использованием лабораторных животных, получаемые разными группами оказываются противоречивыми и не всегда согласуются с данными, получаемыми в клинической практике. Вследствие существенных различий в механизмах, обеспечивающих персистенцию В-клеток памяти и плазматических В-клеток, спектр средств, направленных на специфическую их элиминацию из организма в том и в другом случае будет существенно различным.

Целью данного обзора является краткое обобщение наиважнейших данных, полученных в последние годы относительно выявления субпопуляций, ответственных за персистенцию состояния IgE-зависимой сенсибилизации, механизмов их формирования и поддержания в организме. Кроме того, будут приведены некоторые данные о потенциальных мишенях, на которые могут быть направлены новые средства этиотропной терапии аллергических заболеваний, направленные на элиминацию IgE-продуцентов и их предшественников, и кратко описаны некоторые потенциальные инновационные средства терапии аллергопатологий.

ФОРМИРОВАНИЕ IgE^+ В-ЛИМФОЦИТОВ

Общеизвестно, что формирование В-лимфоцитов, продуцирующих антитела классов IgG и IgA в ответ на чужеродный антиген, происходит с участием герминальных центров В-клеточных фолликулов коровой зоны лимфатических узлов [5, 11]. В то же время ряд клинических данных, согласно которым наличие по крайней мере в некоторых случаях повышенной по сравнению со здоровыми донорами продукции IgE у больных с разными формами аллергии не сопровождается повышенной продукцией IgG (IgA) [16, 17], либо по крайней мере на отсутствие корреляции между продукцией IgE и другими субклассами [18, 19], может указы-

вать на наличие особенного пути формирования IgE-продуцентов.

Так, в работах начала 2010-х годов было показано, что IgE^+ В-лимфоциты в герминальных центрах очень малочисленны и быстро исчезают из данных структур в процессе их созревания, что обуславливается склонностью подобных клеток к апоптозу [20, 21]. Формирование герминальных центров требует индукции как в В-, так и в Т-лимфоцитах, экспрессии транскрипционного репрессора Bcl6 (белок 6 В-клеточной лимфомы) [10]. Однако ранее было установлено, что транскрипционный репрессор Bcl6 препятствует переключению В-лимфоцитов на синтез IgE, в особенности прямому переключению с IgM на IgE [22]. Эти данные вступают в противоречие с клинической практикой, указывающей на персистенцию IgE-продукции и переключения на IgE у больных с аллергией I-го типа [2–4], что косвенно указывает на возможную роль герминальных центров как структур, ответственных за формирование долгоживущих В-лимфоцитов памяти и плазматических клеток [10, 11], в иммунном ответе на аллергены [2–4]. Помимо герминальных центров, В-лимфоциты при активации формируют экстрафолликулярные фокусы, располагающиеся в медуллярной зоне лимфатических узлов и не требующие на зрелых стадиях экспрессии Bcl6 в В-лимфоцитах [23]. Логично было бы предполагать участие именно данных структур в формировании продукции IgE. Действительно, согласно некоторым ранним и более новым данным, переключение изотипов может происходить и вне герминальных центров [24, 25]. Однако в экстрафолликулярных фокусах образуются в основном короткоживущие плазмабласты, не способные к формированию долговременных плазматических клеток и В-клеток памяти [15].

В связи с этим доминирующей на сегодняшний день является точка зрения, согласно которой переключение В-лимфоцитов на синтез IgE происходит двумя основными путями. Во-первых, прямым путем с изотипа IgM в ходе первичного иммунного ответа в ранних герминальных центрах, при этом формирующиеся IgE^+ клетки быстро покидают герминальные центры и развиваются далее экстрафолликулярно в короткоживущие плазмабласты [20, 21]. Во-вторых, последовательно через изотип IgG_1 , особенно при вторичной встрече с аллергеном [26]. Ряд работ указывают на преобладание последовательного переключения при формировании продукции IgE. Согласно опубликованным данным, при первичном иммунном ответе формируются несколько субпопуляций В-клеток памяти, наиболее важные из которых $\text{PD-L2}^+\text{CD80}^-\text{CD73}^-$, $\text{PD-L2}^+\text{CD80}^+\text{CD73}^-$ и $\text{PD-L2}^+\text{CD80}^+\text{CD73}^+$. При повторной встрече с антигеном только последняя субпопуляция склонна к быстрому переключе-

нию на последующие изотипы, в том числе на IgE (обычно с IgG₁-изотипа), а первые две формируют герминальные центры вторичного иммунного ответа [26, 27]. Таким образом, формирование продукции IgE и герминальных центров при вторичном ответе могут быть не связанными друг с другом, хотя само по себе формирование IgG₁⁺ В-клеток памяти при первичном иммунном ответе, в том числе и способных к последовательному переключению на IgE, происходит в герминальных центрах. [26]. Результаты, полученные на экспериментальных моделях, подтверждаются данными новых работ по анализу образцов из миндалин и назальных полипов больных аллергическим ринитом и астмой, у которых формирование продукции IgE происходило экстрафолликулярно, или по крайней мере не было связано с индукцией герминальных центров [28, 29]. Данные по секвенированию транскриптома единичных IgE⁺ плазматических клеток указывают на то, что последние имеют генную сигнатуру, более близкую к таковой у IgG1⁺ плазмабластов, чем у IgG₁⁺ плазматических клеток, отличаются “незрелостью” и, следовательно, скорее всего формируются экстрафолликулярно [30].

Такой механизм формирования продукции IgE объясняет, в частности, смысл переключения В-клеток как на IgG₄ (IgG₁ у мышей), так и на IgE при стимуляции цитокином ИЛ-4 *in vitro* [31, 32]. У аллергиков активируемый ИЛ-4 STAT6 стимулирует переключение именно на IgE. Это можно объяснить не только участием дополнительных транскрипционных факторов, таких как NFIL3 [33], меняющих активность STAT6, но и тем, что при первичном иммунном ответе у предрасположенных к аллергии лиц формируется больше тех IgG₁⁺ клеток, которые в дальнейшем способны не к вторичному формированию герминальных центров, а к переключению с IgG₁ на IgE. Однако несмотря на наличие в литературе сведений о повышенной продукции IgG₄ на аллерген у больных в сравнении со здоровыми донорами [34, 35], нами ранее было показано отсутствие достоверной разницы по продукции специфического IgG в целом и IgG₄ в частности между больными и здоровыми донорами [17], что согласуется с другими литературными данными [18, 19].

Таким образом, новейшие сведения о молекулярных механизмах переключения предполагают модель, согласно которой состояние сенсибилизации к аллергену объясняется существованием IgG₁⁺ (у человека IgG₄-субкласс) В-лимфоцитов памяти, формируемых в герминальных центрах, способных к быстрой вторичной (в том числе в экстрафолликулярных фокусах) дифференцировке в короткоживущие IgE⁺ плазматические клетки и

плазмабласты при вторичной встрече с аллергеном [15, 26]. В этом случае именно В-лимфоциты памяти ответственны за сохранение состояния сенсибилизации. Такие сведения получены на моделях с использованием лабораторных животных [15, 26], однако, это противоречит тем клиническим данным, которые указывают на отсутствие корреляций между продукцией IgE и IgG₄ у пациентов с разными формами IgE-зависимой аллергии [16–19]. Кроме того, несмотря на повышение содержания IgE в крови при новой встрече с аллергеном, существенная продукция IgE сохраняется у больных и при длительном отсутствии контакта с таковым [1, 4]. Следовательно, можно предположить, что существует иной клеточный механизм, связанный с сохранением состояния сенсибилизации за счет существования долго живущих IgE⁺ плазматических клеток. Ниже будут рассмотрены результаты работ, целью которых было выявление подобных клеток.

ДОЛГОЖИВУЩИЕ IgE⁺ ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ – АРГУМЕНТЫ “PROS AND CONS”

Приведенные выше данные о малой вероятности формирования IgE⁺ В-лимфоцитов в рамках герминальных центров, по-видимому, не подтверждают гипотезу прямого формирования IgE⁺ плазматических клеток из наивных В-лимфоцитов после первичного контакта с антигеном. Важно также подчеркнуть, что согласно результатам, полученным в работе Yang et al., формирующиеся IgE⁺ плазматические клетки сохраняют поверхностную экспрессию мембранной изоформы Ig в отличие от дифференцирующихся плазматических клеток, продуцирующих других классы Ig [21]. Кроме того, сигнальный путь, запускаемый при активации антигеном В-клеточного рецептора типа IgE, приводит к изменению внутриклеточной локализации анти-апоптотического белка митохондрий Bax1 и индукция апоптоза [36]. Представленные результаты в совокупности делают предположение о ведущей роли IgE⁺ долгоживущих плазматических клеток в сохранении состояния сенсибилизации у больных при постоянной ре-экспозиции аллергена маловероятным. Было также показано, что одной из особенностей IgE⁺ ранних плазматических клеток является слабая миграция по направлению градиента хемокина CXCL12 (не связанная с меньшей экспрессией его рецептора CXCR4), что препятствует их миграции в костный мозг и сохранению там длительное время [37], в связи с чем формирование долгоживущих IgE⁺ продуцирующих клеток очень затруднено, если возможно. Кроме того, IgE⁺ плазматические клетки экспрессируют меньше S1PR1 рецептора к сфингозин-1-фосфату, необходимого для выхода клетки из герминального центра и начальных этапов ми-

грации из лимфоузлов [36]. Последние данные указывают на то, что IgE⁺ В-лимфоциты характеризуются повышенной экспрессией на поверхности молекул CD19, CD79a/b, BAFF-R, IL4RA, индуцирующих продолжительный тонический выход ионов кальция в цитоплазму и особый вариант кальций-зависимого сигнального каскада, активирующего в конечном итоге кальциневрин-B1 — Bcl2L11 — зависимый апоптоз [38].

Тем не менее наличие относительно стабильной продукции специфического IgE у больных с различными видами IgE-зависимой гиперчувствительности должно указывать на существование долгоживущих IgE⁺ плазматических клеток [1–4], что также подтвердили исследования на клиническом материале [30]. Однако в данной работе анализ транскриптома таких клеток указывал на их принадлежность скорее к незрелым плазмабластам, чем к зрелым долгоживущим плазматическим клеткам [30]. Несмотря на это, в некоторых моделях аллергии на лабораторных животных существование IgE⁺ плазматических клеток было подтверждено экспериментально. Так, в модели пищевой аллергии было показано не только формирование IgE⁺ В-клеток памяти уже при первичном иммунном ответе, но и их крайне длительную персистенцию в организме [39]. Результаты более новой работы указывают на то, что при относительно кратковременном (4 недели) поступлении аллергена через слизистые организма, несмотря на индукцию кратковременного IgE-ответа, формирование IgE-экспрессирующих плазматических клеток практически не происходит. При длительном (15 недель) поступлении аллергена наблюдается их формирование и миграция в костный мозг, как и в случае плазматических клеток других изотипов [40]. При явной экспрессии транскрипционного фактора Blimp1, определяющего программу развития плазматических клеток, не все IgE⁺ клетки, мигрировавшие в костный мозг, экспрессировали CD138, что могло приводить к недооценке их количества в более ранних работах [40].

Наиболее вероятно, что в генерации и поддержании продукции специфического IgE могут участвовать как долгоживущие В-лимфоциты памяти, в том числе и иных изотипов, дифференцирующихся в IgE⁺ при повторном попадании аллергена в организм, так и собственно IgE⁺ В-клетки памяти. Роль этих двух различных субпопуляций в разных системах может быть различна. Таким образом очевидно, что в качестве мишеней для разработки средств, направленных на элиминацию IgE-продуцирующих клеток и их предшественников, необходимо выбирать сигнальные пути, которые имеют значение для функционирования этих обеих субпопуляций.

IgE⁺ ПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ И В-ЛИМФОЦИТЫ ПАМЯТИ – СВЯЗЬ С СИГНАЛЬНЫМИ ПУТЯМИ, ВОВЛЕЧЕННЫМИ В КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ НА РАЗНЫЕ ТИПЫ СТРЕССА

Общеизвестно, что одними из универсальных сигнальных путей, работающих во многих типах клеток, являются сигнальные пути, ответственные за клеточный ответ на разные типы стресса. Различают три основных типа клеточного стресса — это окислительный стресс, возникающий вследствие повреждающего влияния активных форм кислорода (АФК) на различные клеточные структуры [41], генотоксический стресс, возникающий в ответ на различные типы повреждения ДНК [42, 43], и стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), вызываемый накоплением дефолдированных белков в ЭПР [44, 45]. Хотя с АФК связывают активацию многих сигнальных путей, в том числе анти-апоптотического и важного для пролиферации иммунных клеток MAP-киназного [46, 47], основным специфическим сигнальным механизмом, ответственным за защиту клеток от АФК и активирующийся ими, является Keap1-Nrf2-сигнальный путь [48, 49]. Кратко его суть заключается в том, что экспрессируемый транскрипционный фактор Nrf2 в цитоплазме клетки связывается с белком Keap1, который катализирует его убиквитинирование и деградацию. АФК окисляют свободные тиоловые группы остатков цистеина Keap1, что приводит к снижению его сродства с Nrf2 и диссоциации от последнего, в результате чего Nrf2, накапливаясь в ядре, активирует экспрессию генов ферментов антиоксидантной защиты [48, 49]. Основными “игроками” в клеточном ответе на повреждение ДНК являются серин/треонинкиназы ATM и ATR, а также ДНК-протеинкиназы, фосфорилирование мишеней которых останавливает клеточный цикл и запускает экспрессию компонентов системы репарации ДНК [50]. Наконец, “классический” стресс ЭПР активирует три различных независимо активируемых, сигнальных пути — IRE1a-зависимый, PERK-зависимый и ATF6a-зависимый [51, 52]. При этом IRE1a, обладая эндонуклеазной активностью, не только уменьшает общий пул мРНК в клетках и снижает синтез белка, но и ответственна за специфический сплайсинг мРНК транскрипционного фактора XBP-1, усиливая его экспрессию и накопление. Одной из мишеней XBP-1 являются последовательности ДНК, кодирующие молекулярный шаперон GRP78, а также белок CHOP, обладающий про-апоптотической активностью. Накопление дефолдированных белков индуцирует диссоциацию GFP78 из его комплексов с люменальными доменами белков IRE1a и PERK в ЭПР. Это приводит к изменению конформации последних, олигомеризации и аутофосфорилированию, что запускает соответ-

ствующие сигнальные пути. PERK является киназой, фосфорилирующей фактор eIF2 α , что ведет к остановке синтеза большинства белков, за исключением некоторых белков, выполняющих про-апоптотическую роль [51, 52]. ATF6 α — трансмембранный белок аппарата Гольджи, который при возникновении стресса ЭПР подвергается ограниченному протеолизу, в результате чего его часть, обращенная в цитоплазму, диссоциирует и транспортируется в ядро, где выполняет роль транскрипционного фактора. Сигнальные пути с участием IRE1 α и ATF6 α в основном выполняют антиапоптотическую функцию и ответственны за усиление синтеза шаперонов и липидов ЭПР. Если стресс ЭПР сохраняется, тогда в СНОР инициирует апоптоз в клетке.

Известно, что вышеописанные сигнальные пути играют очень важную роль в регуляции функции адаптивных В- и Т-лимфоцитов. Так, окислительный стресс средней интенсивности необходим для индукции дифференцировки антителопродуцирующих клеток [53]. Окислительный стресс в Т-лимфоцитах стимулирует продукцию ИЛ-4 [54]. Генотоксический стресс малой интенсивности в В-лимфоцитах стимулирует дифференцировку герминальных центров, а в случае большей интенсивности может ингибировать данный процесс (путем фосфорилирования фактора Bcl6 киназой АТМ и его последующей деградации) [55, 56]. Индукция гомеостатического стресса ЭПР является частью обычной программы развития плазматических В-клеток. В классическом варианте дифференцировка плазматических клеток связана только с активацией IRE1-зависимого и ATF6-зависимого сигнальных путей, способствующих выживанию [57]. Недавно была выявлена положительная корреляция секреции IgE и экспрессией СНОР, GRP78 в назальных образцах больных аллергическим ринитом, что предполагает наличие дополнительного PERK-зависимого пути при продукции IgE [58]. Принимая во внимание уникальное строение молекул IgE и особенности процессов созревания их аффинности, предстоит выяснить, какая из ветвей ЭПР стресса доминирует в IgE⁺-продуцирующих В клетках.

Весьма важно, что процессы в тканевых клетках, подвергающихся действию агентов, индуцирующих клеточный стресс, также могут оказывать стимулирующее влияние на синтез про-аллергических антител. Активные формы кислорода способны повреждать клетки эпителиального барьера [59], что приводит к высвобождению из них аларминов (АТФ [60], мочевой кислоты [61] и других), и продукции тканевых цитокинов (ИЛ-33 и тимусного стромального лимфопоэтина) [62], активирующих различные звенья врожденного и адаптивного иммунитета в сторону развития воспаления 2-го типа [62]. Действительно, в моделях аллергии на лабораторных животных была подтверждена связь

аллергического воспаления не только с тканевым окислительным стрессом [59, 63], но также и с генотоксическим [59, 64], и стрессом ЭПР [65].

Согласно одной из ведущих гипотез, развиваемой в литературе с начала 2000-х годов, увеличение числа и распространенности аллергических заболеваний в развитых странах объясняется неблагоприятным действием аэрополлютантов, в особенности частиц, являющихся продуктами неполного сгорания дизельного топлива и их компонентов, полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), на иммунную систему [3, 67, 68]. В недавних работах было обнаружено, что именно ПАУ, адсорбированные на частицах, обладают адъювантной активностью, которая усиливала формирование продукции IgE и развитие астмы у мышей [69]. Кроме того, прототипный ПАУ бензо(а)пирен способен индуцировать аллергическое воспаление, аналогичное возникающему под воздействием целых частиц [70–73], что было подтверждено нами в последних опытах (результаты готовятся к публикации). Нами также были выявлены адъювантные свойства частиц дизельного топлива на индукцию аллерген-специфических антител [74]. Известно также, что избыточная масса тела и связанные с этим процессы в жировой ткани являются причиной усиления симптоматики аллергических заболеваний [75, 76]. Полагают, что как в случае индукции воспаления под действием аэрополлютантов [77], так и в случае ожирения [78], ведущую роль на начальных стадиях может играть именно клеточный ответ на окислительный стресс и, следовательно, на связанные с ним стресс генотоксический [65] и стресс ЭПР [66]. Таким образом, сигнальные пути, ответственные за клеточный ответ на данные типы стресса, являются первыми кандидатами при поиске молекулярных мишеней этиотропной терапии IgE-зависимых патологий.

Известно, что AMP-зависимая протеинкиназа (AMPK) регулирует как формирование В-лимфоцитов памяти после реакции первичного иммунного ответа, так и плазматических клеток. В случае плазматических клеток она подавляет продукцию ими иммуноглобулинов и, ингибируя митофагию, приводит к накоплению активных форм кислорода в клетках, что вызывает их гибель. В случае В-клеток памяти она напротив необходима для их дифференцировки [79]. Таким образом, эффект AMPK на вторичный иммунный ответ может различаться в зависимости от того, в каких именно клетках она активна преимущественно. Несмотря на это AMPK-зависимый сигнальный каскад также является довольно универсальным для В-лимфоцитов памяти и плазматических клеток. В Т-лимфоцитах данный фермент также играет важную роль, стимулируя экспрессию Bcl6 и последующую дифференцировку в Т-фолликулярные хелперы [80]. Если принять во внимание это обстоя-

тельство и допустить, что экстрафолликулярная активация, но не активация герминальных центров, играет преимущественную роль в продукции IgE (что было показано другими [28, 29] и нами [81]), можно предположить, что активация AMPK должна ингибировать продукцию про-аллергических IgE антител, поскольку: 1) AMPK-зависимая дифференцировка Т-фолликулярных хелперов [80], важных компонентов реакции герминального центра [10, 11], потенциально способна сместить активацию В-лимфоцитов в сторону формирования герминальных центров за счет усиления вероятности формирования контактов В-лимфоцитов с увеличенным числом Т-фолликулярных хелперов; 2) AMPK ингибирует продукцию иммуноглобулинов терминально дифференцированными плазматическими клетками [79]. Согласно первоначально полученным данным нокаут AMPK-киназы в В-лимфоцитах не оказывает достоверного влияния на первичный иммунный ответ на Т-зависимый антиген [82]. Тем не менее, результаты более новой работы показывают, что при таком селективном нокауте происходит небольшое, но достоверное усиление первичного иммунного ответа на NP-KLH [83]. Таким образом, при системном введении активатора AMPK AICAR преобладает влияние, связанное с функцией Т-лимфоцитов [80], происходит активация Т-зависимого иммунного ответа, что как раз объясняется косвенным через активацию Т-фолликулярных хелперов [80]. Однако в случае, если во вторичном иммунном ответе на аллерген превалирующая роль принадлежит IgG_1^+ В-клеткам памяти, дифференцирующимся в IgE-продуценты, как в работе [26], в таком случае активация AMPK может быть необходима для продукции IgE. Это также следует из результатов работы [83], согласно которым активность AMPK киназы в В-лимфоцитах памяти важна для их выживания. Возможно, существует еще один путь, по которому активация AMPK может косвенно оказывать влияние на продукцию IgE и аллергическое воспаление в целом. Известно, что активация данной киназы в В-лимфоцитах важна для индукции экспрессии IgD-изоформы В-клеточного рецептора [82]. Последние работы показали, что секреторная изоформа IgD связывается с базофилами (но не тучными клетками) и в присутствии антигена индуцирует секрецию базофилами BAFF (запускает само переключение изотипов в целом) и ИЛ-4 (определяет направление переключения на изотип IgE), и стимулирует 2-й тип иммунного ответа на аллерген [84, 85].

AMPK-зависимый каскад является своеобразным “хабом”, активность которого регулирует формирование активных форм кислорода (окислительный стресс) и клеточный ответ на стресс ЭПР с одной стороны, а с другой сам регулируется сигнальными путями клеточного стресса. Так,

в зависимости от обстоятельств, он может активироваться или ингибироваться активными формами кислорода [86, 87], активировать экспрессию шаперонов, защищающих клетку от стресса ЭПР [88], активироваться генотоксическим стрессом [89]. Важно, что в В-лимфоцитах киназа Lkb1, играющая ведущую роль в регуляции AMPK-киназы, сама регулируется генотоксическим стрессом (активируется в свою очередь киназой АТМ) [55, 90]. Важнейшую роль в его регуляции играет интенсивность метаболизма, которая определяется увеличением отношения AMP/АТР [91].

С AMPK-киназой связан еще один сигнальный путь — PI3K-Akt-mTOR сигналинг. Активация PI3K (фосфатидилинозитол-3-киназы) индуцирует в клетках активацию Akt-киназы. Данная киназа фосфорилирует AMPK и, таким образом, ингибирует ее активность. [92]. С другой стороны, AMPK подавляет активность белкового комплекса mTORC1 [92]. Как выяснилось из недавней работы, сигнальный путь от PI3K и процессы, связанные с продолжительным по времени увеличением концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки, весьма важны как для формирования IgE^+ В-лимфоцитов, так и IgE продуцирующих плазматических клеток [38]. Изучено влияние изоформы PI3K δ на регуляцию локального аллергического воспаления при астме [94], вследствие чего можно предположить, что PI3K δ может играть ведущую роль в синтезе IgE в ходе первичного и вторичного иммунного ответа на аллерген.

Таким образом, сигнальные пути, ответственные за клеточный ответ на разные типы стресса, PI3K- и AMPK, могут рассматриваться в качестве перспективных при поиске молекулярных мишеней этиотропной терапии IgE-зависимых патологий. Интересно, что хотя влияние фармакологических модуляторов этих сигнальных путей на содержание IgE-продуцентов и их предшественников не изучалось достаточно подробно, ряд таких фармакологических модуляторов уже показали свой терапевтический эффект в различных моделях аллергического воспаления и клинических исследованиях. Так, в различных работах показан терапевтический эффект различных низкомолекулярных антиоксидантов, например в работах [95–98]. Введение мышам линии BALB/c фармакологического ингибитора ДНК-протеинкиназы NU7441 ингибировало развитие у них симптомокомплекса астмы в модели с индукцией овальбумином [99]. В модели астмы, индуцируемой аллергенами клещей домашней пыли, терапевтический эффект показали так называемые “химические шапероны” — тауродезоксихолевая кислота и родственные по структуре молекулы, препятствующие дефолдированию белков ЭПР и ингибирующие ATF6 α -сигнальный путь [100, 101]. Результаты работы [102] показывают возможность потенциального использования селективных

ингибиторов IRE1a и PERK-сигналинга в терапии и профилактике контактного дерматита. Наконец, селективный ингибитор PI3Kδ IC87114 также показал свою эффективность в модели астмы, индуцируемой LPS и овальбумином [103].

Дальнейшие исследования необходимы для того, чтобы определить, каким образом эти компоненты влияют на IgE⁺ клетки и их предшественников, продукцию IgE, не только при первичном, но и при вторичном ответе на аллерген, что важно для дальнейшей оценки перспективности их использования в клинической практике.

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СРЕДСТВА НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ IgE-ЗАВИСИМЫХ ПАТОЛОГИЙ

При обсуждении потенциальных перспективных инновационных средств терапии IgE-зависимых патологий нельзя не упомянуть о наноразмерных объектах — объектах бионанотехнологии. Среди многочисленных наноструктур относительно недорогими, простыми в получении и легкими в стандартизации являются наночастицы на основе неорганических компонентов — металлов и их оксидов, а также неметаллов. Наиболее часто в биомедицине используются частицы на основе благородных металлов — золота [104], серебра [105], платины [106], но также используются частицы на основе оксидов металлов — титана [107], железа [108] и т.д. Из неметаллических неорганических нанообъектов особенно часто упоминаются наночастицы на основе селена [105, 106], углеродные нанотрубки [111], фуллерены [112, 113]. Важно, что одним из основных механизмов действия большинства известных нано- и микрочастиц на организм является индукция окислительного стресса, что обычно связано с неферментативным формированием АФК на поверхности наночастиц [114]. Именно в этом контексте весьма уместно упомянуть о наночастицах в рамках настоящего обзора. Так, подобный эффект показан для наночастиц золота [115], серебра [116], оксида меди [117], оксидов железа [118], оксида титана [119], углеродных нанотрубок [120, 121], наноструктур на основе графена [122]. Очевидно, что эффект таких АФК зависит от интенсивности их образования (дозы частиц) и в принципе может быть идентичен эффекту АФК, генерируемых ферментативно в ходе иммунного ответа. В то же время известно, что в ряде опытов был получен достоверный антиоксидантный эффект ряда наночастиц. Это в первую очередь относится к наночастицам на основе селена [123] и оксида церия (IV) [124, 125] (соединения селена в целом известны как антиоксиданты, церий же в составе наночастиц оксида церия (IV) способен менять степень окисления

с “+4” на “+3”). Согласно большинству работ, антиоксидантными свойствами обладают также наноструктуры на основе фуллерена [126–128]. Утверждается наличие антиоксидантных свойств у наночастиц платины [129]. Как известно, окислительный стресс сильно связан со стрессом генотоксическим и стрессом ЭПР.

Исходя из изложенного в предыдущем разделе, логичнее всего было бы предположить, что именно наночастицы с антиоксидантными свойствами могут рассматриваться как средства неспецифической терапии IgE-зависимых патологий. И действительно, эффект подавления симптомокомплекса аллергической астмы в мышинной модели показан в случае фуллереновых наноструктур [127, 128, 130]. В случае наночастиц селена исследований на моделях астмы и аллергии не проводилось, однако показана их подавляющая активность в отношении других воспалительных патологий, в частности ревматоидного артрита [131].

Также имеются сведения и о терапевтическом эффекте наночастиц золота, наиболее часто используемых в биомедицинских работах и имеющих прооксидантный эффект. Это следует из результатов недавней работы, опубликованной в 2022 г., согласно которой наночастицы золота при их ингаляционном введении мышам BALB/c за час до сенсилизации ингибировали развитие овальбумин-индуцированного глюкокортикоидорезистентного воспаления в модели развития астмы [132]. Эффект был связан с индукцией Nrf2-сигнального пути, восстанавливающего окислительно-восстановительный гомеостаз. Полученный эффект, с учетом прооксидантных свойств наночастиц золота как таковых, кажется весьма неожиданным. Тем не менее эти данные согласуются с результатами исследования [133], в котором длительное введение в небольших дозах частиц — продуктов сгорания дизельного топлива индуцировало в легких мышей экспрессию компонентов системы ферментов антиоксидантной защиты (регулируемую фактором Nrf2) и компонентов протеасомы, ответственных за деградацию дефолдированных белков, что обеспечивает защиту при попадании больших доз таких частиц. Здесь может наблюдаться так называемый эффект “преадаптации”, или эффект гормезиса, описанный ранее еще Лакки [134–136] для случаев с ионизирующей радиацией. В данном случае гормезис следует рассматривать как стимулирующее действие умеренных доз стрессоров (недостаточных, что крайне важно, для развития патологического эффекта) выражается в “преадаптации”, приобретении организмом устойчивости к большим дозам стрессора. В случае эффекта наночастиц золота — небольшие дозы таких частиц способствовали гормезису с приобретением адаптации организма к окислительному стрессу, вызываемому провокацией антигеном в модели астмы [134].

Вполне возможно, аналогичный эффект наблюдался другой группой ранее в случае серебряных наночастиц, вводимых за несколько дней до провокации антигеном, хотя авторы полагали, что дело в прямом антиоксидантном эффекте последних [137].

Необходимо отметить, что привлекательность наночастиц на основе неорганических материалов в качестве средств неспецифической терапии IgE-зависимых патологий заключается в их сравнительно медленном клиренсе при их введении через респираторную систему или даже системно. Так, согласно недавним результатам, при системном введении наночастиц золота с различным покрытием концентрация их во внутренних органах (печень, селезенка, почки) достигая максимума в первые 30–60 мин после введения, не снижалась существенно в течении 4 недель, а после введения интраназально период их полувыведения из легких достигал в некоторых случаях 180 дней [138–141]. Накопление таких частиц происходит в основном в клетках, выполняющих фагоцитарную функцию [138, 139].

При этом действие подобных наночастиц на организм по факту может длиться даже дольше. В последнее время в научном сообществе весьма распространилась концепция о “тренируемом” врожденном иммунитете (*trained immunity*), заключающаяся в том, что клетки (преимущественно исследовались макрофаги и моноциты), обработанные агонистами TLR или NLR-рецепторов меняют свою эпигенетическую программу так, что на повторное действие того же самого (или похожего) стимула они отвечают сильнее или слабее [142–145]. Изменение эпигенетической программы связано с изменением метаболизма клеток, изменением баланса между аэробным и анаэробным гликолизом в них, и является достаточно стабильным [144]. Такое явление, если дозы стимула в случае первого контакта небольшие, также можно рассматривать как вариант гормезиса в пределах иммунной системы. Важно, что в качестве первичного стимула могут выступать не только лиганды PRR-рецепторов, но и наночастицы золота (и скорее всего других благородных металлов), что было показано в работах [146, 147]. При этом имеет место в большей степени индукция толерантности и уменьшение способности к синтезу провоспалительных цитокинов и вторичной стимуляции [146]. Хотя все работы были проведены *in vitro* и *ex vivo*, а результаты нуждаются в подтверждении в системе *in vivo*, они тем не менее представляются достаточно перспективными. Подобный подход может быть легко использован не только для терапии, но что важнее — для профилактики IgE-зависимых патологий у предрасположенных к ним лиц. Исходя из вышеизложенного, эффект наночастиц благородных металлов в этих случаях на формирование продукции IgE аллергическое

воспаление может складываться из двух составляющих: 1) общего эффекта гормезиса — “преадаптации”, выражающегося в увеличении устойчивости организма к окислительному стрессу, сопровождающему локальное воспаление; 2) эффекта “тренируемого” врожденного иммунитета — частный случай гормезиса в отношении клеток иммунной системы.

Основными клетками, обладающими фагоцитирующей активностью в отношении подобных наночастиц, являются клетки фагоцитарной системы — макрофаги и дендритные клетки [104, 148]. В-лимфоциты не являются специализированными фагоцитами, но обладают способностью поглощать крупные частицы [149]. Результаты недавней работы, опубликованной в 2022 г., указывают на способность модифицированных полиэтиленгликолем наночастиц золота связываться, а затем и эндоцитироваться особой субпопуляцией В-лимфоцитов, ассоциированных с процессами старения, имеющих фенотип $CD19^+CD3^-CD11b^-CD11c^+$, и в меньшей степени — с субпопуляцией $CD19^+CD138^+$ плазмбластов и незрелых плазматических клеток [150]. Важно, что в отношении первой субпопуляции есть обоснованные предположения, что они являются фактически В-лимфоцитами памяти [151]. Согласно последним данным, основная часть предшественников IgE^+ В-лимфоцитов, формируемых экстрафолликулярно в назальных полипах, также экспрессирует маркер CD11c [29]. Последнее означает, что предшественники IgE^+ и ранние IgE^+ В-лимфоциты могут входить в число немногих В-лимфоцитов, способных эффективно поглощать неорганические наночастицы, и таким образом последние могут оказывать на них прямое влияние.

С недавнего времени особый интерес для биомедицинских исследований стали представлять соединения и комплексы редкоземельных металлов лантаноидов. В 2008 г. японские ученые одни из первых получили и охарактеризовали самоорганизующиеся наноструктуры на основе катионов лантанидов и гуаниновых динуклеотидов [152]. В 2022 г. похожие комплексы получили китайские исследователи, при этом в качестве лигандов комплексообразователей-лантанидов использовали мономерные АМФ, ГМФ и их смесь [153]. Подобные комплексы формируются благодаря ковалентным и донорно-акцепторным связям катионов лантанидов с атомами кислорода фосфорных остатков моно- или олигонуклеотидов, и атомами азота N7 пуриновых остатков [153]. Комплексы лантанидов (в частности европия и других элементов этого семейства) со смесью АМФ и ГМФ (содержащие по три трехвалентных катиона лантанида и по две молекулы АМФ и ГМФ) формировали наноразмерные структуры, способные инкапсулировать антиген (овальбумин) в своем составе.

Такие наноструктуры при введении мышам C57BL/6 подкожно накапливались в большей степени в региональных лимфоузлах, но не в печени, и индуцировали продукцию протективных антител классов IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2c}, а также продукцию интерферонов, особенно ИФН γ , ответственного за формирование устойчивого иммунного ответа I-го типа [153].

В данном исследовании в качестве иммуностимулирующего лиганда был выбран комплекс, имитирующий молекулу циклического гуанозин-аденозинмонофосфата, активатора STING [153]. Данные о влиянии активации STING на формирование аллергического воспаления указывают на его важную стимулирующую, но не ингибирующую, роль в развитии последнего [154, 155]. В этой связи, в качестве средств терапии и профилактики аллергопатологий лучшим решением было бы применение комплексов лантаноидов с другими олигонуклеотидными лигандами, в частности с CrG олигонуклеотидами, обладающими выраженным супрессорным эффектом на продукцию IgE и аллергическое воспаление, стимулирующие развитие иммунного ответа первого типа, а в ряде случаев продукцию иммуносупрессорного ИЛ-10 [156–158]. Однако подобные комплексы, их стабильность и свойства пока не были охарактеризованы в биомедицинских работах.

Важно, что введение небольших доз (на 1–1.5 порядка ниже тех, что индуцируют патологические процессы) лантаноидов также способно индуцировать гормезис. В исследовании группы китайских ученых было установлено, что небольшие дозы катионов Ln³⁺, вводимых в течение 30 сут до введения большой дозы этилового спирта, вызывало индукцию фактора Nrf2 и предохраняло животных от окислительного стресса [159]. В связи с этим можно предположить, что в случае комплекса лантаноида и лиганда, подавляющего аллергическое воспаление, (CrG олигонуклеотидов или других) можно добиться двойного эффекта, обуславливающего профилактику аллергического воспаления – за счет свойств самого лиганда, и эффекта гормезиса, обусловленного лантаноидом.

Полученные данные не исчерпывают всего потенциала использования наноматериалов в качестве средств для профилактики и терапии аллергопатологий, здесь приведены лишь некоторые наиболее яркие примеры потенциальных кандидатов.

В то же время следует учесть, что при использовании подобных средств необходимо строго придерживаться определенного “окна” терапевтических доз, поскольку в больших концентрациях подобные наноматериалы, в частности наночастицы благородных металлов и лантаноиды, проявляют токсичность [114, 160]. Кроме того, есть определенный круг наноматериалов, в целом плохо подходящих для терапии IgE-зависимых патологий,

поскольку они скорее приводят к обострению аллергического воспаления либо сами являются его триггерами. К подобным структурам относятся наночастицы на основе окидов металлов – алюминия, титана и никеля [161], оксида церия [162], некоторые углеродные нанотрубки [120, 121].

Представленные в настоящем обзоре данные указывают на возможность формирования продукции IgE в ходе реакции экстрафолликулярного ответа. В поддержании состоянии IgE-зависимой сенсилизации организма могут участвовать как IgE⁺ клетки памяти, так и В-лимфоциты, экспрессирующие иные изотипы, но быстро переключающиеся на синтез IgE в ходе вторичного иммунного ответа на аллерген. В качестве терапевтических мишеней для делеции указанных выше субпопуляций удобно использовать модуляторы мишеней – компонентов сигнальных путей, регулирующих как физиологию В-лимфоцитов памяти, так и плазматических клеток. К подобным мишеням относятся компоненты сигнальных путей, ответственных за клеточный ответ на окислительный и связанные с ним генотоксический стресс и стресс ЭПР, оказывающие влияние на В-лимфоциты и плазматические клетки, в том числе через регуляцию AMP-киназы. Фармакологические модуляторы этих сигнальных путей являются перспективными кандидатами как средства терапии IgE-зависимых патологий. В качестве подобных средств могут быть использованы и различные наночастицы, в частности на основе благородных металлов, либо наноконструкции на основе лантаноидов, вследствие их потенциального влияния на Nrf2-сигнальный путь, ответственный за индукцию экспрессии ферментов – антиоксидантов. Вследствие большого периода полувыведения из организма и способности индуцировать феномен “тренируемого” врожденного иммунитета наночастицы могут иметь довольно длительный эффект, в связи с чем они перспективны для использования и как средства профилактики аллергопатологий. Использование их, однако, требует строгого применения в пределах «терапевтического» окна во избежание токсических эффектов. Требуются многочисленные независимые исследования их эффекта *in vivo* для подтверждения их безопасности и эффективности.

Исследование выполнено при поддержке проекта РНФ № 23-25-10044.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pouslen L.K., Hummelshoi L. // Ann. Med. 2007. V. 39. № 6. P. 44–456.
2. Джаббаров М.Б. 2021. Т. 16. № 48. С. 160–171.

3. Лусс Л.В., Сидорович О.И. // Астма и аллергия. 2015. № 1. С. 31–34.
4. Мигачева Н.Б. // Евразийское научное обозрение. 2021. № 9–2 (79). С. 109–113.
5. Петрова С.Ю., Хлгатын С.В., Бержец В.М., Петрова Н.С., Радикова О.В. // Российский аллергологический журнал. 2020. Т. 17. № 4. С. 38–45.
6. Гуцин И.С. // Российская ринология. 2004. № 1. С. 6–22.
7. Haniuda K., Kitamura D. // Allergol. Int. V. 70. № 2. P. 163–168.
8. Балаболкин И.И., Рылеева И.В., Юхтина Н.В., Ксензова Л.Д., Капустина Е.Ю. // Педиатрия. Журн. им. Г.Н. Сперанского. 2010. Т. 85. № 2. С. 81–85.
9. Выхристенко Л.Р. // Российский аллергологический журн. 2010. № 5. С. 29–37.
10. Gatto D., Brink R. // J. Allergy Clin. Immunol. V. 126 № 5. P. 898–907.
11. Топтыгина А.П. // Иммунология. 2012. Т. 33. № 3. С. 162–168.
12. Шейбак В.М., Павлюковец А.Ю. 2020. № 3. С. 39–45.
13. Хаитов Р.М., Никонова А.А., Хаитов М.Р. // Бюллетень сибирской медицины. 2019. Т. 18. № 1. С. 228–236.
14. Янченко В.В., Янченко Л.К., Осененко Е.И. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2005. № 4. С. 45–58.
15. Wu L.C., Zarrin A.A. // Nat. Rev. Immunol. 2014. V. 14. P. 247–259.
16. Свирицевская Е.В., Симонова М.А., Матушевская Е.В., Фаттахова Г.В., Хлгатын С.В., Рязанцев Д.Ю. и др. // Вестник РГМУ. 2019. Т. 74. № 1. С. 63–70.
17. Svirshchevskaya E., Fattakhova G., Khlgatyan S., Chudakov D., Kashirina E., Ryzantsev D. et al. // Clin. Immunol. 2016. V. 170. P. 31–38.
18. Niedenberger, V., Niggemann B., Kraft D., Spitzauer S., Valenta R. // Eur. J. Immunol. 2002. V. 32. P. 576–584.
19. Resch Y., Michel S., Kabesh M., Lupinek C., Valenta R., Vrtala S. // J. Allergy Clin. Immunol. 2015. V. 136. P. 1083–1091.
20. Talay O., Yan D., Brightbill H.D., Straney E.M., Zhou M., Ladi E. et al. // Nat. Immunol. 2012. V. 13. P. 396–404.
21. Yang Z., Sullivan B.M., Allen C.D. // Immunity. 2012. V. 36. P. 857–872.
22. Kitayama D., Sakamoto A., Arima M., Hatano M., Miyazaki M., Tokuhisa T. // Mol. Immunol. 2008. V. 45. № 5. P. 1337–1345.
23. Marshall J.L., Zhang Y., Pallan L., Hsu M.-C., Khan M., Cunningham A.F. et al. // Eur. J. Immunol. 2011. V. 41. № 12. P. 3506–3512.
24. Roco J.A., Mesin L., Binder C.S., Nefzger C., Gonzalez-Figueroa P., Canete P.F. et al. // Immunity. 2019. V. 51 № 2. P. 337–350.
25. MacLennan I.C.M., Toellner K.-M., Cunningham A.F., Serre K., Sze D.M.-Y., Zuniga E., Cook M.C., Vinuesa C.G. // Immunol. Rev. 2003. V. 194. P. 8–18.
26. He J.-S., Subramaniam S., Narang V., Srinivasan K., Saunders S.P., Carbajo D. et al. // Nat. Commun. 2017. V. 8. P. 641.
27. Tomayko M.M., Steinel N.C., Anderson S.M., Shlomchik M.J. // J. Immunol. 2010. V. 185. P. 7146–7150.
28. Feldman S., Kasjanski R., Popovski J., Hernandez D., Chen J.N., Norton J.E. et al. // Clin. Exp. Allergy. 2017. V. 47 № 4. P. 457–466.
29. Corrado A., Ramonell R.P., Woodruff M.C., Tipton C., Wise S., Levy J. et al. // Mucosal Immunol. 2021. V. 14. P. 1144–1159.
30. Ramadani F., Bowen H., Gould H.J., Fear D.J. // Front. Immunol. 2019. V. 10. P. 402.
31. Vercelli D. // Am. J. Respir. Clin. Care Med. 2000. V. 162. P. 586–590.
32. Шиловский И.П., Ерохина Д.В., Бабахин А.А., Хаитов М.Р. // Молекулярная биология. 2017. Т. 51. № 4. С. 3–17.
33. Kashiwada M., Levy D.M., McKeag L., Schroder A.J., Canfield S.M., Trayer G., Rothman P.B. // PNAS. 2010. V. 107. № 2. P. 821–826.
34. Miranda D.O., Silva D.A., Fernandes J.F., Queiros M.G.J., Chiba H.F., Ynoue H.L. et al. // Clin. Dev. Immunol. 2011. V. 2011. P. 302739.
35. Piacentini G.L., Gierresi S., Kantar A., Lubrano L., Olivieri F., Boner A.L., Peroni D.G. // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2011. V. 24 № 9. P. 1049–1056.
36. Laffleur B., Duchez S., Tarte K., Denis-Lagavhe N., Peron S., Carrion C. et al. // Cell Rep. 2015. V. 10 № 6. P. 900–909.
37. Achatz-Straussberger G., Zaborsky N., Koningsberger S., Luger E.O., Lamers M., Cramer R., Achatz G. // Eur. J. Immunol. 2008. V. 38 № 11. P. 3167–3177.
38. Newman R., Tolar P. // Immunity. 2021. V. 54(12). P. 2756–2771.
39. Jimenez-Saiz R., Chu D.K., Mandur T.S., Walker T.D., Gordon M.E., Chaudhary R. et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2017. V. 140 № 6. P. 1604–1615.
40. Asrat S., Kaur N., Liu X., Ben L.-H., Kajimura D., Murphy A.J. et al. // Sci Immunol. 2020. V. 5. № 43. 8402.
41. Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Кандалицева Н.В., Мартинович Г.Г., Меньшикова Е.Б. // Успехи геронтологии. 2020. Т. 33. № 1. С. 10–22.
42. Дурнев А.Д. // Гигиена и санитария. 2014. Т. 93. № 2. С. 76–83.
43. Кытикова О.Ю., Гвозденко Т.А., Виткина Т.И., Новгородцев А.Д. // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2015. № 56. С. 46–49.
44. Зверев Я.Ф., Брюханов В.М. // Нефрология. 2012. Т. 16. № 3–1. С. 54–71.
45. Меситов М.В., Меситов М.В., Игнашкова Т.И., Мещерский М.Е., Акопов А.С., Соколовская А.А., Московцев А.А., Кубатие А.А. // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2012. Т. 56. № 3. С. 87–93.
46. Калинина Е.В., Гаврилюк Л.А., Покровский Е.С. // Биохимия. 2022. Т. 84. № 4. С. 459–473.
47. Qu J., Li Y., Zhong W., Gao P., Hu C. // J. Thorac. Dis. 2017. V. 9 № 1. P. E32–E43.

48. Шиловский Г.А. // Биохимия. 2022. Т. 87. № 1. С. 86–103.
49. Robledinos-Anton N., Fernandez-Gines R., Monda G., Cuadrado A. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. P. 9372182.
50. Суворова И.И., Кожухарова И.В., Никольский Н.Н., Поспелов В.А. // *Цитология.* 2013. Т. 55. № 12. С. 841–851.
51. Hetz C. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Bio.* 2012. V. 13. P. 89–102.
52. Меситов М.В., Московцев А.А., Кубатиев А.А. // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2013. Т. 57. № 4. С. 97–108.
53. Gilljam K.M., Holm K.L., Zahoor M., Centonze F.G., Farhan H., Blomhoff H.K. // *J. Immunol.* 2020. V. 204. P. 2133–2142.
54. Kemp K.L., Lin Z., Zhao F., Gao B., Song J., Zhang K., Fang D. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288 № 46. P. 33272–33282.
55. Sherman M.H., Kuraishi A.I., Deshpande C., Hong J.S., Cacalano L.A., Gatti R.A. et al. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39 № 6. P. 873–885.
56. Phan R.T., Saito M., Kitagawa Y., Means A.R., Dalla-Favera R. // *Nat. Immunol.* 2007. V. 8 № 10. P. 1132–1139.
57. Gass J.N., Gunn K.E., Sriburi R., Brewer J.W. // *Trends Immunol.* 2004. V. 25 № 1. P. 17–24.
58. Lu J.-X., Zhen Z., Chen A.-N., Guo C.-L., Shi K.-T., Wang H. et al. // *Laryngoscope Invest. Otolaryngol.* 2021. V. 6 № 6. P. 1256–1266.
59. Uchida M., Anderson E. L., Squillace P. C., Patience N., Maniak P. J., Iijima K., et al. // *Allergy.* 2017. V. 72. N. 16. P. 1521–1531.
60. Chan T.K., Tan W.S.D., Peh H.Y., Wong W.S.F. // *J. Immunol.* 2017. V. 199. № 1. P. 39–47.
61. Idzko M., Hammad H., van Nimbewegan M., Kool M., Willart M.A., Muskens F. et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13, № 8. P. 913–919.
62. Kool M., Willart M.A.M., van Nimvegaen M., Bergen I., Pouliot P., Virchow J.C., Rogers N. et al. // *Immunity.* 2014. V. 34. P. 527–540.
63. Lambrecht B.N., Hammad H. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. V. 134. № 3. P. 499–507.
64. Cho Y.S., Moon H.-B. // *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2010. V. 2 № 3. P. 183–187.
65. Chan T.K., Loh X.Y., Peh H.Y., Tan W.F., Tan W.D., Li N. et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2016. V. 138. № 1. P. 84–96.
66. Dastghaib S., Kumar P.S., Aftabi S., Damera G., Davand A., Sepanjnia A. et al. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2021. V. 64. № 1. P. 29–38.
67. Pandya R.J., Solomon G., Kinner A., Balmes J.R. // *J. Env. Health Persp.* 2002. V. 110. S. 1. P. 103–112.
68. Park E.-J., Roh J., Kang M.-S., Kim S.N., Kim Y., Choi S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. P. e27649.
69. Yanagisawa R., Takano H., Inoue K.-I., Ichinose T., Sadakane K., Yoshino S. et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2006. V. 36. P. 386–395.
70. Yanagisawa R., Koike E., Win-Shwe T.-T., Ichinose T., Takano H. // *J. Appl. Toxicol.* 2016. V. 36. P. 1496–1504.
71. Wang E., Liu X., Tu W., Do D.C., Yu H., Yang L. et al. // *Allergy.* 2019. V. 74. P. 1675–1690.
72. Wang E., Tu W., Do D.C., Xiao X., Bhatti S.B., Yang L. et al. // *Front. Immunol.* 2021. V. 12. 643260. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.643260>
73. Wang X., Guan S., Sun L., Dai Z. // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2022. V. 89. P. 103782.
74. Chudakov D.B., Tsaregorodtseva D.S., Fattakhova G.V., Kotsareva O.D., Sergeev A.A., Svirschevskaya E.V. In: *Allergy & Asthma, COVID-19 & COPD, Immunophysiology & Immunorehabilitation: Innovative Technologies.* Bologna: Filodiritto International Proceedings, 2021. P. 221–228.
75. Кытикова О.Ю., Гвозденко Т.А., Антонюк М.В. // *Клиническая медицина.* 2018. Т. 96. № 9. С. 784–790.
76. Ячейкина Н.А., Алимова И.Л., Плутенко Е.В. // *Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2021. Т. 20. № 2. С. 188–195.
77. Wang, J., Huang J., Wang L., Chen C., Yang D., Jin M. et al. // *J. Thorac. Dis.* 2017. V. 9. № 11. P. 4398–4412.
78. Han C.Y. // *Diabetes Metab. J.* 2016. V. 40. № 4. P. 272–279.
79. Brookens S.K., Boothby M.R. // *Immunomethab.* 2021. V. 3. № 2. P. e210011.
80. Xie M.M., Amet T., Liu H., Yu Q., Dent A.L. // *Mol. Immunol.* 2017. V. 81. P. 67–75.
81. Chudakov D.B., Kotsareva O.D., Konovalova M.V., Tsaregorodtseva D.S., Shevchenko M.A., Sergeev A.A., Fattakhova G.V. // *Vaccines (Basel).* 2022. V. 10. № 6. P. 969.
82. Waters L.R., Ahsan F.M., Hoeve J., Hong J.S., Kim D.N.H., Minasyan A. et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 8176.
83. Brookens S.K., Cho S.H., Basso P.J., Boothby M.R. // *J. Immunol.* 2020. V. 205. № 11. P. 3011–3022.
84. Chen K., Xu W., Wilson M., He B., Miller N.W., Bengten E. et al. // *Nat. Immunol.* 2009. V. 10. № 8. P. 889–898.
85. Shan M., Carrillo J., Yeste A., Gutzeit Z., Segura-Garzon D., Walland A.C. et al. // *Immunity.* 2018. V. 49. № 4. P. 709–724.
86. Hincji E.C., Gruszzyk A.V., Willows R., Navarathan N., Hall A.R., Bates G. et al. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 44. P. 17208–17217.
87. Re Y., Chen J., Chen P., Hao Q., Cheong L.-K., Tang M. et al. // *Free Radic. Biol. Med.* 2021. V. 166. P. 128–139.
88. Liu J.-Q., Zhang L., Yao J., Yao S., Yuan T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 497. № 2. P. 564–570.
89. Li R., Luo X., Zhu Y., Zhao L., Li L., Pang Q., Ma M., Gai Y. // *Environ. Pollut.* 2017. V. 231. P. 1560–1568.
90. Li T.-T., Zhu H.-B. // *Biomed. Pharmacother.* 2020. V. 132. P. 110872.
91. Новикова Д.С., Гарабаджия А.В., Мелина Д., Берлев Н.А., Трибулович В.Г. // *Биохимия.* 2015. Т. 80. № 2. С. 163–183.
92. Zhao Y., Hu X., Liu Y., Dong S., Wen Z., He W. et al. // *Mol. Cancer.* 2017. V. 16. P. 79.

93. Котова П.Д., Быстрова М.Ф. // Биологические мембраны. 2020. Т. 37. № 2. С. 156–160.
94. Уминова Ж.А., Всеволодская Е.И., Трофимов В.И., Улитина А.С., Пчелина С.Ф., Дубина М.В., Горбунков С.Д., Акопов А.Л. // Пульмонология. 2017. Т. 27. № 1. С. 7–12.
95. Провоторов В.М., Будневский А.В., Филатова Ю.И., Перфильева М.В. // Клиническая медицина. 2015. Т. 93. № 8. С. 19–22.
96. Никитин А.В., Золотарева М.А. // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. 2008. № 32. С. 25–28.
97. Lee P.-H., Hong J., Jang A.-S. // Korean J. Intern. Med. 2020. V. 35. № 5. P. 1229–1237.
98. Quoc Q.L., Bich T.C.T., Kim S.-H., Park H.-S., Shin Y.S. // J. Cell Mol. Med. 2021. V. 25 № 14. P. 6721–6732.
99. Wang J., Lin J., Shu J., Li H., Ren Z. // J. Thorac Dis. 2018. V. 10. № 8. P. 4819–4830.
100. Siddesha J.M., Nakada E.M., Mihavics B.R., Hoffman S.M., Rattu G.K., Chamberlain N. et al. // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 2016. V. 310. № 11. P. 1243–1259.
101. Nakada E.M., Bhakta N.R., Korwin-Michvicks B.R., Kumar A., Chamberlain N., Bruno S.R. et al. // JCI Insight. 2019. V. 4. № 9. P. e98101.
102. Gendrisch F., Volkel L., Fluck M., Apostolova P., Zeiser R., Jacob T. et al. // Allergy. 2022. V. 77. № 3. P. 966–978.
103. Kim H.-K., Lee G.-H., Bhattarai K.R., Junjappa R.P., Lee H.-Y., Handigum M. et al. // Exp. Mol. Med. 2018. V. 50. P. e444.
104. Ferrando R.M., Lay L., Polito L. // Drug Discov. Today. 2020. V. 38. P. 57–67.
105. Sanchez-Guzman D., le Guen P., Villerete B., Sola N., le Borgne R., Guyard A. et al. // Biomaterials. 2019. V. 217. P. 119308.
106. Jan H., Gui R., Andleeb A., Ullah S., Shah M., Khanum M. et al. // J. Saudi Chem. Soc. 2021. V. 25. № 8. P. 101297.
107. Ziental D., Czarzynska-Goslinska B., Mlynarczyk D.T., Glowacka-Sobotta A., Stanicz B., Golsinski T., Sobotta L. // Nanomaterials (Basel). 2020. V. 10. № 2. P. 387.
108. Neto L.M.M., Kipnis A., Junqueira-Kipnis A.P. // Front. Immunol. 2017. V. 8. P. 239. doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00239
109. Ferro C., Florindo H.F., Santos H.A. // Adv. Healthc. Mater. 2021. V. 10. № 16. P. e2100598.
110. Валуева С.В., Вылегжанина М.Э., Лаврентьев В.К., Боровикова Л.Н., Суханова Т.Е. // Журн. физической химии. 2013. Т. 87. № 3. С. 499.
111. Skariyachan S., Gopal D., Deshpande D., Joshi A., Uttarkar A., Niranjana V. // Infect. Genet. Evol. 2021. V. 96. P. 105155.
112. Giannopoulos G. // Nanomaterials (Basel). 2022. V. 12 № 15. P. 2711.
113. Волчок А.С., Мицевич Д.С., Казбанов В.В. // Научные стремления. 2013. № 5. С. 84–86.
114. Khanna P., Ong C., Bay B.H., Baeg G.H. // Nanomaterials (Basel). 2015. V. 5. № 3. P. 1163–1180.
115. Enea M., Pereira E., de Almeida M.P., Araujo A.M., Bastos M.L., Carmo H. // Nanomaterials (Basel). 2020. V. 10. № 5. P. 995.
116. Kim S., Ryu D.-Y. // J. Appl. Toxicol. 2013. V. 33. № 2. P. 78–89.
117. Fahmy B., Cormier S.A. // Toxicol. In Vitro. 2009. V. 23. № 7. P. 1365–1371.
118. Ahamed, M., Alhadlaa H.A., Alam J., Khan M.A.M., Ali D., Alarafi S. // Curr. Pharm. Des. 2013. V. 19 № 37. P. 6681–6690.
119. Shukla R.K., Kumar A., Vallabani N.V.S., Pandey A.K., Dhawan A. // Nanomedicine (Lond). 2014. V. 9. № 9. P. 1423–1433.
120. Dong J., Ma Q. // Arch. Toxicol. 2016. V. 90 № 9. P. 2231–2248.
121. Inoue K.-I., Yanagisawa R., Koike E., Nishikawa M., Takano H. // Free Radic. Biol. Med. 2010. V. 48. № 7. P. 924–934.
122. Shareena P.D.T., McShan D., Doshaputra A.K., Tchounwon P.B.A. // Nanomicro Lett. 2018. V. 10. № 3. P. 53.
123. Dawood M.A.O., El Basuni M.F., Yilmaz S., Abdel-Latif H.M.R., Kari Z.A., Razab M.K.A. et al. // Antioxidants (Basel). 2021. V. 10 № 9. P. 1364.
124. Filippi A., Liu F., Wilson J., Lelieveld S., Korcsheft K., Wang T. et al. // RSC Adv. 2019. V. 9. № 20. P. 11077–11081.
125. Пузачевский М.А., Мамонтов В.А., Кузьменко А.П., Неручев Ю.А. // Известия Юго-Западного государственного университета. Серия: Техника и технологии. 2021. Т. 11. № 1. С. 61–74.
126. Roy P., Bag S., Chaktaborty D., Dasgupta S. // ACS Omega. 2018. V. 3. № 9. P. 12270–12283.
127. Ширинкин С.В., Чурносоев М.И., Васильченко Л.В. // Клиническая медицина. 2009. Т. 87. № 5. С. 56–58.
128. Войнилович С.В., Васильченко Л.В. // Авиценна. 2017. № 8. С. 12–17.
129. Ismail N.A.S., Lee J.X., Yusof F. // Antioxidants (Basel). 2022. V. 11. № 5. P. 986.
130. Dellinger A., Zhou Z., Connor J., Madhankumar A.B., Pamujula S., Sayes C.M., Kepley C.M. // Nanomedicine (Lond). 2013. V. 8. № 7. P. 1191–1208.
131. Rehman A., John P., Bhatti A. // Nanomaterials (Basel). 2021. V. 11. № 8. P. 2005.
132. Serra M.F., Cotias A.C., Pimentel A.S., de Arantes A.C., Pires A.L.A., Lanzetti M. et al. // Antioxidants (Basel). 2022. V. 11 № 9. P. 1659.
133. Liu X., Wang J., Fan Y., Xu Y., Xie M., Yuan Y. et al. // Environ. Sci. Technol. 2019. V. 53. № 16. P. 9789–9799.
134. Luckey T.D. Hormesis with Ionizing Radiation. Boca Raton: CRC Press, 1980. 84 p.
135. Jargin S.V. // Front Public Health. 2020. V. 8. P. 00278.
136. Шапошников М.В., Турышева Е.В., Москалев А.А. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2009. Т. 49. № 1. С. 46–54.
137. Park H.S., Kim K.H., Jang S., Park J.W., Cha H.R., Lee J.E. et al. // Int. J. Nanomedicine. 2010. V. 5. P. 505–515.
138. Li X., Wang B., Zhou S., Chen W., Liang S., Zheng L. et al. // J. Nanobiotechnol. 2020. V. 18. P. 45.
139. Poon W., Zhang Y.-N., Ouyang B., Kingston B.R., Wu J.L., Wilhelm S., Chan W.C. // ACS Nano. 2019. V. 13 № 5. P. 5785–5798.
140. Han S.G., Lee J.S., Alm K., Kim Y.S., Kim J.K., Lee J.H. et al. // Arch Toxicol. 2015. V. 89 № 7. P. 1083–1094.

141. Kreyling W.G., Moller W., Holzwarth U., Him S., Wenk A., Schleh C., Schaffler M. et al. // ACS Nano. 2018. V. 12. № 8. P. 7771–7790.
142. Калюжин О.В. // Российский аллергологический журн. 2015. № 4. С. 45–51.
143. Калюжин О.В., Андропова Т.М., Караулов А.В. // Терапевтический архив. 2020. Т. 92. № 12. С. 195–200.
144. Netea M.G., Joosten L.B., Latz E., Mills K.H.G., Natoli G., Stunnenberg H.G. et al. // Science. 2016. V. 352. № 6284. P. aaf1098.
145. Ifrim D.C., Quintin J., Joosten L.A.B., Jacobs C., Jansen T., Jacobs L. et al. // Clin. Vaccine Immunol. 2014. V. 21. № 4. P. 534–545.
146. Swartzwelter B.J., Barbero F., Verde A., Mangini M., Pirozzi M., de Luca A.C. et al. // Cells. 2020. V. 9. № 2. P. 284.
147. Magadan S., Mikelez-Alonso I., Borrego F., Gonzalez-fernandez A. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2021. V. 175. P. 113821.
148. Дедкова М.И., Фирстов С.А., Куликов О.А., Минаева О.В. // Журн. научных статей. Здоровье и образование в XXI в. 2014. Т. 16. № 4. С. 4–6.
149. Zhu Q., Zhang M., Shi M., Liu Y., Zhao Q., Wang W. et al. // Immunobiology. 2016. V. 221. № 4. P. 558–567.
150. Hocevar S., Puddini V., Haeni L., Petri-Fink A., Wagner J., Alvarez M., Clift M.J.D., Bourquin C. // ACS Nano. 2022. V. 16. № 11. P. 18119–18132.
151. Golinski M.-L., Demeules M., Derambure C., Riou G., Maho-Vaillant M., Boyer O. et al. // Front. Immunol. Sec. B. Cell Biol. 2020. V. 11. P. 32.
152. Aime C., Nishiyabu R., Gondo R., Kaneko K., Kimizuka N. // Chem. Commun. 2008. V. 2008. № 48. P. 6534–6536.
153. Luo Z., Liang X., He T., Qin X., Li X., Li Y. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2022. V. 144. № 36. P. 16366–16377.
154. Nunokawa H., Murakami Y., Ishii T., Narita T., Ishii H., Takizawa H., Yamashita N. // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 13157.
155. She L., Barrera G.D., Yan L., Alanazi H.H., Brooks E.G., Dube P.H. et al. // JCI Insight. 2021. V. 6. № 3. P. e143509.
156. Sabetel C., Rademecker C., Fievez L., Paulissen G., Chakarov S., Fernandes C. et al. // Immunity. 2017. V. 46. № 3. P. 457–473.
157. Ballester M., Jeanbart L., de Titta A., Nembrini C., Barsland B.J., Hubbell J.A., Swartz M.A. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 14274.
158. Vollmer J., Krieg A.M. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. V. 61. № 3. P. 195–204.
159. Li R., Yu L., Qin Y., Zhiu Y., Liu W., Li Y., Chen Y., Xu Y. // Sci. Total Environ. 2021. V. 758. P. 143626.
160. Almukhlafi H., Ali D., Almutari B., Yaseen K.N., Alyami N., Almeer R. et al. // Int. J. Nanomedicine. 2021. V. 16. P. 3487–3496.
161. Kuroda E., Ozasa K., Temizoz B., Ohata K., Koo C.X., Kanuma T. et al. // Immunity. 2016. V. 45. № 6. P. 1299–1310.
162. Meldrum K., Robertson S.B., Romer I., Markzylo T., Dean L.S.N., Rogers A. et al. // Part. Fibre Toxicol. 2018. V. 15. P. 24.

Mechanisms of Formation and Persistence of Ige Products and Potential Innovative Means of Therapy for Allergic Pathologies

D. B. Chudakov^a,*, M. V. Konovalova^a, M. A. Streltsova^a, O. A. Shustova^a,
A. A. Generalov^a, and G. V. Fattakhova^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: boris-chudakov@yandex.ru

The proposed review is devoted to the analysis of the main mechanisms of the formation of IgE-producing cells in the body and a brief review of the main, most striking candidate agents for use in innovative methods of therapy for IgE-dependent pathologies. Data are presented according to which the role of IgE⁺ plasma cells and various subpopulations of memory B-lymphocytes in the formation and persistence of the state of sensitization to a harmless allergen differs depending on the model system used or the clinical case under study. Therefore, drugs that target signaling pathways involved in the regulation of both plasma cells and memory B-lymphocytes are especially promising in the treatment of allergic diseases. The authors conclude that the components of the cellular response to oxidative stress and related genotoxic stress and ER stress are the most promising as such targets, since (a) all of them directly or indirectly affect the processes that regulate both of these subpopulations; b) are involved in the process of formation and maintenance of local allergic inflammation. The review presents data pointing to the particular promise of using nanoparticles of noble metals and complexes of rare earth metals of lanthanides in this regard, due to their ability to induce long-term effects in small doses due to changes in the properties of innate immunity cells and long-term accumulation in the body.

Keywords: IgE, B-lymphocytes, asthma, cellular stress, oxidative stress, low molecular weight pharmacological inhibitors, inorganic nanoparticles

УДК 579.017.7

МЕТАКРИЛАТНЫЕ РЕДОКС СИСТЕМЫ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

© 2023 г. О. В. Архипова*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований РАН, Пущино Московской обл., 142290 Россия

*e-mail: aroksan@gmail.com

Поступила в редакцию 21.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

В обзоре проанализированы современные представления об анаэробном типе дыхания с использованием не природного соединения метакрилата в качестве акцептора электронов. Рассматриваются как сами метакрилатные редокс системы, так и анаэробные бактерии, в клетках которых они обнаружены. Эти комплексы состоят из флавиносодержащей редуктазы и мультигемового цитохрома c_3 . Гены компонентов метакрилатных редокс систем разных микроорганизмов гомологичны и организованы в один оперон. Метакрилатвосстанавливающая активность определяется в периплазме. Единственная известная бактериальная акрилатредуктаза, восстанавливающая природное соединение, отличается от метакрилатных редокс систем. Обсуждаются физиологическая роль, происхождение и перспективы исследований уникальной ферментной системы.

Ключевые слова: метакрилатредуктаза, мультигемовый цитохром c , анаэробное дыхание, *Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1^T, *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809^T, *Wolinella succinogenes* DSM 1740^T

DOI: 10.31857/S0555109923060016, **EDN:** CUDALZ

Анаэробные бактерии способны получать энергию в виде АТФ, окисляя при этом субстраты-доноры электронов и используя электронтранспортные цепи (ЭТЦ) и даже разветвлённые ЭТЦ, называемые сетями. ЭТЦ, состоящие из белков-переносчиков, локализованы в цитоплазматических мембранах бактерий. Процесс, осуществляемый ЭТЦ в отсутствие кислорода, называется анаэробным дыханием и называется по субстрату-акцептору электронов. Терминальными акцепторами электронов могут быть как неорганические соединения (нитратное дыхание, нитритное, серное, железистое и т.д.), так и органические (фумаратное дыхание, ферулатное, пентеноатное, уроканатное, акрилатное, метакрилатное). Терминальные редуктазы ЭТЦ согласно международной классификации ферментов относятся к классу 1 (оксидоредуктазы).

Терминальные редуктазы анаэробных бактерий, использующие разные субстраты для катализа, отличаются друг от друга не только функцией, но и размерами, составом (количеством субъединиц, кофакторами), локализацией в клетке. Терминальные редуктазные системы, катализирующие одинаковые или сходные реакции, также могут отличаться друг от друга [1]. Такие редокс системы, восстанавливающие ненасыщенные органические соединения, можно объединить в две группы:

1) флавопротеиновые комплексы, осуществляющие катализ в цитоплазме: кофеатредуктазная система (*Acetobacterium woodii*) [2] и мембранные фумаратредуктазы (*Wolinella succinogenes*, *Escherichia coli*) [3–5]; 2) периплазматические флавиносодержащие ферментные системы: флавоцитохромы с фумаратредуктазы (бактерии рода *Shewanella*) [6–9] и метакрилатредуктазные системы (*Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1, *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809, *Wolinella succinogenes* DSM 1740) [10–13], а также уроканатредуктаза (*Shewanella oneidensis*) [14, 15].

Метакрилатные редокс системы интересны тем, что они катализируют реакцию превращения не природного и токсичного соединения. Целью работы было обобщение данных о бактериях и их ферментных системах, использующих метакрилат в качестве терминального акцептора электронов.

АКРИЛОВАЯ И МЕТАКРИЛОВАЯ КИСЛОТЫ, ИХ ПРОИЗВОДНЫЕ

Акриловая (пропеновая, этенкарбоновая) кислота (табл. 1) является простейшим представителем одноосновных непредельных карбоновых кислот. Акрилат — соединение природное [16, 17], встречается в морской среде. Известно, что с помощью ферментных систем акрилат как образу-

Таблица 1. Акриловая и метакриловая кислоты: производство, применение, встречаемость в природе, токсичность

Характеристика	Акриловая кислота (=пропеновая)	Метакриловая кислота (=2-метилпропеновая)
Формула	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H}_2\text{C}=\text{C}-\text{C} \begin{array}{l} \text{O} \\ \parallel \\ \text{OH} \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Ежегодное производство	1 000 000 т	3 000 000 т (метилметакрилатов)
Применение	Пластики, покрытия, резины, гели, лаки, краски	Пломбировочный материал, протезы, косметологические средства
Наличие в природе	Морской компонент: образуется при расщеплении диметилсульфониопропионата водорослями фитопланктона, аэробными бактериями и <i>Halodesulfobivrio aestuarii</i>	Микроколичества в масле ромашки <i>Anthemis nobilis</i>
Токсичность	Сильное раздражающее и разъедающее действие на кожу и органы дыхания, необратимые травмы глаз, отек легких	Аллергический контактный стоматит, паронихия, онихолизис
ПДК	5 мг/м ³	10 мг/м ³

ется в экосистеме [16, 17], так и подвергается дальнейшим превращениям [18]. По всей видимости, представители морского фитопланктона используют акрилаты для ядовитой защиты от хищников – представителей простейших. Когда хищник атакует фитопланктон, диметилсульфониопропионат-лиаза расщепляет диметилсульфониопропионат (осмолит морских водорослей и некоторых растений) на диметилсульфид и акрилат [16]. Кроме водорослей, к расщеплению диметилсульфониопропионата из морских осадков способны ряд аэробных бактерий и анаэроб *Halodesulfobivrio aestuarii* (ранее *Desulfobivrio acrylicus*) [18]. *H. aestuarii* использует акрилат в качестве терминального акцептора электронов [18]. Терминальная акрилатредуктаза *H. aestuarii* до сих пор не описана, однако есть данные об акрилатредуктазе *ARD Vibrio harveyi* [19].

Метакриловая (2-метилпропеновая) кислота (табл. 1) – соединение синтетическое, в природе практически не встречается. Микроколичества метакрилата на сегодняшний день обнаружены только в масле ромашки римской *Anthemis nobilis*. Кроме того, есть информация об участии метакриловой кислоты или ее производных в ряде метаболических реакций. Например, метакриловая кислота превращается в гидроксизобутират клетками *Pseudomonas putida* [20]. Метакрилат и метилметакрилат вовлечены в образование антибиотика монензина у *Streptomyces cinnamonensis* [21].

Производные акриловой и метакриловой кислот являются крупнотоннажными ксенобиотиками [22]. На их основе выпускаются лаки, краски, смолы, масла, органическое стекло, водорастворимые резины, фотографические эмульсии, зубные

пасты, ортопедические и пломбировочные материалы, пропитка для одежды, упаковочные пленки и пакеты. Широкий спектр применения и у полиметилметакрилатов, особенно в остеклении, средствах передвижения, инструментах [22].

Экологическая опасность акрилатов и их производных обусловлена присутствием этих соединений в отходах химических заводов (например, производящих метакрилатные соединения) и токсичностью этих соединений для человека [22–24]. Генотоксичность метакриловой кислоты и ее производных для млекопитающих, скорее, отсутствует [25]. Однако полиметилметакрилат считается потенциальным канцерогеном [22]. Для человека показано раздражающее действие акрилатов и метакрилатов на кожу и слизистые [22, 23, 26]. Это обусловлено взаимодействием двойных связей обсуждаемых соединений и SH-групп белков клеточных мембран [23]. Известно о цитотоксичном действии мономеров – производных метакрилата на клетки ротовой полости в случае нарушения процесса полимеризации стоматологических композитных смол [27]. Отмечены необратимые травмы глаз [23] и даже астма [22, 28] как следствие контакта с полиметилметакрилатом. Предполагают, что метакрилаты менее токсичны и менее реакционноспособны, чем акрилаты [23].

АНАЭРОБНЫЕ БАКТЕРИИ, ОБЛАДАЮЩИЕ МЕТАКРИЛАТВОССТАНАВЛИВАЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

Периплазматическая метакрилатредуктазная активность. В настоящее время получены экспериментальные доказательства наличия метакрилатвосстанавливающей активности у клеток четырёх

Таблица 2. Метаакрилатвосстанавливающая активность в клетках анаэробных бактерий

Бактерия	Субстрат для роста	Рост культур на ацетате и метакрилате	Скорость восстановления метакрилата (нмоль мин ⁻¹ /1 мг клеточного белка)	Ссылка
<i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1	Ацетат + метакрилат	+	1800	[29]
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	Формиат + фумарат	—	1000	[12]
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	Ацетат + фумарат	—	17	[10]
<i>Denitrovibrio acetiphilus</i> DSM 12809	Ацетат + нитрат	—	130	[10]

грамотрицательных анаэробных представителей трёх классов домена *Bacteria* (табл. 2): *Geobacter sulfurreducens* AM-1 и *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1 из класса *Deltaproteobacteria* [10, 11, 29], *Wolinella succinogenes* DSMZ 1740 из класса *Epsilonproteobacteria* [12] и *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809 из класса *Deferribacteres* [10]. Метаакрилатвосстанавливающая активность найдена в растворимой фракции клеток этих бактерий. Для бактерий *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* обнаружена метакрилатвосстанавливающая активность в экстракте периплазматических белков. Для *W. succinogenes* показано, что метакрилатвосстанавливающей активностью обладают периплазматические белки. Бактерии *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*, окисляющие ацетат, используют его в качестве донора электронов.

В геномах этих четырех микроорганизмов выявлено большое количество генов, кодирующих цитохромы *c* [30–32]. В геноме *G. sulfurreducens* обнаружено 111 генов цитохромов *c* [33, 34], среди них несколько генов мультигеновых цитохромов, имеющих от 4 до 27 генов *C* [33]. В геноме *A. dehalogenans* 2CP-1 найдено 68 генов цитохромов *c* [31]. В геноме *D. acetiphilus* DSM 12809 определено не менее 32 генов цитохромов *c*, среди них 20 генов мультигеновых цитохромов *c*, в том числе один ген 28-генового цитохрома *c*. В геноме *W. succinogenes* DSM 12809 определено 27 генов цитохромов *c*, из которых 7 мультигеновых. В геномах *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* присутствуют гены ферментов цикла Кребса [31–33].

***Wolinella succinogenes*.** Облигатный анаэроб *W. succinogenes*, выделенный из бычьего рубца и различных медицинских образцов тканей человека, способен расти в присутствии доноров электронов, таких как H_2 и формиат, и акцепторов электронов, таких как фумарат, нитрат, нитрит, оксид азота, полисульфид, ДМСО [4, 35–40]. Бактерия *W. succinogenes* долгое время была моделью для изучения фумаратного дыхания и синтеза АТФ в процессе дыхания [4]. Восстановление фумарата

мембранной фумаратредуктазой *W. succinogenes* описано в обзоре 2005 г. [1] как “классический” вариант использования анаэробными бактериями ненасыщенного органического соединения в качестве терминального акцептора дыхательной цепи.

***Anaeromyxobacter dehalogenans*.** Факультативно анаэробная миксобактерия *A. dehalogenans* (класс *Deltaproteobacteria*) была выделена в чистую культуру из почв и осадков [41]. *A. dehalogenans* растет за счет анаэробного дыхания, сочетая окисление ацетата и восстановление нитрата до аммония, с нитритом в качестве промежуточного соединения [41].

A. dehalogenans также использует в качестве донора электронов сукцинат, пируват, формиат и водород, а в качестве акцепторов — галогенфенолы, нитрат, нитрит, оксид азота N_2O , фумарат, гуминовые вещества, кислород, Fe(III), U(VI), Se(IV) [41–45]. Бактерии рода *Anaeromyxobacter* преобладают в сообществах бактерий, осуществляющих диссимиляционную нитратредукцию в водных экосистемах рек или заболоченных территорий [46, 47]. Показано, что *Anaeromyxobacter* spp. осуществляет азотфиксацию при окислении арсената As(III) в As(V) в речных отложениях, загрязненных солями мышьяковой кислоты [48].

***Denitrovibrio acetiphilus*.** Морская бактерия *D. acetiphilus* DSM 12809 (класс *Deferribacteres*) была получена в чистую культуру из модельной экосистемы, которая находилась в нефтяном резервуаре, продуцировала сероводород и была обработана богатой нитратами искусственной морской водой [49]. Подобно *A. dehalogenans*, *D. acetiphilus* способен к анаэробному дыханию с помощью сопряжения окисления ацетата и нитратредукции, с образованием нитрита в качестве интермедиата [49].

D. acetiphilus может сбрасывать фумарат [49]. Первое время после описания микроорганизма нитрат считался единственным терминальным акцептором электронов для роста *D. acetiphilus* на ацетате. Позднее в геноме *D. acetiphilus* [32] были найдены гены предполагаемых дыхательных редуктаз [50]. На основании знаний об этих генах был продемонстрирован рост *D. acetiphilus* на аце-

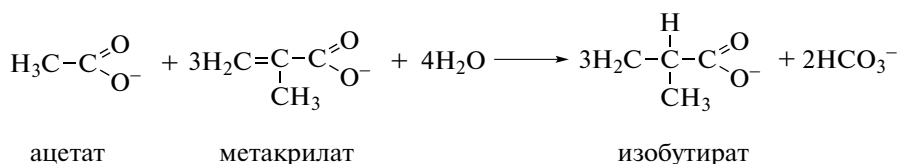


Рис. 1. Окисление ацетата при одновременном превращении метакрилата в изобутират бактерией *Geobacter sulfurreducens* AM-1 [71].

тате и As(V) (NaAsO_2), Se(VI) (Na_2SeO_4) и диметилсульфоксиде в качестве акцепторов электронов [50]. Один из обнаруженных генов, по-видимому, кодирует дыхательную арсенатредуктазу ArrA [50].

***Geobacter sulfurreducens*.** Интерес к бактериям рода *Geobacter* связан с их ключевой ролью в глобальном круговороте углерода, поскольку они наиболее многочисленные Fe(III)-восстанавливающие микроорганизмы почв и осадков [51]. Жизнедеятельность этих бактерий сопряжена с внеклеточным переносом электронов (extracellular electron transfer — EET) [52, 53] и прямым межвидовым переносом электронов (direct interspecies electron transfer — DIET) [54] к метаногенам в природных и искусственных экосистемах [55–57].

Бактерии рода *Geobacter* способны проводить электрический ток [58, 59]. *G. sulfurreducens* полностью окисляет органические доноры электронов до углекислого газа при использовании электрода в качестве единственного акцептора электронов, что позволяет считать эту бактерию экзoeлектрогеном [51, 60–62]. Кроме того, *G. sulfurreducens* может быть электротрофом [58, 59]: он восстанавливает нитрат до нитрита или фумарат до сукцината с помощью графитового электрода, служащего донором электронов [51].

Способность *G. sulfurreducens* к переносу электронов и электропроводности обусловлена образованием у них микрометровых нанопроволок [53, 63, 64]. С помощью нанопроволок осуществляется прямой внеклеточный транспорт электронов (DEET — direct extracellular electron transfer) между клетками [62, 64–66]. Существуют два мнения относительно состава нанопроволок: 1) это белковые цепочки из мономеров белка пилина PilA с высоким содержанием ароматических аминокислот [51, 53]; 2) это цитохромовые нити из гексагемовых цитохромов OmcS [51, 52, 59, 63, 67, 68]. Структура и состав электропроводящих нанопроволок — предмет продолжающихся исследований. Факты же соединения бактерий друг с другом и передачи электронов с помощью нанопроволок не подвергаются сомнениям [53].

Типовой штамм *Geobacter sulfurreducens* PCA^T (класс *Deltaproteobacteria*) был выделен в чистую культуру из поверхностных осадков канавы, загрязненной углеводородами [69]. Установлено,

что штамм PCA^T растет на формиате, ацетате и водороде в качестве донора электронов и пиррофосфате железа, оксигидроксиде железа, цитрате железа, элементарной сере, Co(III)-EDTA, фумарате или малате в качестве единственного акцептора электронов [69, 70]. Штамм AM-1 бактерии *G. sulfurreducens* был выделен в чистую культуру из гранулированного ила UASB-реактора [71], разлагающего отходы метакрилатных производств до метана с помощью анаэробного сообщества бактерий [72, 73]. *G. sulfurreducens* AM-1 использует синтетический метакрилат, а, кроме того, фумарат, малат, Fe(III) и S(0) в качестве терминального акцептора электронов в дыхательной цепи бактерии [71]. Донором электронов при росте с помощью метакрилатного дыхания может быть ацетат, формиат или молекулярный водород [71]. Таким образом, *G. sulfurreducens* AM-1 растет на ацетате (донор) и метакрилате (акцептор) и обозначен, как AM-1 (рис. 1) [71].

В настоящее время рост на ацетате и метакрилате показан только для *G. sulfurreducens* AM-1 [29, 71]. Попытки вырастить культуры *W. succinogenes*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphylus* на метакрилате в качестве терминального акцептора электронов не увенчались успехом [10, 12]. Вместе с тем ферментативная метакрилатвосстанавливающая активность у клеток *W. succinogenes*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphylus* была обнаружена [10, 12]. Различия в способности этих бактериальных клеток расти на метакрилате и восстанавливать метакрилат — показатель сложности организации метакрилатвосстанавливающей системы и ее регуляции.

Экспериментально доказано, что ацетат и в клетках типового штамма *G. sulfurreducens* PCA^T, и в клетках штамма *G. sulfurreducens* AM-1 дегидрируется с помощью цикла Кребса [11, 74]. ЦТК у *G. sulfurreducens* оказывается замкнутым в цикл (рис. 2) в двух случаях: 1) если *G. sulfurreducens* использует в качестве терминального акцептора метакрилат [11], 2) если *G. sulfurreducens* растет в синтрофной ассоциации с *W. succinogenes* [74, 75]. Когда *G. sulfurreducens* растет, используя в качестве терминального акцептора фумарат, ацетат окисляется через неполный ЦТК, в котором отсутствует сукцинатдегидрогеназа [74].

Мембраны бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 содержат менахинон-8 (менахинон с 8 остатками

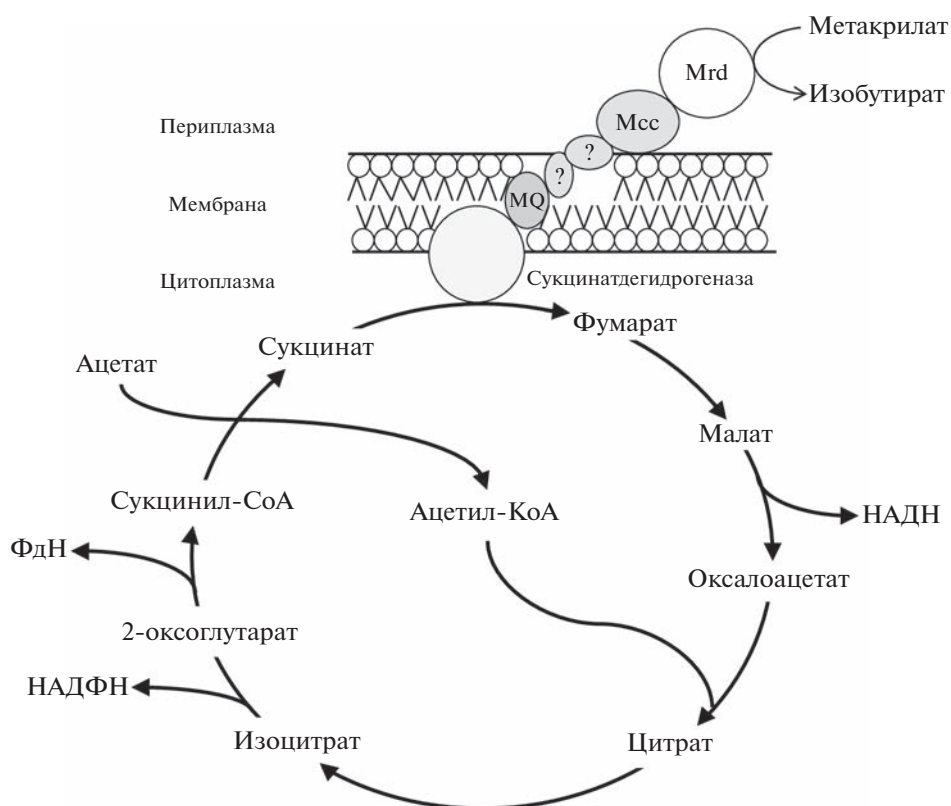


Рис. 2. Метаболизм *Geobacter sulfurreducens* AM-1, растущего на ацетате в качестве донора электронов и метакрилате в качестве акцептора электронов [11].

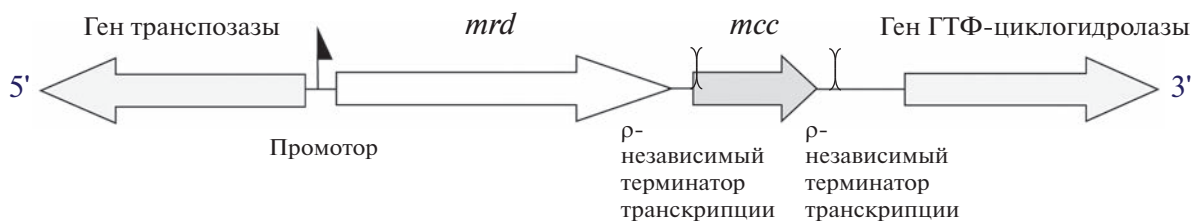


Рис. 3. Организация оперона метакрилатной редокс системы у *Geobacter sulfurreducens* AM-1 [77].

изопрена в боковой цепи) [11]. Восстановительные эквиваленты поступают в дыхательную цепь, локализованную во внутренней мембране бактериальной клетки. Они могут направляться от НАДФН в хиноновый пул через НАДФН: менахинон оксидоредуктазу [11]. Электроны от менахинона через неустановленный переносчик передаются периплазматическим белкам метакрилатной редокс-системы (рис. 2). Кандидатами на роль переносчика электронов от менахинона к компонентам этой редокс системы могут быть периплазматические цитохромы *c* (12.5 и 15.5 кДа) и мембранный цитохром *c* (67.6 кДа) [76].

БЕЛКИ МЕТАКРИЛАТНЫХ РЕДОКС СИСТЕМ И ИХ ГЕНЫ

Две субъединицы метакрилатных редокс систем. Метакрилатная редокс система у *G. sulfurreducens* AM-1, а также, вероятно, у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* состоит из двух хромопротеидов (табл. 3, 4): Mrd (ФАД-содержащей метакрилатредуктазы) и Msc (мультигетового цитохрома *c*) [11, 77]. Причем Msc служит физиологическим донором электронов для Mrd [11]. Гены метакрилатных редокс систем (*mrd* и *mcs*) *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* имеют высокое сходство и организованы в один оперон (рис. 3) [77].

Таблица 3. (Мет)акрилатредуктазные активности анаэробных бактерий

Организм	(Мет)акрилатная редокс система	Метакрилатредуктазная активность				Акрилатредуктазная активность			
		очищенные препараты белков	целые клетки	фракция белков периплазмы	растворимая фракция клеток	очищенные препараты белков	целые клетки	фракция белков периплазмы	растворимая фракция клеток
<i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1	Периплазматические Mrd, Mcc	+	+	+	+	+	Н.о.	Н.о.	Н.о.
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	Периплазматические FccA, FccB	Н.о.	+	Н.о.	+	Н.о.	+	Н.о.	+
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> 2CP-1	Периплазматические Mrd _A , Mcc _A	Н.о.	+	+	Н.о.	Н.о.	–	–	Н.о.
<i>Denitrovibrio acetiphilus</i> DSM 12809	Периплазматические Mrd _D , Mcc _D	Н.о.	+	+	Н.о.	Н.о.	–	–	Н.о.
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 33843	Цитоплазматический ARD	+	Н.о.	Н.о.	Н.о.	+	+	Н.о.	Н.о.

Примечание: + – наличие ферментативной активности; – отсутствие ферментативной активности; Н.о. – не определяли.

Таблица 4. Белки метакрилатной редокс системы *Geobacter sulfurreducens* AM-1

Характеристика	Метакрилатредуктаза Mrd	Цитохром с Mcc
Кажущаяся молекулярная масса	50 кДа	30 кДа
Молекулярная масса незрелого белка	57.1 кДа	24.5 кДа
Молекулярная масса зрелого белка	51.4 кДа	22.1 кДа
Молекулярная масса зрелого белка с небелковым компонентом	52.2 кДа	26.9 кДа
Длина незрелого белка	526 аминокислот	231 аминокислота
Отщепляемый сигнальный пептид	Типа Tat 55 аминокислот	Типа Sec 23 аминокислоты
Небелковый компонент	1 молекула нековалентно связанного ФАД	7 гемов С
Предполагаемый компартмент, в котором происходит приобретение третичной структуры	Цитоплазма	Периплазма

Оба компонента метакрилатной редокс системы Mrd и Mcc у *G. sulfurreducens* AM-1 были получены в чистом виде и охарактеризованы (рис. 4) [11]. Максимальная активность метакрилатной редокс системы наблюдалась, когда оба белка присутствовали в молярном соотношении ≈1 : 1 [11]. Кроме восстановления метакрилата, редокс система катализировала восстановление других α, β-ненасыщенных карбоновых кислот, таких как акрилат, кротонат и пентеноат. Акрилат восстанавливался со скоростью, сравнимой с таковой восстановления метакрилата. Активность восстановления кротоната и пентеноата была на порядок ниже скорости восстановления акрилата и метакрилата. Для метакрилатной редокс системы

G. sulfurreducens AM-1 не была обнаружена способность восстанавливать фумарат и производные коричной кислоты ферулат и кофеат [11].

Предполагается, что продукты генов *mrd* и *mcc* *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus*, как и Mrd и Mcc *G. sulfurreducens* AM-1, имеют консервативные участки и синтезируются с отщепляемыми сигнальными последовательностями, обеспечивающими периплазматическую локализацию обоих белков [77]. Наличие сигнальных пептидов разных типов (типа Tat у Mrd и типа Sec у Mcc) свидетельствует о разных механизмах биогенеза обоих белков. Укладка белковой глобулы Mrd и нековалентное присоединение флавина к Mrd, по всей видимости, осуществляется в цитоплазме клетки.

Синтезированный апоцитохром Мсс, очевидно, преодолевает цитоплазматическую мембрану до приобретения им третичной структуры, гемы С присоединяются к белковой молекуле в периплазме.

Активность восстановления метакрилата у *W. succinogenes* обеспечивается функционированием продуктов оперона *fccABC* [12, 13]. Этот оперон кодирует синтез двух периплазматических белков FccA и FccB, а также расположенного во внутренней мембране FccC. FccA содержит в качестве протетической группы 1 молекулу ФАД, а FccB и FccC — по четыре гема С [13]. Незрелый белок FccA состоит из 515 аминокислот, причем 34 из них образуют отщепляемый сигнальный пептид типа Tat [13]. По размеру и аминокислотной последовательности зрелый белок FccA имеет сходство с С-концевой частью Fcc₃ из *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400 [13] и Mrd из *G. sulfurreducens* AM-1 [77]. Незрелый белок FccB содержит 146 аминокислот, 26 из них составляют отщепляемый сигнальный пептид типа Sec [13]. По размеру и аминокислотной последовательности зрелый белок FccB имеет сходство с N-концевой частью Fcc₃ из *S. frigidimarina* NCIMB 400 [13] и Мсс из *G. sulfurreducens* AM-1 [77]. Предполагается, что четырехгемовый FccC имеет N-концевую гидрофобную спираль, которая закрепляет белок в мембране [13]. Представлены результаты, подтверждающие, что восстановление метакрилата и акрилата у *W. succinogenes* катализирует периплазматический флавопротеин FccA или комплекс периплазматических флавопротеина FccA и тетрагемового цитохрома с FccB [12, 13].

Менахинол:цитохром с оксидоредуктаза — возможное звено метакрилатной дыхательной цепи. Аминокислотная последовательность белка FccC *W. succinogenes* имеет высокое сходство с последовательностями цитохромов с семейства белков NirT/NapC и, в частности, гомологична таковой белка СумА *Shewanella oneidenis* MR-1 [13]. Белки семейства NirT/NapC отвечают за перенос электронов от пула хинонов к редуктазам, локализованным в периплазме или связанным с внешней мембраной. Цитохром с СумА *S. oneidenis* MR-1 состоит из 187 аминокислот и имеет молекулярную массу 21 кДа [78]. Как и FccC *W. succinogenes*, СумА *S. oneidenis* имеет N-концевую гидрофобную α -спираль, удерживающую белок в мембране, и глобулярный четырехгемовый периплазматический домен [78]. Три из четырех гемов типа С — низкоспиновые, каждый из них координирован двумя остатками гистидина, редокс потенциалы низкоспиновых гемов равны -110 , -190 , -265 мВ [79]. Четвертый гем — высокоспиновый, расположен около хинолсвязывающего сайта, координирован в дистальной позиции молекулой воды, его редокс потенциал равен -240 мВ [79, 80].

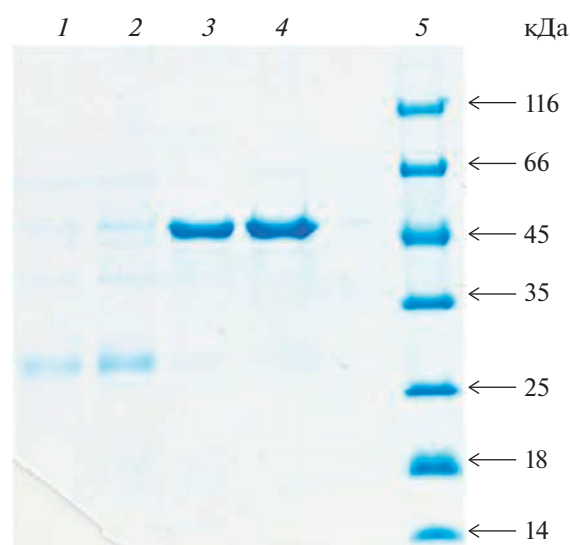


Рис. 4. Электрофоретически гомогенные препараты метакрилатредуктазы Mrd и цитохрома с Мсс из *Geobacter sulfurreducens* AM-1: 1, 2 — Мсс (1 и 2 мкг соответственно), 3, 4 — Mrd (2.5 и 5 мкг соответственно), 5 — маркеры молекулярной массы.

СумА играет центральную роль в анаэробном дыхании *S. oneidenis* MR-1 в качестве хаба для переноса электронов в периплазматическую редокс сеть. Он собирает электроны от менахинонового пула в цитоплазматической мембране бактерии и распределяет их между периплазматическими белками (мультигемовыми цитохромами с), среди которых как терминальные редуктазы, так и периплазматические редокс шаттлы, переносящие электроны к терминальным редуктазам [78, 79, 81–83]. СумА использует менахинон-7 (MQ-7) в качестве субстрата и кофактора для превращения хинонов, в том числе и отличных от MQ-7 [84]. По всей видимости, СумА имеет сложную систему регулирования переноса электронов к определенным редуктазам. Так, например, образование стабильного комплекса между СумА и периплазматической фумаратредуктазой Fcc₃ меняет направление катализа и перенос электронов в сторону окисления MQ-7, т.е. на противоположное по сравнению с этими же процессами у индивидуального СумА [85]. СумА участвует в восстановлении Fe(III), Mn(IV), нитрата, нитрита, фумарата, диметилсульфоксида, O₂ у *S. oneidenis* MR-1 [78, 81–83, 86, 87]. Кроме того, получены результаты о функционировании СумА *S. oneidenis* в качестве терминальной редуктазы нитроароматических соединений (например, дихлорнитробензола) и азокрасителей [88].

Таким образом, недостающим звеном, обозначенным на рис. 2 вопросительным знаком, поставляющим восстановительные эквиваленты белкам метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens*,

Таблица 5. Субстратная специфичность периплазматических метакрилатных редокс систем и цитоплазматической акрилатредуктазы

Организм	Образец, в котором была определена активность	K_m к метакрилату, мкМ	K_m к акрилату, мкМ	Ссылка
<i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1	Очищенные препараты метакрилатной редокс системы Mrd и Msc	80	100	[11]
<i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740	Гомогенаты клеток, содержащие FccA, FccB и FccC	230	500	[12]
<i>Vibrio harveyi</i> ATCC 33843	Очищенный препарат акрилатредуктазы ARD	690	16	[19]

может оказаться переносчик — менахинол : цитохром *c* оксидоредуктаза, похожий на хаб СумА электронтранспортной сети *S. oneidensis*.

АКРИЛАТРЕДУКТАЗА

Обладающий акрилатредуктазной активностью фермент ARD (табл. 3) был выделен и охарактеризован в результате гетерологической экспрессии гена *ard* *Vibrio harveyi* ATCC 33843 в клетках *E. coli* [19]. Выбор этой цитоплазматической НАДН-зависимой флавиноксидоредуктазы (GenBank ID: AIV07243) для работы был обоснован неизвестной субстратной специфичностью предполагаемого фермента и наличием в аминокислотной последовательности белка домена *FAD_binding_2* (Pfam ID: PF00890), который содержит фумаратсвязывающий сайт [19]. Мономерный фермент состоит из 1004 аминокислот, имеет молекулярную массу 95 кДа. На 1 моль белка приходится 1 моль нековалентно связанного ФАД, 1 моль нековалентно связанного ФМН и 1 моль ковалентно связанного ФМН. Локализован ARD, судя по отсутствию отщепляемого сигнального пептида у продукта гена, в цитоплазме. Синтез мРНК *ard* бактерией *V. harveyi* стимулировался присутствием 2 мМ акрилата в среде культивирования, содержащей сахарозу и дрожжевой экстракт в качестве субстратов для роста, как в аэробных условиях, так и в анаэробных [19]. В качестве субстрата ARD использовал еще и метакрилат, проявляя 15.5% от акрилатредуктазной активности. Было показано, что НАДН является непосредственным донором электронов для ARD. ARD проявлял минимальную активность с фумаратом и кротонатом и не использовал уроканат и циннамат в качестве субстратов для проявления активности.

Безусловно, ARD из всех известных (мет)акрилатредуктаз — фермент, проявляющий наибольшее сродство к такому субстрату как акрилат (табл. 5). Но способность *V. harveyi* расти на акрилате в качестве акцептора электронов, используя цитоплазматический фермент в качестве терминальной редуктазы, нужно подтвердить экспери-

ментально. *V. harveyi* обитает в морях и способен как к брожению, так и анаэробному дыханию [19, 89]. Акрилат, будучи природным компонентом морских экосистем [16, 17], в концентрации более 2 мМ значительно ингибирует рост бактерии [19]. Наиболее вероятная физиологическая функция ARD — детоксикация акрилата.

МЕТАКРИЛАТНАЯ РЕДОКС СИСТЕМА — ФЛАВОЦИТОХРОМ *c*

Метакрилатные редокс системы — как экспериментально исследованные у *G. sulfurreducens* AM-1 и *W. succinogenes*, так и предполагаемые у *A. dehalogenans* и *D. acetiphilus* — периплазматические. Они состоят, по-видимому, из флавиносодержащей субъединицы и мультигемового цитохрома *c*. Тесное взаимодействие флавопротеинов и гемсодержащих белков всех известных и потенциальных метакрилатных редокс систем закреплено генетически: их гены организованы в один оперон. Это является основанием для того, чтобы считать метакрилатные редокс системы флавоцитохромами *c* — необычной группой редокс белков бактерий [90–93]. Для флавоцитохромов *c* характерна тесная связь между гемсодержащей и флавиносодержащей составляющими [90]. У каждой из субъединиц флавоцитохрома *c* есть свой редокс центр, связанный с пептидной цепью [90]. Среди флавоцитохромов *c* отмечены как белковые комплексы из двух или нескольких субъединиц [91, 92], так и мономеры [7, 94].

Для флавоцитохромов *c* показаны разные ферментативные активности (табл. 6). Например, флавоцитохромы *c* фотосинтезирующих пурпурной серной бактерии *Allochrochromatium vinosum* [95–97] и зеленой серной бактерии *Chlorobium thiosulfatophilum* [95], гетеротрофной бактерии *Cupriavidus necator* H16 [98] и галофильной бактерии *Thioalkalivibrio paradoxus* [99] обладают сульфид:цитохром *c* — оксидоредуктазной активностью (Fcc, флавоцитохром *c* сульфиддегидрогеназа). Они катализируют превращение сульфида в элементарную серу, что сопровождается переносом электро-

Таблица 6. Ферментативные активности флавоцитохромов с анаэробных бактерий

Ферментативная активность	Флавоцитохром с	Микроорганизм	Ссылки
Сульфид:цитохром с – оксидоредуктазная	ФссВ (46 кДа; 1 молекула ковалентно связанного ФАД) и ФссА (21 кДа; 2 гема С)	<i>Allochrodatum vinosum</i>	[95–97]
Флавоцитохром с <i>p</i> -крезол-метилгидроксилазная	две субъединицы (48 кДа каждая; 1 молекула ковалентно связанного ФАД у каждой) и две субъединицы цитохрома с (9 кДа каждый)	Несколько видов псевдомонад	[90, 91, 102]
Фумаратредуктазная	Фсс ₃ (63.4 кДа; 1 моль ковалентно связанного ФАД, 4 моль гемов С)	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	[103]
Фумаратредуктазная <i>in vitro</i>	Фсс ₃ (65 кДа; 1 моль ковалентно связанного ФАД, 4 моль гемов С)	<i>Shewanella oneidenis</i> MR-1	[105]
Фумаратредуктазная <i>in vitro</i>	Ifc ₃ (63.9 кДа; 1 моль ковалентно связанного ФАД, 4 моль гемов С)	<i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400	[104]
Метакрилатредуктазная, акрилатредуктазная	Mrd (52.2 кДа; 1 молекула нековалентно связанного ФАД) и Мсс (26.9 кДа; 7 гемов С)	<i>Geobacter sulfurreducens</i> AM-1	[11, 77]

нов на цитохром с [98, 99]. Периплазматический растворимый гетеродимер Фсс у этих организмов состоит из двух субъединиц: более крупного, сульфидсвязывающего, флавопротеина ФссВ и цитохрома с ФссА [92, 95–98, 100]. У *A. vinosum* флавопротеин ФссВ имеет молекулярную массу 46 кДа и содержит 1 молекулу ковалентно связанного ФАД, цитохром с ФссА имеет молекулярную массу 21 кДа и содержит две молекулы гема С [90, 91, 95, 101].

Флавоцитохром с *p*-крезол-метилгидроксилаза [90, 91, 102], найденная в периплазме у нескольких видов псевдомонад, катализирует окисление *p*-крезола в *p*-гидроксибензиловый спирт и затем в гидроксибензальдегид [90, 91, 102]. Этот флавоцитохром является гетеротетрамером (116 кДа), состоящим из двух флавопротеиновых субъединиц, 48 кДа каждая и двух субъединиц цитохрома с, 9 кДа каждая [90, 91]. Флавопротеиновые субъединицы содержат ковалентно связанный ФАД.

Фумаратредуктазные активности показаны для трех растворимых флавоцитохромов с двух видов бактерий-железоредакторов рода *Shewanella* [6–9, 94]: для периплазматических Фсс₃ и Ifc₃ из *S. frigidimarina* NCIMB 400 [103, 104] и Фсс₃ из *S. oneidenis* MR-1 [105]. Эти флавоцитохромы с Фсс₃ и Ifc₃ из *S. frigidimarina* и Фсс₃ из *S. oneidenis* имеют нековалентно связанный ФАД (1 моль ФАД на 1 моль белка), 4 гемсвязывающих центра и синтезируются с N-концевой секреторной сигнальной последовательностью типа Sec [7, 104, 10]. Физиологической активностью для флавоцитохрома Ifc₃, восстанавливающего фумарат только *in vitro*, считается восстановление железа [94, 104]. Кри-

сталлы растворимых фумаратредуктаз шеванелл показали наличие трех доменов в структуре: небольшого N-концевого тетрагемового домена, С-концевого домена с нековалентно связанным ФАД и домена-“зажима”, контролирующего доступность активного сайта для субстрата [9].

Все упомянутые флавоцитохромы с шеванелл являются гомологами как Mrd, так и Мсс метакрилатной редокс системы *G. sulfurreducens* AM-1 [77]. Компьютерным моделированием пространственной структуры Mrd и Мсс *G. sulfurreducens* AM-1 было показано их высокое структурное сходство с растворимыми фумаратредуктазами *Shewanella* [106]. Флавопротеин Mrd и по последовательности, и по структуре повторяет два каталитических домена С-конца трех флавоцитохромов с *Shewanella*. Мультигемовый цитохром с Мсс и по последовательности, и по структуре сходен с малым N-концевым гемсодержащим доменом фумаратредуктаз *Shewanella*. Значительное сходство этих белков, по всей видимости, обеспечивается общностью их происхождения, эволюции и природных функций.

Физиологическая роль всех упомянутых флавоцитохромов с – предмет дискуссий [92, 97, 99]. Наличие же ферментативных активностей у отмеченных флавоцитохромов с бесспорно.

РОЛЬ И ПРОИСХОЖДЕНИЕ МЕТАКРИЛАТНОЙ РЕДОКС СИСТЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Таким образом, ферментативная активность восстановления синтетического соединения метакрилата показана для клеток анаэробных бакте-

рий *G. sulfurreducens* AM-1, *A. dehalogenans* 2CP-1, *W. succinogenes* DSMZ 1740 и *D. acetiphilus* DSM 12809 (табл. 2–5). Эта активность в двух, а вероятно, и во всех четырех случаях обусловлена функционированием периплазматических двухкомпонентных флавоцитохромов *c* (табл. 3), состоящих из ФАД-содержащей субъединицы и мультимерового цитохрома *c*. Определение объективной роли и происхождения подобных ферментных комплексов — одни из основных задач исследования дыхательных редокс систем.

Метакрилатная редокс система является представителем обширного семейства флавоцитохромов *c* и других флавопротеинов, имеющих редуктазную активность [77]. Среди гомологов белков метакрилатной редокс системы — периплазматический флавоцитохром *c* Fcc₃, являющийся дыхательной фумаратредуктазой у *S. oneidenis*. В геноме у *S. oneidenis* обнаружены гены 42 потенциальных цитохромов *c*, среди них несколько мультимеровых цитохромов *c*, содержащих до 10 гемов [94]. Периплазматические флавоцитохромы *c* многофункциональны [107]. Кроме участия в фумаратном дыхании [9], они служат переносчиками электронов при преодолении периплазмы и временными узлами, накапливающими электроны, для таких типов дыхания, когда в качестве акцептора электронов используется металл, нитрат или диметилсульфоксид [107]. Основной ролью растворимого флавоцитохрома *c* Fcc₃ из *S. oneidenis*, вероятно, является работа в качестве периплазматического узлового центра накопления, распределения и перемещения электронов между цитоплазматической и внешней мембранами [52, 63, 94, 107]. Выявленное компьютерным моделированием высокое структурное сходство Fcc₃ *S. oneidenis* и белков метакрилатной редокс системы Mrd и Mcc *G. sulfurreducens* [106] — аргумент общности эволюции и функций этих флавоцитохромов *c*. Таким образом, главной природной функцией обсуждаемых метакрилатных редокс систем может оказаться электронтранспортная. Факт отсутствия у других представителей рода *Geobacter* оперона, содержащего *mrd* и *mcc* [77], придает бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 исключительность и позволяет предполагать у AM-1 новые свойства, обусловленные функционированием электронтранспортного узла из двух хромопротеидов в периплазме бактерии.

Родство белков метакрилатной редокс системы с флавопротеинами с ферментативной активностью — аргумент в пользу каталитической роли метакрилатной редокс системы [77]. Но метакрилат — соединение неприродное. Природным субстратом как периплазматических метакрилатредуктазных комплексов *G. sulfurreducens*, *A. dehalogenans*, *W. succinogenes* и *D. acetiphilus*, так и цитоплазматической акрилатредуктазы ARD из *V. harveyi* [19] мог бы оказаться образуемый в морской экоси-

стеме акрилат [16, 17]. Это предположение подтверждается: 1) сравнимыми скоростями восстановления метакрилатной редокс системой *G. sulfurreducens* акрилата и метакрилата [11]; 2) более высоким сродством ARD к акрилату, чем к метакрилату (табл. 5) [19]. Восстановление метакрилата может являться одним из дополнительных свойств этих редуктаз. Как и в случае с дыхательными фумаратредуктазами анаэробных бактерий, предполагаемые акрилатредуктазы могли бы быть как внутриклеточными (цитоплазматическими подобно ARD), так и периплазматическими (как у *G. sulfurreducens* AM-1, *A. dehalogenans* 2CP-1, *W. succinogenes* DSMZ 1740 и *D. acetiphilus* DSM 12809). В таком случае логично полагать, что эти акрилатредуктазы возникли в процессе эволюции как адаптационный механизм, трансформирующий токсичный акрилат в менее токсичные соединения. Однако отсутствие акрилатредуктазной активности как в целых клетках, так и в периплазматических фракциях бактерий *A. dehalogenans* 2CP-1 и *D. acetiphilus* DSM 12809 (табл. 3) [10] не подтверждает выдвинутое предположение об акрилате как физиологическом акцепторе электронов для белков метакрилатной редокс системы.

Природными функциями метакрилатной редокс системы могут оказаться одновременно обе обсуждаемые: и ферментативная (восстанавливающая пока неизвестное природное соединение с двойными связями или даже акрилат), и транспортирующая электроны. Комбинация процессов естественного мутагенеза флавоцитохромов *c* и флавопротеинов, а также горизонтального переноса генов могли привести к появлению метакрилатной редокс системы и дать бактерии *G. sulfurreducens* AM-1 адаптивное преимущество при росте в метаногенных сообществах микроорганизмов, очищающих отходы метакрилатных производств [71–73].

Исследования метакрилатных редокс систем анаэробных бактерий продолжаются. Для дальнейшего изучения хромопротеидов метакрилатредуктазного комплекса должны быть налажены процедуры получения рекомбинантных белков Mrd и Mcc в клетках хозяев-аэробов. Предстоит преодолеть проблемы продукции рекомбинантного анаэробного мультимерового цитохрома *c*, чтобы достичь корректной пост-трансляционной модификации (присоединение гемов) в периплазме. Получение рекомбинантных хромопротеидов Mrd и Mcc потенциально могло бы способствовать разработке препарата для очистки объектов окружающей среды от токсичных ненасыщенных органических соединений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор искренне признателен Трошиной О.Ю. (ИБФМ РАН) и Микулинской Г.В. (ФИБХ РАН) за конструктивное обсуждение рукописи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

В данной публикации отсутствует информации, которая могла бы послужить причиной для конфликта научных интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arkhipova O.V., Akimenko V.K. // Microbiology (Moscow). 2005. V. 74. P. 629–639.
2. Hess V., González J.M., Parthasarathy A., Buckel W., Müller V. // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. P. 1942–1947.
3. Hägerhäll C. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1320. P. 107–141.
4. Kröger A., Biel S., Simon J., Gross R., Unden G., Lancaster C.R.D. // Biochim. Biophys. Acta. 2002. V. 1553. P. 23–38.
5. Iverson T. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1827. P. 648–657.
6. Morris C.J., Black A.S., Pealing S.L., Manson F.D.C., Chapman S.K., Reid G.A., Gibson D.M., Ward F.B. // Biochem. J. 1994. V. 302. P. 587–593.
7. Pealing S.L., Black A.S., Manson F.D.C., Ward F.D., Chapman S.K., Reid G.A. // Biochemistry. 1992. V. 32. № 48. P. 12132–12140.
8. Pealing S.L., Cheesman M.R., Reid G.A., Thomson A.J., Ward F.B., Chapman S.K. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 18. P. 6153–6158.
9. Reid G.A., Miles C.S., Moysey R.K., Pankhurst K.L., Chapman S.K. // BBA. 2000. V. 1459. № 2–3. P. 310–315.
10. Arkhipova O.V., Biryukova E.N., Abashina T.N., Khokhlova G.V., Ashin V.V., Mikoulinskaia G.V. // Microbiology (Moscow). 2019. V. 88. № 2. P. 137–145.
11. Mikoulinskaia (Arkhipova) O., Akimenko V., Galushko A., Thauer R.K., Hedderich R. // Eur. J. Biochem. 1999. V. 263. № 2. P. 346–352.
12. Gross R., Simon J., Kröger A. // Arch. Microbiol. 2001. V. 176. P. № 4. P. 310–313.
13. Simon J., Gross R., Klimmek O., Ringel M., Kröger A. // Arch. Microbiol. 1998. V. 169. № 5. P. 424–433.
14. Bogachev A.V., Bertsova Y.V., Bloch D.A., Verkhovsky M.I. // Mol. Microbiol. 2012. V. 86. № 6. P. 1452–1463.
15. Venskutonytė R., Koh A., Stenström O., Khan M.T., Lundqvist A., Akke M., et al. // Nat. Commun. 2021. V. 12. № 1. 1347. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21548-y>
16. Curson A.R.J., Todd J.D., Sullivan M.J., Johnston A.W.B. // Nat. Rev. Microbiol. 2011. V. 9. № 12. P. 849–859.
17. Curson A.R.J., Burns O.J., Voget S., Daniel R., Todd J.D., McInnis K., Wexler M., Johnston A.W.B. // PLoS One. 2014. V. 9. № 5. e97660.
18. Van der Maarel M.J.E.C., van Bergeijk S., van Werkhoven A.F., Laverman A.M., Meijer W.G., Stam W.T., Hansen T.A. // Arch. Microbiol. 1996. V. 166. P. 109–115.
19. Bertsova Y.V., Serebryakova M.V., Baykov A.A., Bogachev A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 2022. V. 88. № 11. <https://doi.org/10.1128/aem.00519-22>
20. Aberhart D.J., Tann C.-H. // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1979. V. 4. P. 939–942.
21. O'Hagan D., Rogers S.V., Duffin G.R., Reynolds K.A. // J. Antibiot. 1995. V. 48. № 11. P. 1280–1287.
22. Stickler M., Rhein T. Polymethacrylates. // Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2012. V. 29. P. 342–353.
23. Greim H., Ahlers J., Bias R., Broecker B., Hollander H., Gelbke H.P. et al. // Chemosphere. 1995. V. 31. № 2. P. 2637–2659.
24. Piirilä P., Hodgson U., Estlander T., Keskinen H., Saalo A., Voutilainen R., Kanerva L. // Int Arch. Occup. Environ. Health. V. 75. № 4. P. 209–216.
25. Albertini R.J. // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2017. V. 84. P. 77–93.
26. Kimber I., Pemberton M.A. // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2014. V. 70. № 1. P. 24–36.
27. Krifka S., Spagnuolo G., Schmalz G., Schweikl H. // Biomaterials. 2013. V. 34. № 19. P. 4555–4563.
28. Walters G.I., Robertson A.S., Moore V.C., Burge P.S. // Occup. Med. 2017. V. 67. № 4. P. 282–289.
29. Галушко А.С., Микулинская (Архипова) О.В., Лауринавичюс К.С., Образцова А.Я., Акименко В.К. // Микробиология. 1996. Т. 65. № 4. С. 495–498.
30. Baar C., Eppinger M., Raddatz G., Simon J., Lanz C., Klimmek O. et al. // PNAS. 2003. V. 100. № 20. P. 11690–11695.
31. Thomas S.H., Wagner R.D., Arakaki A.K., Skolnick J., Kirby J.R., Shimkets L.J., Sanford R.A., Löffler F.E. // PLoS One. 2008. V. 3. № 5. e2103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002103>
32. Kiss H., Lang E., Lapidus A., Copeland A., Nolan M., Del Rio T.G. et al. // Stand. Genomic Sci. 2010. V. 2. P. 270–279.
33. Methé B.A., Nelson K.E., Eisen J.A., Paulsen I.T., Nelson W., Heidelberg J.F. et al. // Science. 2003. V. 302. № 5652. P. 1967–1969.
34. Fernandes T.M., Morgado L., Turner D.L., Salgueiro C.A. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 844. <https://doi.org/10.3390/antiox10060844>
35. Wolin M.J., Wolin E.A., Jacobs N.J. // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 6. P. 911–917.
36. Kafkewitz D., Goodman D. // Appl. Microbiol. 1974. V. 27. № 1. P. 206–209.
37. Smibert R.M., Holdeman L.V. // J. Clin. Microbiol. 1976. V. 3. № 4. P. 432–437.
38. Kröger A. // Diversity of Bacterial Respiratory Systems. V. 2. Boca Raton: CRC Press, 1980. P. 1–18.
39. Tanner A.C.R., Badger S., Lai C.-H., Listgarten M.A., Visconti R.A., Socransky S.S. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1981. V. 31. № 4. P. 432–445.
40. Simon J. // FEMS Microbiol. Rev. 2002. V. 26. P. 285–309.

41. Sanford R.A., Cole J.R., Tiedje J.M. // Appl. Environ. Microbiol. 2002. V. 68. № 2. P. 893–900.
42. Sanford R.A., Wagner D.D., Wu Q., Chee-Sanford J.C., Thomas S.H., Cruz-García C. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. U S A. 2012. V. 109. № 48. P. 19709–19714.
43. He Q., Sanford R.A. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. V. 69. № 5. P. 2712–2718.
44. Wu Q., Sanford R.A., Löffler F.E. // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. № 5. P. 3608–3614.
45. He Q., Yao K. // Bioresour. Technol. 2010. V. 101. № 10. P. 3760–3764.
46. Li Q., Bu C., Ahmad H.A., Guimbaud C., Gao B., Qiao Z. et al. // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2021. V. 28. № 4. P. 4749–4761.
47. Zhang T., Zhuang X., Ahmad S., Lee T., Cao C., Ni S.-Q. // Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 2022. V. 29. № 16. P. 23823–23833.
48. Li Y., Guo L., Yang R., Yang Z., Zhang H., Li Q. et al. // J. Hazard. Mater. 2023. V. 443. P. 130220.
49. Myhr S., Torsvik T. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2000. V. 50. P. 1611–1619.
50. Denton K., Atkinson M.M., Borenstein S.P., Carlson A., Carroll T., Cullity K. et al. // Arch. Microbiol. 2013. V. 195. № 9. P. 661–670.
51. Lovley D.R., Walker D.J.F. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 1–18. Article 2078. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02078>
52. Edwards M.J., Richardson D.J., Paquette C.M., Clarke T.A. // Protein Sci. 2020. V. 29. № 4. P. 830–842.
53. Giese B., Karamash M., Fromm K.M. // FEBS Lett. 2023. V. 597. № 1. P. 166–173.
54. Walker D.J.F., Nevin K.P., Holmes D.E., Rotaru A.-E., Ward J.E., Woodard T.L. et al. // The ISME J. 2020. V. 14. P. 837–846.
55. Morita M., Malvankar N.S., Franks A.E., Summers Z.M., Giloteaux L., Rotaru A.E., Lovley D.R. // mBio. 2011. V. 2. № 4. e00159–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00159-11>
56. Rotaru A.-E., Shrestha P.M., Liu F., Shrestha M., Shrestha D., Embree M. et al. // Energy Environ. Sci. 2014. V. 7. P. 408–415.
57. Holmes D.E., Shrestha P.M., Walker D.J.F., Dang Y., Nevin K.P., Woodard T.L., Lovley D.R. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 9. e00223–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00223-17>
58. Lovley D.R. // Environ. Microbiol. Rep. 2011. V. 3. № 1. P. 27–35.
59. Lovley D.R. // Bioresour. Technol. 2022. V. 345. P. 126553. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126553>
60. Logan B. // Nat. Rev. Microbiol. 2009. V. 7. P. 375–383.
61. Hu Y., Wang Y., Han X., Shan Y., Li F., Shi L. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2021. V. 9. Article: 786416. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.786416>
62. Shi M., Jiang Y., Shi L. // Sci. China. Tech. Sci. 2019. V. 62. № 10. P. 1670–1678.
63. Richter K., Schicklberger M., Gescher J. // Appl. Environ. Microbiol. 2012. V. 78. № 4. P. 913–921.
64. Shu C., Zhu Q., Xiao K., Hou Y., Ma H., Ma J., Sun X. // Biomed. Res. Int. 2019. Article ID 6151587. P. 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/6151587>
65. Tabares M., Dulay H., Reguera G. // Trends Microbiol. 2020. V. 28. № 4. P. 327–328.
66. Liu X., Walker D.J.F., Nonnenmann S.S., Sun D., Lovley D.R. // mBio. 2021. V. 12. № 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.02209-21>
67. Lovley D.R., Holmes D.E. // Nat. Rev. Microbiol. 2022. V. 20. P. 5–19.
68. Wang F., Craig L., Liu X., Rensing C., Egelman E.H. // Trends Microbiol. 2023. V. 3. № 4. P. 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.11.004>
69. Caccavo F.J.R., Lonergan D.J., Lovley D.R., Davis M., Stolz J.F., McInerney M.J. // Appl. Environ. Microbiol. 1994. V. 60. № 10. P. 3752–3759.
70. Mollaei M., Timmers P.H.A., Suarez-Diez M., Boeren S., Van Gelder A.H., Stams A.J.M., Plugge C.M. // Environ. Microbiol. 2021. V. 23. № 1. P. 299–315.
71. Galushko A.S., Obratsova A.Ya., Shtarkman N.B., Laurinavichus K.S., Akimenko V.K. // Dokl. Biol. Sci. 1994. V. 335. P. 122–123.
72. Штаркман Н.Б., Лауринавичюс К.С., Акименко В.К. // Микробиология. 1992. Т. 61. № 4. С. 709–716.
73. Штаркман Н.Б., Образцова А.Я., Лауринавичюс К.С., Галушко А.С., Акименко В.К. // Микробиология. 1995. Т. 64. № 2. С. 270–274.
74. Galushko A.S., Schink B. // Arch. Microbiol. 2000. V. 174. № 5. P. 314–321.
75. Kaden J., Galushko A.S., Schink B. // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. № 1. P. 53–58.
76. Arkhipova O.V., Chuvochina M.S., Trutko S.M. // Microbiology. 2009. V. 78. № 3. P. 296–303.
77. Arkhipova O.V., Meer M., Mikoulinskaia G.V., Zakharova M.V., Galushko A.S., Akimenko V.K., Kondrashov F.A. // PLoS One. 2015. V. 10. № 5. e0125888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125888>
78. Myers C.R., Myers J.M. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 4. P. 1143–1152.
79. Marritt S.J., McMillan D.G.G., Shi L., Fredrickson J.K., Zachara J.M., Richardson D.J., Jeuken L.J.C., Butt J.N. // Biochem. Soc. Trans. 2012. V. 40. № 6. P. 1217–1221.
80. Marritt S.J., Lowe T.G., Bye J., McMillan D.G.G., Shi L., Fredrickson J. et al. // Biochem. J. 2012. V. 444. № 3. P. 465–474.
81. Schwalb C., Chapman S.K., Reid G.A. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 31. P. 9491–9497.
82. Alves M.N., Neto S.E., Alves A.S., Fonseca B.M., Carrelo A., Pacheco I. et al. // Front. Microbiol. 2015. V. 6. Article 665. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00665>
83. Тихонова Т.В., Попов В.О. // Успехи биологической химии. 2014. Т. 54. С. 349–384.
84. McMillan D.G.G., Marritt S.J., Butt J.N., Jeuken L.J.C. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 17. P. 14215–1425.
85. McMillan D.G.G., Marritt S.J., Firer-Sherwood M.A., Shi L., Richardson D.J., Evans S.D. et al. // J. Am. Chem. Soc. 2013. V. 135. № 28. P. 10550–10556.
86. Myers J.M., Myers C.R. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 1. P. 67–75.

87. Schwalb C., Chapman S.K., Reid G.A. // Biochem. Soc. Trans. 2002. V. 30. № 4. P. 658–662.
88. Zhu T.-T., Cheng Z.-H., Yu S.-S., Li W.-W., Liu D.-F., Yu H.-Q. // Environ. Microbiol. 2022. V. 24. № 4. P. 1838–1848.
89. Proctor L.M., Gunsalus R.P. // Environ. Microbiol. 2000. V. 2. № 4. P. 399–406.
90. Cusanovich M.A., Meyer T.E., Bartsch R.G. // Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Muller, F., ed.). Boca Raton FL: CRC Press. 1992. V. II. P. 377–393.
91. Cunane L.M., Chen Z.W., Durley R.C., Barton J.D., Mathews F.S. // Biochem. Soc. Trans. 1999. V. 27. № 2. P. 179–184.
92. Gregersen L.H., Bryant D.A., Frigaard N.-U. // Front. Microbiol. 2011. V. 2. P. 116.
93. Sousa F.M., Pereira J.G., Marreiros B.C., Pereira M.M. // BBA Bioenerg. 2018. V. 1859. № 9. P. 742–753.
94. Paquete C.M., Louro R.O. // Dalton Trans. 2010. V. 39. № 18. P. 4259–4266.
95. Fukumori Y., Yamanaka T. // J. Biochem. 1979. V. 85. № 6. P. 1405–1414.
96. Sakurai H., Ogawa T., Shiga M., Inoue K. // Photosynth. Res. 2010. V. 104. № 2–3. P. 163–176.
97. Xin Y., Gao R., Cui F., Lü C., Liu H., Liu H., Xia Y., Xuna L. // Appl. Environ. Microbiol. 2020. V. 86. № 22. e01835–20.
98. Lü C., Xia Y., Liu D., Zhao R., Gao R., Liu H., Xuna L. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 22. e01610–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01610-17>
99. Tikhonova T.V., Lilina A.V., Osipov E.M., Shipkov N.S., Dergousova N.I., Kulikova O.G., Popov V.O. // Biochemistry (Mosc). 2021. V. 86. № 3. P. 361–369.
100. Nguyen P.M., Do P.T., Pham Y.B., Doan T.O., Nguyen X.C., Lee W.K. et al. // Sci. Total Environ. 2022. V. 852. 158203. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158203>
101. Chen Z.-W., Koh M., Van Driessche G., Van Beeumen J.J., Bartsch R.G., Meyer T.E. et al. // Science. 1994. V. 266. P. 430–432.
102. Koerber S.C., McIntire W., Bohmont C., Singer T.P. // Biochemistry. 1985. V. 24. № 19. P. 5276–5280.
103. Gordon E.H.J., Peeling S.L., Chapman S.K., Ward F.B., Reid G.A. // Microbiology. 1998. V. 144. № 4. P. 937–945.
104. Dobbin P.S., Butt J.N., Powell A.K., Reid G.A., Richardson D.J. // Biochem. J. 1999. V. 342. № 2. P. 439–448.
105. Maier T.M., Myers J.M., Myers C.R. // J. Basic Microbiol. 2003. V. 43. № 4. P. 312–327.
106. Архипова О.В., Трошина О.Ю., Микулинская Г.В. // Вестн. ТвГУ. Сер.: Биология и экология. 2017. № 2. С. 306–323.
107. Kees E.D., Pendleton A.R., Paquete C.M., Arriola M.B., Kane A.L., Kotloski N.J. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. № 16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00852-19>

Methacrylate Redox Systems of Anaerobic Bacteria

O. V. Arkhipova*

Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

*e-mail: aroksan@gmail.com

The review analyzes current information about the anaerobic type of respiration using a non-natural methacrylate compound as an electron acceptor. Both the methacrylate redox systems themselves and the anaerobic bacteria in whose cells they are found are considered. These complexes consist of flavin-containing reductase and multiheme cytochrome(s) c_3 . The genes of the components of the methacrylate redox systems of different microorganisms are homologous and are organized into one operon. Methacrylate-reducing activity is determined in the periplasm. The only known bacterial acrylate reductase that reduces the natural compound differs from methacrylate redox systems. The physiological role, origin, and research perspectives for this unique enzyme system are discussed.

Keywords: methacrylate reductase, multiheme cytochrome c , anaerobic respiration, *Geobacter sulfurreducens* AM-1, *Anaeromyxobacter dehalogenans* 2CP-1^T, *Denitrovibrio acetiphilus* DSM 12809^T, *Wolinella succinogenes* DSM 1740^T

УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ N^ε-АЦЕТИЛИРОВАНИЯ НА ЭНЗИМАТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ *Escherichia coli*

© 2023 г. Н. С. Плеханова¹, *, И. Б. Альтман², М. С. Юркова¹, А. Н. Федоров¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

² МИРЭА – Российский технологический университет, Москва, 119454 Россия

*e-mail: plekhanovans@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Ацетилирование лизина является глобальным регуляторным механизмом, который влияет на большинство клеточных процессов. В данной работе мы изучили влияние ацетилирования и деацетилирования на активность белков глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) *E. coli* дикого типа и мутантных форм. Наши результаты показали, что обработка ГАФД дикого типа ацетилтрансферазой PatZ *in vitro* приводила к двукратному увеличению ферментативной активности, в то время как последующее деацетилирование снижало активность фермента до уровня, близкого к исходному. В случае мутантных форм фермента было показано, что появление дополнительных сайтов ацетилирования существенно изменяло влияние процессов ацетилирования/деацетилирования на активность ГАФД. Эти данные позволяют по-новому взглянуть на роль ацетилирования в регуляции активности ГАФД *E. coli*.

Ключевые слова: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, ацетилирование, ацетилтрансфераза, деацетилаза, регуляция активности ГАФД

DOI: 10.31857/S0555109923060119, EDN: CWOIDD

Ацетилирование лизина является глобальным регуляторным механизмом, который влияет на большинство клеточных процессов. Важной особенностью такого механизма регуляции является его влияние на распределение углеродных потоков между путями метаболизма, такими, как гликолиз и глюконеогенез, между циклом трикарбоновых кислот и глиоксилатным шунтом, а также между гликолизом и циклом трикарбоновых кислот. Регулирование подобного рода можно добиться путем ацетилирования ключевых ферментов центрального метаболизма [1–3]. Одним из объектов для такого рода модификаций является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД). Данный фермент играет важную роль в пути Эмбдена-Мейерхоффа-Парнаса и глюконеогенезе. ГАФД катализирует окисление D-глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-бисфосфоглицерата с восстановлением НАД⁺ до НАДН.

Ранее была продемонстрирована возможность изменения кофакторной специфичности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *Escherichia coli* и получен набор ферментов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной

степенью сродства к НАД⁺/НАДФ⁺. Описанные аминокислотные замены D34K и P189K способны вносить дополнительные сайты ацетилирования фермента, что, в свою очередь, может влиять на энзиматическую активность ГАФД [4].

Из литературных данных известно о наличии сайтов ацетилирования ГАФД у штаммов дикого типа, однако механизм, по которому происходит их ацетилирование, не был исследован [5].

Цель работы — исследование влияния ацетилирования на энзиматическую активность ГАФД, а также влияние на этот процесс единственной охарактеризованной ацетилтрансферазы *E. coli* PatZ и неспецифичной к механизму ацетилирования деацетилазы CobV [6].

МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы, плазмиды и ростовые среды. В качестве полноценной питательной среды использовали LB “ДиаМ” (Россия), минимальной — M9 (“Sigma-Aldrich”, США) [7]. Для получения твердых сред в жидкие добавляли бактоагар (“Difco”, США) в концентрации 1.5%. Все

Таблица 1. Бактериальные штаммы, использованные в работе

Штамм	Генотип	Источник
MG1655	F ⁻	CGSC 6300
BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdSB (rB ⁻ , mB ⁻) gal dcm (DE3)	Лабораторная коллекция

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Плазмида	Устойчивость к антибиотикам	Характеристики	Ссылка
pKD20	Amp	oriR101, rePA101(ts), P- <i>gam-bet-exo</i>	[9]
pKK- <i>gapA</i> ^{WT}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	Amp	ori pBR322, PlacZ, rrnBT1T2	[4]

использованные в работе штаммы и плазмиды приведены в табл. 1 и 2.

Трансформация, трансдукция и получение генетических модификаций в хромосоме *E. coli*. Трансформацию штаммов *E. coli*, получение трансдуцирующих фагов P1vir и трансдукцию проводили согласно общепринятым экспериментальным протоколам [8, 9]. Инактивацию генов в хромосоме *E. coli* осуществляли с использованием Red-системы фага λ по методу, описанному в работе [9], с помощью хелперной плазмиды pKD20 и хромосомальной ДНК (λattL-KmR-λattR) в качестве донора “вырезаемого” маркера антибиотикоустойчивости [9].

Методы работы с ДНК. Выделение ДНК проводили с помощью наборов Plasmid Miniprep и Cleanup Standard, согласно инструкциям производителя (“Евроген”, Россия). Электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли по стандартным методикам. Стандартный метод ПЦР воспроизводили с помощью амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (“Biorad”, США). Химический синтез олигонуклеотидных праймеров для ПЦР осуществляла фирма “Синтол” (Россия). Нуклеотидный состав праймеров приведен в табл. 3.

Для конструирования кассеты, содержащей дополнительную копию гена *gapA*, были синтезированы два фрагмента: первый, несущий ген устойчивости к канамицину - на основе фрагмента attLλ-Km-attRλ с помощью праймеров P1 и P2; второй, несущий ген *gapA** с собственной регуляторной областью, - на основе плазмид pKK-*gapA*^{WT}, pKK-*gapA*^{D34K} или pKK-*gapA*^{D34KG188TP189K} с помощью праймеров P3 и P4. Полученные фрагменты ДНК использовали в качестве матрицы для синтеза полноразмерной кассеты *km-ybhB::gapA* посредством перекрывающейся ПЦР с использова-

нием праймеров P1 и P4. Введение дополнительной копии гена *gapA* в хромосому осуществлялось методом Red-зависимой интеграции; ее наличие контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6. В заключение маркер устойчивости к канамицину был удален, что также контролировалось ПЦР с использованием праймеров P5-P6.

Инактивация гена *gapA* на хромосоме *E. coli* осуществлялась с использованием Red системы фага λ по методу, описанному в работе [9] с использованием плазмиды pKD20. Конструирование кассеты Δ*gapA::Km* осуществлялось с помощью праймеров P9-P10; проверка делеции гена *gapA* - с помощью праймеров P7-P8.

Измерение энзиматических активностей. Для измерения активности ГАФД культуру клеток выращивали в жидкой среде M9 в течение 4–8 ч при 37°C (до OD₆₀₀ 2.0), центрифугировали, дважды промывали физиологическим раствором и разрушали с помощью звукового дезинтегратора в буфере следующего состава: 100 мМ Tris-HCl, 20 мМ KCl, 0.5 мМ EDTA, 2 мМ DTT, pH 7.5.

Активность ГАФД измеряли спектрофотометрически в клеточных экстрактах по методике, описанной ранее [10], с добавлением в качестве кофактора НАД⁺ или НАДФ⁺ (2 мМ). Очистку ГАФД для определения кинетических параметров проводили фракционным осаждением (NH₄)₂SO₄, как описано ранее [4]. Для дальнейшей работы использовали фракцию белка, осажденную при 75–85% (III) насыщения сульфатом аммония.

Электрофорез тотального белка в 15%-полиакриламидном геле выполнен в соответствии с методикой, представленной Лэмли [11]. Определение количества белка в экстрактах проводилось по методу Брэдфорда с использованием реактива Bio-Rad Protein Assay (“Bio-Rad Laboratories GmbH”, Германия).

Таблица 3. Праймеры, используемые для делеции генов и проверки полученных мутаций

ID	Праймер	Последовательность (5'→3')
Праймеры, используемые для интеграции мутантных генов <i>gapA</i> в хромосому		
P1	<i>ybhB</i> -Km	ctttctgcaacaagaaggagggttcagcgctcaagttagtataaaaaagctgaacgag
P2	<i>gapA</i> -Km	gccagttgggtgtaattgtttgttagaatcgtaattgaacgctgcttttta
P3	Km- <i>gapA</i>	acttagtataaaaaagcaggcttcaattacgattctaacaaaacattaac
P4	<i>gapA</i> - <i>ybhB</i>	gcgccatctggcagagtgattaactaaacatcgagtaattatttggagatgtgagcgatcaggt
P5	<i>ybhB</i> -up	gcaacagttgcagcgctctga
P6	<i>ybhB</i> -down	gttgagctacaggcggtcag
Праймеры, используемые для делеции нативного гена <i>gapA</i>		
P7	<i>gapA</i> -down	tgatttcagcgctccacggcag
P8	<i>gapA</i> -up	gccgtcacgctgtttatgc
P9	del- <i>gapA</i> -R	gctcacatctcactttaatcgctcacattacgtgactcgctcaagttagtataaaaaagc
P10	del- <i>gapA</i> -L	gattgtgatttcagcgctccacggcaggttgcgggcaaatgaagcctgctttttataactaag
Праймеры, используемые для клонирования гена <i>patZ</i>		
P11	<i>patZ</i> - <i>Hind</i> III- <i>Not</i> I	ttgccagcgcgaggaaatcaagcttgcggccgactcgag
P12	<i>patZ</i> - <i>Nco</i> I	ccagtcctcgctgacccatggccatcgcc
Праймеры, используемые для клонирования гена <i>cobB</i>		
P13	<i>cobB</i> - <i>Nco</i> I	gatgaccccgacgacacccatggccatcgccggctg
P14	<i>cobB</i> - <i>Hind</i> III- <i>Not</i> I	gattaaaagcgggaagcattgccaagcttgcggccgactcgagcac

Клонирование гена *patZ* и *cobB*. На первом этапе получали фрагмент ДНК, соответствующий гену *patZ*, с использованием праймеров P11 и P12. Праймер P11 гомологичен 3'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Bam*HI. Праймер P12 гомологичен 5'-концу гена и содержит сайт узнавания рестриктазы *Nco*I для дальнейшего клонирования в плазмиду. Аналогичным образом был получен фрагмент, соответствующий гену *cobB*, с помощью праймеров P13 и P14. Целевые фрагменты обрабатывали рестриктазами *Bam*HI и *Nco*I и клонировали в составе вектора pET22/*Bam*HI-*Nco*I, последовательность генов подтверждали секвенированием. Штамм *E. coli* BL21 (DE3) был трансформирован полученными плазмидами с последующим отбором трансформантов на среде LB с ампициллином.

Очистка ферментов CobB и PatZ. Клетки штаммов *E. coli* BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ], содержащие ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем промотора *P_{lacUV5}* в хромосоме, а гены исследуемых ферментов под контролем промотора, узнаваемого РНК-полимеразой T7, в составе рекомбинантных плазмид, выращивали в колбах (200 мл) в среде LB с добавлением Ар до ОП₆₀₀ = 1. Синтез целевых белков индуцировали добавлением 1мМ изопропил-β-D-1-тиога-лактопиранозид (ИПТГ) и продолжали культиви-

рование в течение 3 ч. Для очистки ферментов выращенные клетки BL21(DE3)[pET22-cobB] и BL21(DE3)[pET22-patZ] осаждали центрифугированием, промывали 10 мл физиологического раствора NaCl, ресуспендировали в буфере А (20 мМ фосфат натрия pH 7.0; 1 мМ ДТТ; 1 мМ ЭДТА) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Клеточные обломки и остатки неразрушенных клеток удаляли центрифугированием. Из полученного супернатанта выделяли целевые белки с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке HisTrap HP согласно рекомендациям производителя ("GE Healthcare", Великобритания).

Ацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*. Реакцию ацетилирования *in vitro* проводили, как описано ранее [12]. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД и 50 нг очищенного фермента PatZ. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение различных промежутков времени и анализировали ферментативную активность ГАФД.

Деацетилирование ε-аминогрупп остатков лизина в целевых белках *in vitro*. Реакцию *in vitro* проводили, как описано [12]. В качестве субстрата использовали III белковую фракцию ГАФД в отсутствие или в присутствии 50 нг очищенного фермента CobB и 2 мМ НАД⁺. Реакционные сме-

си инкубировали при 37°C в течение 1 ч и затем измеряли ферментативную активность ГАФД.

Реализацию процессов ацетилирования/деацетилирования целевого белка контролировали электрофорезом в полиакриламидном геле в нативных условиях [13].

Построение 3Д-структур белков с аминокислотными заменами. В качестве основы для моделирования была взята трехмерная структура ГАФД 1S7C. Сервером I-TASSER [14] были предсказаны мономерные субъединицы белков с аминокислотными заменами. Выравнивание, уточнение и визуализация трехмерных структур осуществлялись с помощью PyMOL v.2.5.0.

Для описания введенных посттрансляционных модификаций было выбрано силовое поле Charmm 36M дополнительной параметризацией [15].

Докинг. Расчеты стыковки проводились с использованием DockingServer [16]. Силовое поле MMFF94 [17] использовали для минимизации энергии молекулы лиганда (DL-глицеральдегид-3-фосфат) с помощью DockingServer. Исходное положение, ориентация и кручение молекул лиганда задавались случайным образом. Каждый эксперимент по стыковке был получен из 100 различных запусков, которые должны были завершиться после максимум 250 000 оценок энергии. Размер популяции был установлен равным 150. Во время поиска применялись поступательный шаг 0.2 Å, кватернионный и торсионный шаги 5.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ацетилирование аминокислотного остатка лизина — универсальный регуляторный механизм, оказывающий влияние на все клеточные процессы. Идентификация широкого ряда ацетилированных метаболических ферментов как у человека, растений [18], так и у прокариот [19], а также анализ литературных данных о различных метаболических регуляторных ролях этой модификации [20] указывает на то, что обратимое ацетилирование аминокислотного остатка лизина может представлять собой эволюционно консервативный механизм метаболической регуляции как у эукариот, так и у прокариот [21].

Согласно опубликованным литературным данным, ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД по-разному влияет на ее активность у эукариот в зависимости от типа и состояния клеток. Например, в эмбриональных клетках почек человека (HEK293T) ацетилирование ГАФД по остатку лизина 254 повышает ее ферментативную активность в ответ на глюкозу [22]. В клетках фибробластов мыши (NIH3T3) ацетилирование ГАФД усиливает ее транслокацию из цитоплазмы в ядро, тем самым ингибируя нисходя-

щий гликолиз и накопление промежуточных продуктов гликолиза [23]. В растениях ацетилирование ГАФД снижает ее ферментативную активность, а также ее взаимодействие с другими гликолитическими ферментами [24]. Следовательно, ацетилирование аминокислотных остатков лизина ГАФД может модулировать ее функцию и по-разному влиять на гликолиз в различных организмах в разных условиях. Однако влияние ацетилирования лизиновых остатков ГАФД у *E. coli* до сих пор детально не изучено.

Ранее была продемонстрирована возможность изменения кофакторной специфичности глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы *E. coli* и получен набор ферментов с двойной кофакторной специфичностью, характеризующихся различной степенью сродства к НАД⁺/НАДФ⁺. Описанные аминокислотные замены D34K и P189K способны вносить дополнительные сайты ацетилирования фермента, что, в свою очередь, может влиять на энзиматическую активность ГАФД [4].

Рядом авторов было показано, что клетки *E. coli*, несущие делецию гена *gapA*, не способны к росту ни на богатой, ни на минимальной среде с глюкозой в качестве источника углерода [25]. Исходя из этого, конструирование целевого штамма осуществлялось в два этапа. На первом этапе в *ybhB*-локус MG1655 были введены гены *gapA*^{WT}, *gapA*^{D34K} и *gapA*^{D34AG188TP189K} с собственной регуляторной областью в качестве второй копии. Выбранный ген *ybhB* не является значимым для *E. coli*, то есть с делецией этого гена штаммы способны расти как на богатой среде LB, так и на минимальной — M9. И, как видно на рисунке 1, удаление данного гена не приводило к изменениям в ростовых характеристиках штамма. Описанные ранее плазмиды были использованы в качестве матрицы для амплификации мутантных генов. После этого для инактивации природной копии *gapA* в полученные штаммы MG1655 *ΔybhB::gapA*^{WT}, MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34K} и MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34AG188TP189K} была интегрирована кассета *ΔgapA*^{native}::kan с помощью системы Red-зависимой рекомбинации и отобраны камицицин-устойчивые клоны.

Полученные штаммы MG1655 *ΔybhB::gapA*^{WT} *ΔgapA*^{native}::kan, MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34K} *ΔgapA*^{native}::kan и MG1655 *ΔybhB::gapA*^{D34AG188TP189K} *ΔgapA*^{native}::kan обладали способностью расти как на богатой среде LB, так и на минимальной среде M9 с глюкозой в качестве единственного углеродного субстрата. Однако, как видно на рисунке 1, наличие мутантных генов *gapA* в локусе *ybhB* в качестве единственной копии *gapA* не было способно полностью супрессировать делецию нативного гена *gapA*, восстанавливая тем самым скорость роста до уровня штамма дикого типа.

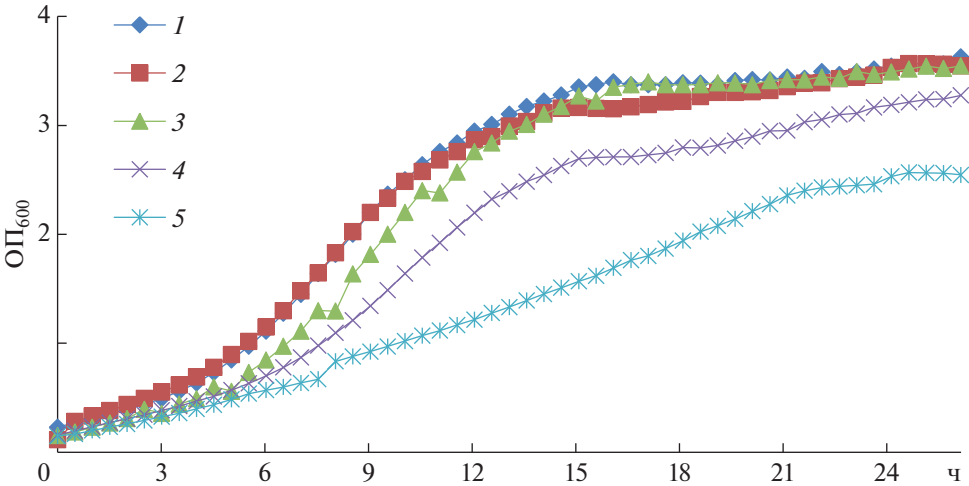


Рис. 1. Рост штаммов на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода (начальная оптическая плотность ОП600 составила): 1 – штамм MG1655; 2 – MG1655 $\Delta ybhB$; 3 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA}^{WT}\Delta gapA^{native}$; 4 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA}^{D34K}\Delta gapA^{native}$; 5 – MG1655 $\Delta ybhB::P_{gapA-gapA}^{D34AG188TP189K}\Delta gapA^{native}$.

Ацетилирование аминокислотных остатков лизина может происходить по двум механизмам: неферментативному и ферментативному, опосредованному ацетилтрансферазами. Единственным известным ферментом-ацетилтрансферазой у *E. coli* является пептидиллизин N-ацетилтрансфераза, кодируемая геном *patZ* (ранее *yfiQ*).

Независимо от того, по какому из двух механизмов происходит ацетилирование аминокислотного остатка лизина, сделать этот процесс обратимым способна деацетилаза CobV из сиртуинового семейства NAD⁺-зависимых деацетилаз, кодируемая геном *cobB*. CobV является гомологом эукариотических сиртуинов, регулирующих различные клеточные процессы, такие, как метаболизм, реакцию на стресс и старение.

Для проведения реакций ацетилирования и деацетилирования с помощью афинной металлохелатной хроматографии были очищены ферменты ацетилтрансфераза PatZ и деацетилаза CobV.

Ферменты добавляли в реакционную смесь к изучаемому белку ГАФД, после инкубирования данные ферменты удаляли из реакционной смеси, добавляя в раствор никелевую смолу. Удаление модифицирующих ГАФД ферментов PatZ и CobV из раствора контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, после чего во фракции свободного объема измеряли энзиматическую активность ГАФД. Результаты измерений НАД⁺-зависимой активности ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA-gapA}*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными генами *gapA* приведены в табл. 4.

In vitro обработка фермента ГАФД дикого типа ацетилтрансферазой PatZ приводила к двукратному увеличению ее ферментативной активности. При деацетилировании активность белка снижалась до уровня, близкого к исходному.

Наибольший интерес представляют показатели активности белков ГАФД^{D34AG188TP189K} и ГАФД^{D34K},

Таблица 4. НАД⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA-gapA}*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA* (представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах)

Плазмида	НАД ⁺⁺ специфическая активность ГАФД, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹		
	нативная форма белка	ацетилированная форма белка	деацетилированная форма белка
pKK- <i>gapA</i> ^{wt}	520.7 ± 0.75	912.4 ± 0.57	637.1 ± 0.66
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	20 ± 0.65	13.7 ± 0.54	26.4 ± 1.2
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	139 ± 0.80	224 ± 0.40	121 ± 0.60

Таблица 5. НАДФ⁺-зависимая активность ГАФД штамма MG1655 *ybhB::P_{gapA}-gapA*ΔgapA::Km*, несущего плазмиды с мутантными *gapA* (представлены средние значения, полученные в трех независимых экспериментах)

Плазмида	НАДФ ⁺ - специфическая активность ГАФД, мкмоль мин ⁻¹ мг ⁻¹		
	нативная форма белка	ацетилированная форма белка	деацетилированная форма белка
pKK- <i>gapA</i> ^{wt}	<0.01	<0.01	<0.01
pKK- <i>gapA</i> ^{D34K}	9 ± 0.45	18.2 ± 0.40	8.3 ± 0.25
pKK- <i>gapA</i> ^{D34AG188TP189K}	58.9 ± 0.36	56 ± 0.32	87.5 ± 0.44

имеющих потенциальный дополнительный сайт ацетилирования. Как видно из полученных данных, обработка мутантного фермента ГАФД^{D34K} ацетилтрансферазой PatZ *in vitro* приводила, в отличие от белка дикого типа, к уменьшению удельной активности прямой реакции, а деацетилирование увеличивало активность белка до величины, значительно превышающей исходное значение.

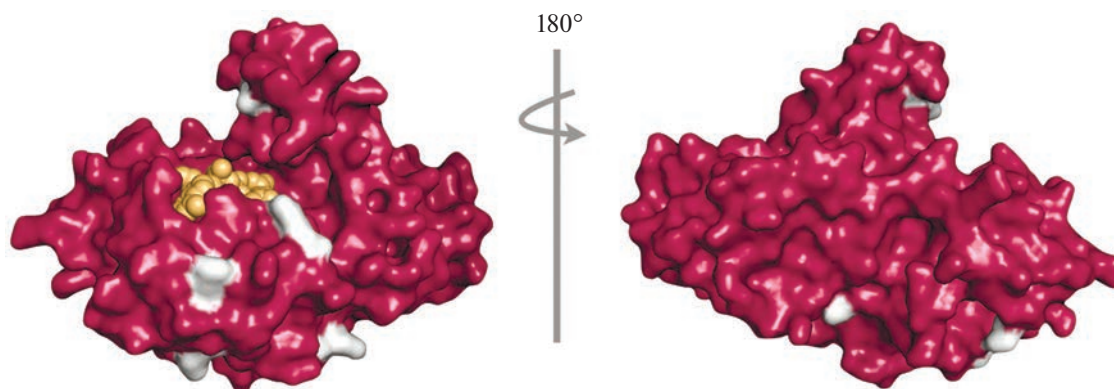
При ацетилировании мутантного фермента ГАФД^{D34AG188TP189K} активность, как и в случае белка дикого типа, увеличивалась (на 60%), а при деацетилировании снижалась. При этом достигнутое значение активности было несколько ниже, чем до ацетилирования, что может объясняться удалением не только дополнительной ацетильной группы, но и одной из ацетильных групп, исходно присутствовавших в белке дикого типа.

Поскольку мутантные ферменты ГАФД обладают двойной кофакторной специфичностью, нами была проанализирована их удельная активность при использовании НАДФ⁺ в качестве кофактора. Результаты измерений представлены в таблице 5.

Как мы видим из представленных таблиц, исследуемые белки демонстрировали различное сродство к кофакторам после ацетилирования.

Для идентификации ацетилированных аминокислотных остатков лизина после *in vitro* обработки целевых белков ГАФД ацетилтрансферазой PatZ был проведен масс-спектрометрический анализ. В белке ГАФД дикого типа было идентифицировано 6 сайтов ацетилирования. В случае белков с аминокислотными заменами было обнаружено еще два ацетилированных лизиновых остатка: в позиции 23 в белке GapA^{D34K} и в позиции 184 в случае белка GapA^{D34AG188TP189K}. На рисунке 2 серым цветом выделены ацетилированные аминокислотные остатки лизина на поверхности белка ГАФД.

Для глубокого понимания происходящих процессов были проведены процедура молекулярного докинга и анализ образованных комплексов белок-кофактор. На первом этапе были построены 3Д модели белков с аминокислотными заменами GapA^{D34AG188TP189K} и GapA^{D34K} с помощью сервера I-TASSER (см. Методика). С помощью методов молекулярного моделирования к аминокислотным остаткам лизина в определенных позициях были добавлены ацетильные группы, а полученные структуры были оптимизированы с помощью силового поля Charmm 36M (см. Методика).

**Рис. 2.** Распределение ацетилированных аминокислотных остатков лизина по белковой поверхности ГАФД.

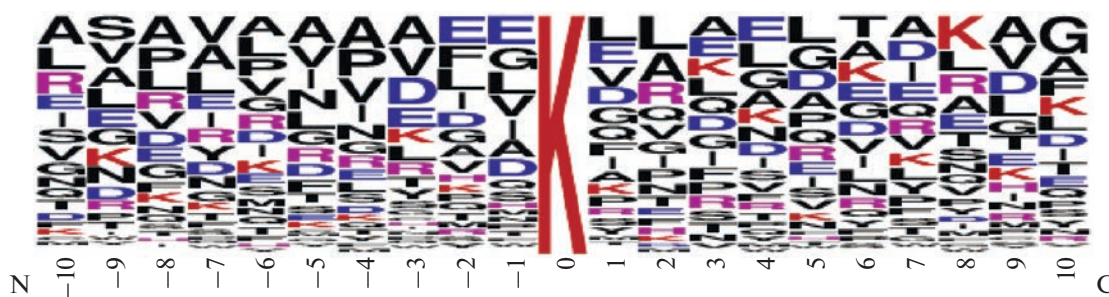


Рис. 3. Вероятностное распределение аминокислотных остатков в белках *E. coli* в непосредственной близости ацетилированных аминокислотных остатков лизина.

Данные молекулярного докинга отлично коррелировали с результатами измерений активности белков. Построенные в программе Docking-Server комплексы фермент-кофактор позволили объяснить изменения в значениях активности ферментов $\text{GapA}^{\text{D34AG188TP189K}}$ и $\text{GapA}^{\text{D34K}}$. В случае белка $\text{GapA}^{\text{D34K}}$ стабилизация образуемых связей с кофакторами обеспечена аминокислотными остатками лизина в позициях 124 и 192 для кофактора НАДФ⁺ и только аминокислотным остатком лизина в позиции 124, для кофактора НАД⁺.

Логотип консенсусной последовательности, показывающий аминокислотный состав в положениях от -10 до +10 относительно чувствительных к ацетилированию остатков лизина, был создан с использованием онлайн сервиса WebLogo [26] (рис. 3). Для его построения были использованы аминокислотные последовательности 100 белков *E. coli* из опубликованного протеомного анализа ацетилированных белков [5].

Равномерность распределения аминокислотных остатков лизина в пептидах была оценена с помощью критерия согласия Колмогорова. Данная метрика используется для сравнения эмпирической функции распределения остатков лизина в белковой последовательности с теоретической функцией равномерного распределения. Нулевая гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина распределены равномерно по всей белковой последовательности. Альтернативная гипотеза состоит в том, что аминокислотные остатки лизина не распределены равномерно по белковой последовательности. Критерий Колмогорова вычисляет максимальное отклонение между двумя функциями распределения относительно стандартного распределения и преобразует его в *p*-value — вероятность получения отклонения при верности нулевой гипотезы. В данном случае было получено значение *p*-value, равное 1×10^{-6} , что свидетельствует об очень низкой вероятности равномерного распределения остатков лизина.

Поэтому была принята альтернативная гипотеза с уровнем значимости 95%, заключающаяся в том, что ацетилированные остатки лизина не распределены равномерно в пептидах, а имеется определенная закономерность в их окружении другими аминокислотными остатками. Для вычисления критерия Колмогорова была использована библиотека *scipy*, которая предоставляет различные статистические функции для Python.

Из полученной диаграммы вероятности аминокислотного окружения ацетилированного остатка лизина видно, что с наибольшей вероятностью в соседнем положении от ацетилированного остатка лизина находится аминокислотный остаток глютаминовой кислоты, который, вероятнее всего, служит основным катализатором для иницирования реакции ацетилирования, а через 4 аминокислоты с высокой степенью вероятности находится еще один аминокислотный остаток лизина, что и наблюдается как в случае белка $\text{GapA}^{\text{D34AG188TP189K}}$, так и в случае белка $\text{GapA}^{\text{D34K}}$.

Из сопоставления полученных данных масс-спектрометрии и анализа аминокислотных последовательностей белков можно сделать вывод, что аминокислотные замены на лизин в позициях 34 и 189 обеспечивают необходимое окружение для создания дополнительных сайтов ацетилирования в позициях 23 и 184 соответственно.

Обнаруженный способ влияния на энзиматическую активность представляет собой потенциальный механизм регулирования энергетического статуса клетки, так как в процессе ацетилирования задействованы ацетил-КоА и НАД⁺ — две молекулы, которые непосредственно участвуют в метаболических процессах. Такого рода метаболическая регуляция посредством ацетилирования может быть консервативным механизмом у разных организмов.

В этой работе мы наглядно продемонстрировали влияние процесса ацетилирования на актив-

ность ключевого фермента центрального метаболизма ГАФД и двух его мутантных вариантов с дополнительными сайтами ацетилирования.

Изучение процесса ацетилирования имеет значение для многих аспектов биохимии и биотехнологии и играет важную роль в понимании молекулярных механизмов, влияющих на активность ферментов, особенно тех, которые приводят к перераспределению потоков клеточного метаболизма. На сегодняшний день для изучения ацетилирования белков используются современные технологии протеомики, которым помогают как высокопроизводительные, так и экспериментальные методы с высоким разрешением. Однако детальное изучение механизмов остается актуальной задачей.

В работе использовали оборудование (масс-спектрометр, “Burker”, Германия) центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” ФИЦ Биотехнологии РАН.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 гг. (Соглашение № 075-15-2021-1071)

Н.С. Плеханова — концепция, проведение экспериментов; Н.С. Плеханова, И.Б. Альтман — обсуждение результатов исследования, написание текста; М.С. Юркова — редактирование текста статьи; А.Н. Федоров — руководство работой.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuhn M.L., Zemaitaitis B., Hu L.I., Sahu A., Sorensen D., Minasov G. et al. // PLoS ONE. 2014. V. 9. № 4. P. e94816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094816>
2. Wang Q., Zhang Y., Yang C., Xiong H., Lin Y., Yao J. et al. // Science. 2010. V. 327. P. 1004–1007.
3. Verdin E., Ott M. // Molecular Cell. 2013. T. 51. № 2. C. 132–134.
4. Slivinskaya E.A., Plekhanova N.S., Altman I.B., Yampolskaya T.A. // Microorganisms. 2022. V. 10. P. 976. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10050976>
5. Schilling B., Basisty N., Christensen D.G., Sorensen D., Orr J.S., Wolfe A.J. et al. // J. Bacteriol. 2019. V. 201. № 9. <https://doi.org/10.1128/JB.00768-18>
6. Castaño-Cerezo S., Bernal V., Post H., Fuhrer T., Cappadona S., Sánchez-Díaz N.C. et al. // Molecular Systems Biology. 2014. V. 10. P. 762. <https://doi.org/10.15252/msb.20145227>
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1625 p.
8. Thomason L.C., Costantino N., Court D.L. // CP Molecular Biology. 2007. V. 79. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0117s79>
9. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6640–6645.
10. Lamed R., Zeikus J.G. // J Bacteriol. 1980. V. 141. P. 1251–1257.
11. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
12. Song L., Wang G., Malhotra A., Deutscher M.P., Liang W. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. P. 1979–1988.
13. Wittig I., Karas M., Schägger H. // Molecular & Cellular Proteomics. 2007. V. 6. P. 1215–1225.
14. Zhou X., Zheng W., Li Y., Pearce R., Zhang C., Bell E.W. et al. // Nat Protoc. 2022. V. 17. № 10. P. 2326–2353.
15. Brooks B.R., Brucoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // J. Comput. Chem. 1983. V. 4. P. 187–217.
16. Bikadi Z., Hazai E. // J. Cheminform. 2009. V. 1. P. 15. <https://doi.org/10.1186/1758-2946-1-15>
17. Halgren T.A. // Encyclopedia of Computational Chemistry. UK: John Wiley & Sons, 2002. <https://doi.org/10.1002/0470845015.cma012m>
18. Xia L., Kong X., Song H., Han Q., Zhang S. // Plant Communications. 2022. V. 3. P. 100266. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100266>
19. Okanishi H., Kim K., Masui R., Kuramitsu S. // J. Proteome Res. 2013. V. 12. P. 3952–3968.
20. Smith K., Shen F., Lee H.J., Chandrasekaran S. // iScience. 2022. V. 25. P. 103730. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103730>
21. Ketema E.B., Lopaschuk G.D. // Front. Cardiovasc. Med. 2021. V. 8. P. 723996. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.723996>
22. Li T., Liu M., Feng X., Wang Z., Das I., Xu Y. et al. // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. P. 3775–3785.
23. Ventura M., Mateo F., Serratos J., Salaet I., Carujo S., Bachs O. et al. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2010. V. 42. P. 1672–1680.
24. Zhang H., Zhao Y., Zhou D.X. // Nucleic Acids Research. 2017. V. 45. P. 12241–12255.
25. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A. et al. // Molecular Systems Biology. 2006. V. 2. P. 2006. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>
26. Crooks G.E., Hon G., Chandonia J.-M., Brenner S.E. // Genome Res. 2004. V. 14. P. 1188–1190.

Effect of N ϵ -acetylation on the Enzymatic Activity of *Escherichia coli* Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase

N. S. Plekhanova^{a, *}, I. B. Altman^b, M. S. Yurkova^a, and A. N. Fedorov^a

^a Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^b MIREA – Russian Technological University, Moscow, 119454 Russia

*e-mail: plekhanovans@mail.ru

The regulation of cellular metabolism is a topic of interest for both fundamental and applied science, as the findings can be used in various biotechnological industries. One of the universal regulatory mechanisms that affects most cellular processes is the acetylation of lysine residues in central metabolic enzymes, such as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In this work, we investigated the effect of acetylation and deacetylation on the activity of both wild type and mutant *E. coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. We found that *in vitro* acetylation of wild-type GAPDH by PatZ acetyltransferase increased its enzymatic activity by twofold, while subsequent deacetylation restored the activity to initial level. For mutant forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, we demonstrated that the introduction of additional acetylation sites due to mutations altered the impact of acetylation/deacetylation processes on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. Our data suggest a re-evaluation of the role of acetylation in regulating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and its involvement in *E. coli* metabolism.

Keywords: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, acetylation, acetyltransferase, deacetylase, regulation of GAPDH activity

УДК 577.121

ОПТИМИЗАЦИЯ АЭРОБНОГО СИНТЕЗА ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ ИЗ ГЛЮКОЗЫ РЕКОМБИНАНТНЫМИ ШТАММАМИ *Escherichia coli* ПО ВАРИАНТУ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ, ОПОСРЕДОВАННОМУ ДЕЙСТВИЕМ 2-КЕТОГЛУТАРАТ-ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

© 2023 г. А. Ю. Скороходова¹*, А. Ю. Гулевич¹, В. Г. Дебабов¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”

Российской академии наук, Москва, 117312 Россия

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

Поступила в редакцию 11.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Оптимизирован биосинтез янтарной кислоты из глюкозы ранее сконструированным штаммом *E. coli* SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (MG1655 Δ *ackA-pta*, Δ *proxB*, Δ *ldhA*, Δ *adhE*, Δ *ptsG*, P_{Lglk} , $P_{tacgalP}$, Δ *aceBAK*, Δ *glcB*, Δ *sdhAB*, pMW119-*kgd*). Выход целевого вещества повышен при активации в штамме варианта цикла трикарбонных кислот, опосредованного действием гетерологичной 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, за счет интенсификации анаэробного формирования щавелевоуксусной кислоты. Инактивация в штамме неспецифичной тиюэстеразы *YciA* не оказывала значимого влияния на биосинтетические характеристики продуцента. Повышение экспрессии нативной фосфонолпируваткарбоксилазы обеспечивало рост выхода целевого соединения рекомбинантом, синтезирующим янтарную кислоту в реакциях природного цикла трикарбонных кислот, с 25 до 42%, и с 67 до 75% при индуцированной экспрессии 2-кетоглутарат-декарбоксилазы *Mycobacterium tuberculosis*. Экспрессия в штамме гена пируваткарбоксилазы *Bacillus subtilis* приводила к росту выхода янтарной кислоты до 84%. Функционируя в режиме полноклеточного биокатализатора, сконструированный штамм SUC1.0 P_{L-pucA} (pMW119-*kgd*) демонстрировал коэффициент конверсии субстрата в целевой продукт, достигающий 93%, приближающийся к теоретическому максимуму.

Ключевые слова: 2-кетоглутарат декарбоксилаза, анаэробные пути, оксидативная ветвь ЦТК, полуальдегид янтарной кислоты, янтарная кислота, *Escherichia coli*

DOI: 10.31857/S0555109923060168, **EDN:** CXMYQU

Янтарная кислота является перспективным “строительным блоком” для получения таких промышленно значимых химикатов как 1,4-бутандиол, малеиновый ангидрид, сукцинимид, 2-пирролидон и тетрагидрофуран [1]. В свою очередь, эти соединения служат удобными предшественниками для крупнотоннажного синтеза целого спектра веществ с высокой добавленной стоимостью, включая растворители, полимеры, в том числе биodeградируемые пластики, пластификаторы и фармацевтические субстанции [2].

В настоящее время янтарная кислота производится, в основном, нефтехимическим синтезом. Тем не менее, являясь интермедиатом центрального метаболизма множества живых организмов, янтарная кислота может быть получена в результате микробиологического синтеза из возобновляемого сырья. В частности, с использованием

такого доступного и широко распространенного субстрата, как сахара растительной биомассы.

Природными продуцентами янтарной кислоты являются облигатно или же факультативно анаэробные бактерии *Actinobacillus succinogenes* [3], *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [4] и *Mannheimia succiniciproducens* [5], способные эффективно превращать глюкозу в янтарную кислоту в отсутствие аэрации. Однако культивирование и выращивание этих бактерий требует использования дорогостоящих комплексных питательных сред, что резко ограничивает возможность экономически оправданного применения природных продуцентов в промышленном производстве янтарной кислоты. Вместе с тем, в последние годы значительный прогресс был достигнут в создании эффективных рекомбинантных продуцентов янтарной кислоты на основе таких традиционных для промышленной биотехнологии микроорганизмов,

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

№	Последовательность
P1	5'-tgcgacagatctctcacctaccaacaatgccc-3'
P2	5'-atgtatatctccttcacggccaatgcttcgttc-3'
P3	5'-gacattactacgcaatgcggaatattgttcgtcat-atgtatatctccttc-acggccaatg-3'
P4	5'-ctagtaagatcttgaagcctgctttttataactaagtgg-3'
P5	5'-ggctatcaaacgataagatgggggtgtctggggaatcgctcaagtagtataaaaaagctgaac-3'
P6	5'-gacgtcaccgcttttacgtg-3'
P7	5'-gcgttcaagaatgtgtctc-3'

как *Saccharomyces cerevisiae*, *Corynebacterium glutamicum* и *Escherichia coli* [6]. С учетом развитости доступного генно-инженерного инструментария, нетребовательности к компонентам питательных сред и глубокой изученности метаболизма, клетки *E. coli* представляются наиболее перспективным объектом для создания высокоэффективных рекомбинантных продуцентов соответствующего дикарбоксилата.

В отличие от бактерий рубца, *E. coli* способна синтезировать янтарную кислоту в качестве основного продукта утилизации углеродного субстрата как в анаэробных, так и в аэробных условиях [7]. Основными путями биосинтеза янтарной кислоты в клетках *E. coli* служат реакции цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) и глиокислотного шунта (ГШ). При анаэробии максимальные уровни конверсии субстрата в целевой продукт достигаются в результате совместного действия восстановительной ветви ЦТК и ГШ [8], тогда как в присутствии кислорода эффективный синтез целевого продукта достигается при его предпочтительном формировании через ГШ, а не по оксидативной ветви ЦТК [9]. В первую очередь, это связано с ограниченным потоком углерода через 2-кетоглутарат к сукцинил-КоА и янтарной кислоте в силу сниженной активности 2-кетоглутарат-дегидрогеназы (КФ 1.2.1.105) *E. coli* при выращивании клеток в богатых и содержащих глюкозу средах [10].

Ранее было показано, что эффективное аэробное формирование таких интермедиатов ЦТК, как янтарная [11], фумаровая [12] и яблочная [13] кислоты без участия ГШ возможно при обеспечении в клетках *E. coli* функционирования варианта оксидативного ЦТК, обнаруженного у мико- [14] и цианобактерий [15]. Функциональность данного варианта ЦТК опосредована действием отсутствующей у *E. coli* 2-кетоглутарат-декарбоксилазы (КФ 4.1.1.71) и предполагает обход реакции, катализируемой 2-кетоглутарат-дегидрогеназой, которая, в свою очередь, отсутствует или же неактивна у мико- и цианобактерий, в результате шунтирования 2-кетоглутарата к янтарной кислоте через промежуточное формирование сукцинат по-

луальдегида. В случае фумаровой и яблочной кислот, выходы этих дикарбоксилатов из глюкозы, приближенные к теоретическим максимумам (0.86 моль/моль и 0.94 моль/моль, соответственно), были достигнуты в результате дерепрессии цепи переноса электронов и ассоциированной сукцинатдегидрогеназы (КФ 1.3.5.1). Соответствующий ферментативный комплекс был инактивирован в штамме-продуcente янтарной кислоты и достигнутый относительно невысокий выход целевого вещества (0.67 моль/моль), сопряженный с заметной секрецией побочных продуктов, был, по-видимому, обусловлен дисбалансом в формировании ключевых предшественников ЦТК, щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) и ацетил-КоА.

Цель работы – оптимизация биосинтеза янтарной кислоты из глюкозы рекомбинантным штаммом *E. coli*, способным к формированию целевого соединения по варианту цикла трикарбоновых кислот, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали рестриктазу *Bgl*II, ДНК-полимеразу Taq, T4 ДНК-лигазу (“Thermo Scientific”, Литва), а также высокоточную ДНК-полимеразу Кара HiFi (“Roche”, Швейцария). ПЦР-продукты очищали электрофорезом в агарозном геле и выделяли с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (“Qiagen”, США). Олигонуклеотиды (“Евроген”, Россия) представлены в табл. 1. Компоненты питательных сред, соли и другие реактивы были произведены фирмами “Panreac” (Испания) и “Sigma” (США).

Бактериальные штаммы, плазмиды и среды. Используемые в работе бактериальные штаммы и плазмиды представлены в табл. 2. Штамм *E. coli* K-12 MG1655 (ВКПМ В-6195) и ранее сконструированный штамм *E. coli* MG1655 Δ ackA-pta, Δ poxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_{lglk}, P_{lacgalP}, Δ aceBAK, Δ glcB, Δ sdhAB [11], обозначенный как SUC1.0, обладающий модифицированной системой транспорта и фосфорилирования глюкозы и лишенный путей смешанно-кислотного брожения, глиоксилатно-

Таблица 2. Штаммы и плазмиды

Объект	Генотип	Ссылка
Штамм		
MG1655	Штамм <i>E. coli</i> дикого типа (ВКПМ В-6195)	ВКПМ
SUC1.0	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$	[11]
SUC1.0 $\Delta yciA$	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, $\Delta yciA$	Данная работа
SUC1.0 P_L -ppc	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta poxB$, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, P_L -SD _{φ10} -ppc	Данная работа
SUC1.0 P_L -pusA	<i>E. coli</i> MG1655 $\Delta ackA$ -pta, $\Delta ldhA$, $\Delta adhE$, $\Delta ptsG$, $P_L glk$, $P_{tac galP}$, $\Delta aceBAK$, $\Delta glcB$, $\Delta sdhAB$, $poxB::P_L$ -pusA ^{Bs}	Данная работа
Плазмида		
pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$)	pSC101, <i>bla</i> , <i>cat</i> , $\lambda attL$ -cat- $\lambda attR$	[18]
pKD46	pINT-ts, <i>bla</i> , P_{araB} - λgam -bet-exo	[17]
pMWts-Int/Xis	pSC101-ts, <i>bla</i> , P_R - λxis -int, cIts857	[20]
pMW119-kgd	pMW119 с клонированным геном 2-кетоглутарат декрабоксилазы (<i>kgd</i>) <i>M. tuberculosis</i>	[21]

го шунта и возможности аэробной конверсии янтарной кислоты в фумаровую, были использованы в качестве исходных для конструирования всех полученных в работе рекомбинантов. Бактерии культивировали, используя богатые среды LB, SOB, SOC и минимальную среду M9 [16] с добавлением, при необходимости, ампициллина (100 мкг/мл) или хлорамфеникола (30 мкг/мл).

Конструирование штаммов. Введение целевых модификаций в хромосому *E. coli* осуществляли с использованием методики, описанной ранее [17].

Конструирование фрагмента ДНК для замены нативной регуляторной области гена *ppc* искусственным генетическим элементом P_L -SD_{φ10}, содержащим промотор P_L фага лямбда и эффективный сайт связывания рибосом гена φ10 из фага T7, проводили в несколько стадий. На первой стадии, с помощью ПЦР был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L , последовательность SD гена φ10 из фага T7 и 36 нуклеотидов, комплементарных 5'-концу кодирующей области гена *ppc*.

Фрагмент получали в два этапа. На первом этапе, с использованием в качестве матрицы геномной ДНК фага лямбда и праймеров P1 и P2 был получен фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, промотор P_L и часть последовательности SD гена φ10 из фага T7. Полученный ПЦР-продукт служил матрицей в следующем раунде ПЦР с использованием праймеров P1 и P3. Праймер P3 содержал область комплементарную 3'-концу промотора P_L , последовательность SD

гена φ10 из фага T7 и 36 первых нуклеотидов из рамки считывания гена *ppc*. Параллельно осуществляли вторую стадию конструирования фрагмента ДНК. Фрагмент ДНК, содержащий участок узнавания *Bgl*II, маркер устойчивости к хлорамфениколу (ген *cat*) и 36 нуклеотидов, гомологичных участку ДНК, непосредственно предшествующему кодирующей области гена *ppc*, был получен ПЦР с использованием праймеров P4 и P5 и плазмиды pMW118-($\lambda attL$ -Cm- $\lambda attR$) [18] в качестве матрицы. Полученные фрагменты ДНК были обработаны эндонуклеазой рестрикции *Bgl*II и лигированы T4 ДНК-лигазой. Продукт лигирования амплифицировали с использованием праймеров P3 и P5. Полученный ПЦР-продукт был интегрирован в хромосому штамма *E. coli* MG1655, несущего плазмиду-помощник pKD46 [17]. Соответствие запланированной и экспериментально полученной нуклеотидной последовательности нового регуляторного элемента, введенного перед кодирующей областью гена *ppc*, было подтверждено секвенированием с помощью праймеров P6 и P7.

Индивидуальные генетические модификации вводили в состав хромосом целевых рекомбинантных штаммов с помощью P1-зависимых трансдукций [16]. В случае инактивации гена *yciA* и интеграции на место гена *poxB* гена *pusA* *B. subtilis* под контролем промотора P_L фага лямбда, использовали ранее полученные препараты P1-трансдуцирующих фагов, содержащих соответствующие маркированные модификации [19, 12]. Удаление маркера, фланкированного *att*-сайтами фага лямбда, из хромосом целевых штаммов, проводили с ис-

пользованием плазмиды pMWts-Int/Xis, как описано ранее [20]. Трансформацию штаммов плазмидами осуществляли по стандартной методике.

Культивирование штаммов. Рекомбинантные штаммы выращивали в течение ночи в среде M9, содержащей 2 г/л глюкозы, при 37°C. Полученные ночные культуры (5 мл) разбавляли в 10 раз, добавляя 45 мл среды M9, содержащей 9 г/л (50 мМ) глюкозы, 10 г/л дрожжевого экстракта и 2.5 г/л NaHCO₃. Полученные культуры выращивали в колбах объемом 750 мл на роторной качалке при 250 об./мин в течение 8 ч при 37°C. Индукцию экспрессии гена *kgd*, находящегося под контролем LacI-зависимого промотора, осуществляли добавлением изопропил-β-D-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1.0 мМ через 2.5 ч после начала инкубации.

Двухстадийное культивирование осуществляли следующим образом. Для первоначального накопления биомассы клетки выращивали, как описано выше, и собирали центрифугированием в течение 15 мин при 2000 g и 4°C. Осадок ресуспендировали в 50 мл модифицированной среды M9, лишенной ионов аммония, содержащей 10 г/л глюкозы, 2.5 г/л NaHCO₃ и, при необходимости, 1 мМ ИПТГ. В дальнейшем культуры инкубировали в колбах объемом 750 мл, закрытых ватными пробками, на роторной качалке при 250 об./мин и 37°C в течение 19 ч. Клеточные суспензии центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин и в полученных супернатантах определяли концентрации секретированных метаболитов и остаточной глюкозы. Все эксперименты повторялись не менее трех раз. Для сохранения в штаммах плазмиды pMW119-*kgd* [21] все среды дополнительно содержали 100 мкг/мл ампициллина (“Синтез”, Россия).

Аналитические методы. Концентрации органических кислот и глюкозы в культуральных жидкостях, освобожденных от биомассы центрифугированием, определяли методом ВЭЖХ, как описано ранее [13]. Использовали систему “Waters” HPLC system (США), укомплектованную УФ-или рефрактивным детектором, а также ион-эксклюзионной колонкой Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%) (“Phenomenex”, США) или обращенно-фазовой колонкой Spherisorb-NH2 (“Waters”, США) соответственно. В качестве подвижных фаз использовали 2.5 мМ водный раствор серной кислоты или смесь ацетонитрил-вода в соотношении 75:25 об./об. Углеродный баланс рассчитан как выраженное в % отношение общего количества молей углерода в сформированных продуктах (с учетом потерь CO₂ в ЦТК) к количеству молей углерода потребленной глюкозы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее сконструированный штамм *E. coli* SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (табл. 1) был способен к аэробному синтезу янтарной кислоты из глюкозы как в результате действия оксидативной ветви природного ЦТК, так и при активации в клетках, в результате индукции экспрессии гена *kgd M. tuberculosis*, модифицированного варианта цикла. При этом, биосинтез янтарной кислоты по нативному ЦТК обеспечивал конверсию субстрата в целевой продукт на уровне ~25% и сопровождался секрецией значительных количеств пировиноградной кислоты, тогда как функционирование варианта ЦТК опосредованного действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы обеспечивало выход янтарной кислоты, достигающий 67%, с формированием уксусной кислоты в качестве основного побочного продукта утилизации глюкозы (табл. 3, рис. 1). С учетом инактивации в штамме основных ферментов, ответственных за конверсию в уксусную кислоту пировиноградной кислоты и ацетил-КоА, пируватоксидазы (КФ 1.2.3.3.), фосфотрансацилазы (КФ 2.3.1.8) и ацетаткиназы (КФ 2.7.2.1), последнее могло быть обусловлено действием неспецифичных тиоэстераз при избыточном формировании в клетках ацетил-КоА. Клетки *E. coli* природно обладают как минимум восемью тиоэстеразами, способными гидролизовать тиоэфирную связь молекул ацил-КоА с образованием соответствующих карбоновых кислот. Среди них, неспецифичная тиоэстераза YciA проявляла максимальную активность в отношении ацетил-КоА [22].

Инактивация в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) гена *yciA* не оказывала выраженного влияния на синтез производным штаммом SUC1.0 Δ*yciA* (pMW119-*kgd*) янтарной кислоты ни по нативному, ни по модифицированному ЦТК. Выходы целевого соединения, демонстрируемые штаммом, повышались лишь до ~26 и ~69%, соответственно, при сравнимом снижении уровня синтеза уксусной кислоты (табл. 3, рис. 1).

Ацетил-КоА вовлекается в реакции ЦТК при конденсации с ЩУК. Таким образом, избыточное формирование ацетил-КоА, ведущее к секреции штаммом уксусной кислоты, могло свидетельствовать о недостаточном уровне синтеза в клетках ЩУК. Основным анаплеротическим ферментом *E. coli*, ответственным за формирование ЩУК является фосфоенопируваткарбоксилаза (КФ 4.1.1.31), превращающая в соответствующее вещество фосфоенолпируват (ФЕП). Для интенсификации синтеза ЩУК в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) экспрессия гена *pps*, кодирующего фосфоенолпируваткарбоксилазу, была усилена за счет замены его природной регуляторной области искусственным генетическим элементом, содержащим сильный конститутивный промотор P_L фага лямбда и эф-

Таблица 3. Молярные выходы метаболитов, секретированных исследованными штаммами при аэробной утилизации глюкозы*

Штамм	ИПТГ	Выход метаболитов, моль/моль, %			Углеродный баланс, %
		пировиноградная кислота	уксусная кислота	янтарная кислота	
SUC1.0	—	78.9 ± 0.9	14.1 ± 0.5	24.9 ± 0.6	69
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	20.6 ± 0.9	67.2 ± 0.9	74
SUC1.0 <i>ΔycaA</i>	—	76.0 ± 1.2	11.8 ± 0.4	26.2 ± 0.5	68
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	17.5 ± 0.6	69.4 ± 1.1	75
SUC1.0 P _L - <i>ppc</i>	—	29.2 ± 0.4	15.0 ± 0.7	42.4 ± 0.8	62
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	3.9 ± 0.3	75.6 ± 1.2	77
SUC1.0 P _L - <i>pusA</i>	—	22.3 ± 0.5	14.6 ± 0.6	49.0 ± 0.8	65
(pMW119- <i>kgd</i>)	+	—	3.0 ± 0.2	83.8 ± 1.6	85
SUC1.0 P _L - <i>pusA</i>	—	17.8 ± 0.6	11.4 ± 0.5	52.9 ± 1.0	66
(pMW119- <i>kgd</i>) **	+	4.4 ± 0.2	—	92.8 ± 1.9	95

* Приведены стандартные отклонения для трех независимых экспериментов. ** При функционировании штамма в режиме полноклеточного биокатализатора.

фективный сайт связывания рибосом гена *φ10* из фага T7.

Выход янтарной кислоты, синтезированной соответствующим производным штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*) из глюкозы по оксидативной ветви нативного ЦТК, повышался с 26 до ~42%, в первую очередь за счет выраженного снижения секреции рекомбинантом пировиноградной кислоты (табл. 3, рис. 1). При этом конверсия штаммом субстрата в целевой продукт с участием модифицированного варианта цикла возрастала не столь значительно (с 69 до 75%), но это сопровождалось резким падением формирования штаммом уксусной кислоты (табл. 3, рис. 1).

Таким образом, интенсификация анаэробного формирования ЩУК оказывала позитивный эффект на формирование штаммом янтарной кислоты как по оксидативной ветви нативного ЦТК, так и по варианту цикла, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. Тем не менее, значимая остаточная секреция пировиноградной кислоты штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*) в отсутствие индукции экспрессии гена *kgd*, указывала на возможность дальнейшего улучшения биосинтетических характеристик штамма за счет оптимизации распределения потоков углерода в метаболическом узле ЩУК — ФЕП — пировиноградная кислота — ацетил-КоА.

В клетках *E. coli* фосфоенолпируваткарбоксилаза конкурирует за общий метаболит-предшественник ФЕП с гликолитическими пируваткиназами PycA и PycF (КФ 2.7.1.40), синтезирующими пировиноградную кислоту, необходимую для дальнейшего образования ацетил-КоА. Следовательно, несмотря на то, что внутриклеточная

доступность ФЕП для биосинтеза ЩУК под действием фосфоенолпируваткарбоксилазы была повышена в штамме SUC1.0 (pMW119-*kgd*) в результате обеспечения ФЕП-независимого транспорта и фосфорилирования глюкозы [11], наблюдаемая в определенных условиях секреция базовым штаммом и его производными пировиноградной кислоты указывала на высокую активность в рекомбинантах пируваткиназы.

У многих организмов анаэробное формирование ЩУК возможно в результате прямого карбоксилирования пировиноградной кислоты [23]. Однако у *E. coli* активность соответствующего фермента, пируваткарбоксилазы (КФ 6.4.1.1), отсутствует. Вместе с тем было показано, что экспрессия гетерологичной пируваткарбоксилазы в рекомбинантных штаммах *E. coli* способствовала как анаэробному, так и аэробному синтезу ими четырехуглеродных дикарбоновых кислот — интермедиатов ЦТК в результате эффективного туннелирования в реакции цикла гликолитически сформированной пировиноградной кислоты [12, 13, 24]. Соответственно, ген *pusA* *B. subtilis*, кодирующий пируваткарбоксилазу, был интегрирован в хромосому штамма SUC1.0 (pMW119-*kgd*) под контролем промотора P_L фага лямбда на место ранее инактивированного гена *roxB*.

Штамм SUC1.0 P_L-*pusA* (pMW119-*kgd*) конвертировал глюкозу в янтарную кислоту в реакциях нативного или же модифицированного ЦТК с выходами, возросшими до 49 и ~84% соответственно (табл. 3, рис. 1). Наряду с этим, снижение уровня накопления штаммом пировиноградной и уксусной кислот было несколько более выраженным по сравнению со штаммом SUC1.0 P_L-*ppc* (pMW119-*kgd*). По-видимому, это являлось след-

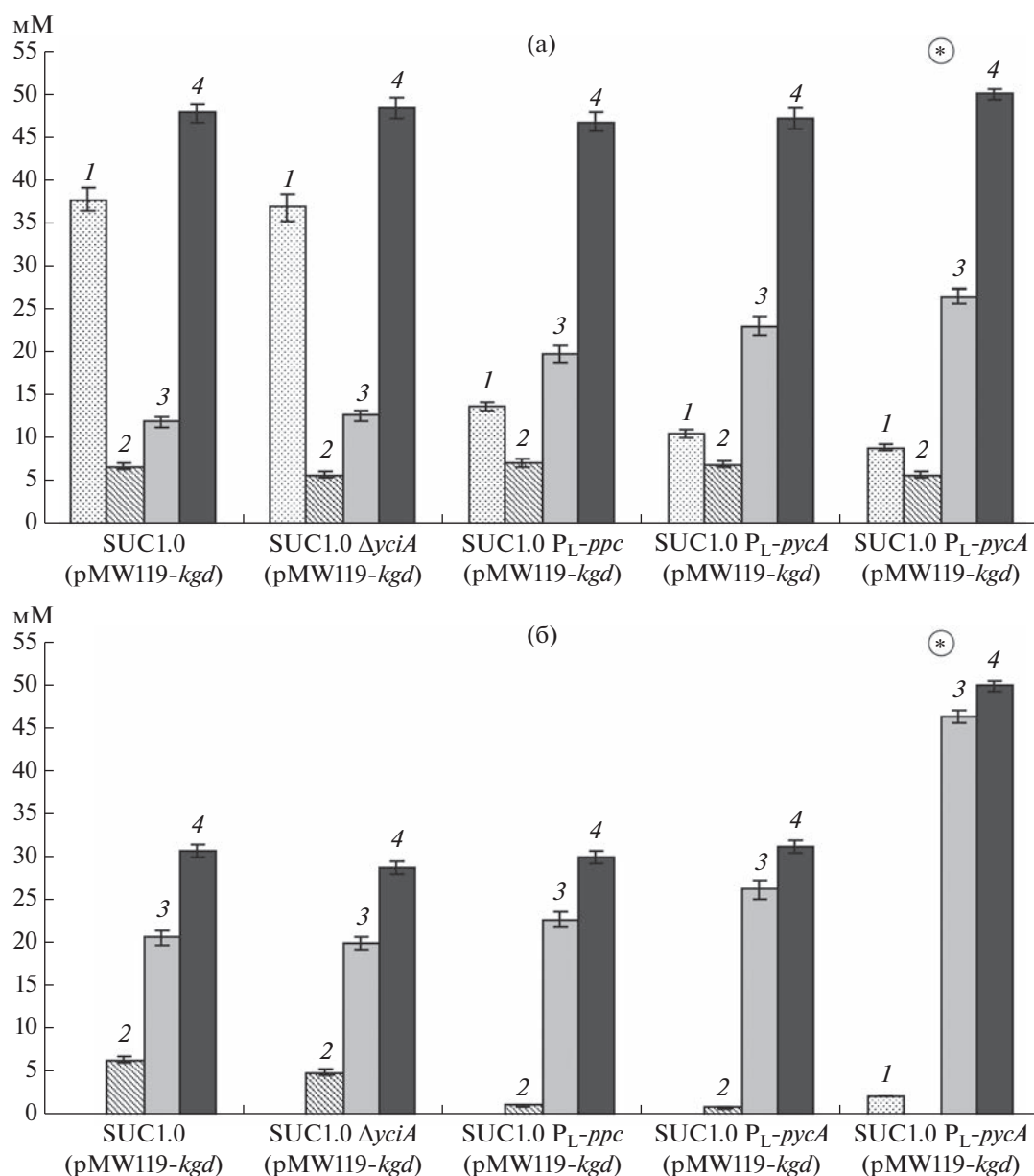


Рис. 1 Концентрации метаболитов и потребленной сконструированными штаммами глюкозы (мМ) в отсутствие (а) и присутствии (б) в среде ИПТГ: 1 – пируват, 2 – ацетат, 3 – сукцинат, 4 – глюкоза. *При функционировании штамма SUC1.0 P_L-pysA (pMW119-kgd) в режиме полноклеточного биокатализатора.

ствием возникновения в штамме прямой конкуренции за общий предшественник, пировиноградную кислоту, между пируваткарбоксилазой, формирующей ЦУК, и пируватдегидрогеназой, ответственной за образование ацетил-КоА.

При этом, значение углеродного баланса, демонстрируемого штаммом SUC1.0 P_L-pysA (pMW119-kgd) в ходе синтеза янтарной кислоты из глюкозы по варианту ЦТК, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, возрастало до 85% (табл. 3). Это указывало на интенсификацию цикла в клетках рекомбинанта и на усиление по-

тока углерода через 2-кетоглутарат к янтарной кислоте через сукцинат полуальдегид.

Следует отметить, что значения углеродного баланса, демонстрируемые всеми сконструированными штаммами, не достигали 100% в результате эффекта избыточного метаболизма глутаминовой кислоты (“glutamate overflow”) [25, 26]. Этот эффект проявляется в *E. coli*, когда поток углерода через ЦТК превосходит каталитические возможности экспрессированной клеткой 2-кетоглутарат-дегидрогеназы, приводя к формированию из избыточных количеств 2-кетоглутарата

глутаминовой кислоты вместо сукцинил-КоА. Как упоминалось выше, известно, что при росте в средах содержащих глюкозу, экспрессия генов *sucAB*, кодирующих компоненты 2-кетоглутарат-дегидрогеназного ферментативного комплекса, в клетках *E. coli* резко снижена [10]. Соответственно, эффект был более выраженным в случае синтеза штаммами янтарной кислоты по оксидативной ветви нативного ЦТК, обуславливая меньшие значения углеродного баланса. Так как концентрации секретированной штаммами глутаминовой кислоты не определялись в данном исследовании, повышенные показатели углеродного баланса, демонстрируемые рекомбинантами, экспрессирующими гетерологичную 2-кетоглутарат-декарбоксилазу, очевидно были обусловлены ростом вклада в расчетные значения детектированных продуктов утилизации глюкозы, в первую очередь янтарной кислоты.

В этой связи, важным представлялось то, что клетки *E. coli* способны использовать 2-кетоглутарат и, в некоторых случаях, глутаминовую кислоту в качестве единственных источников углерода. Таким образом, соответствующие соединения, секретированные штаммом SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*) в ходе биосинтеза янтарной кислоты, потенциально могли бы быть реассимилированы им после истощения в среде предпочтительного источника углерода — глюкозы. Подобной реассимиляции могли бы способствовать как продление времени культивирования, так и реализация процесса двухстадийной ферментации. Соответствующий процесс предполагает накопление биомассы штамма-продуцента на первой стадии с последующей биосинтетической стадией, в которой штамм функционирует в режиме полноклеточного биокатализатора, эффективно конвертируя субстрат в целевой продукт в отсутствие роста. При этом, проведение двухстадийной ферментации представлялось более предпочтительным вариантом, так как вторая биосинтетическая стадия могла быть реализована в среде лишенной ионов аммония, что исключало бы синтез штаммом глутаминовой кислоты, способствуя, напротив, накоплению легкоусвояемого *E. coli* [27] 2-кетоглутарата.

При функционировании в режиме полноклеточного биокатализатора, биосинтетические характеристики штамма SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*), формирующего янтарную кислоту по оксидативной ветви нативного ЦТК, значимо не отличались от таковых, продемонстрированных при синтезе целевого вещества сопряженном с ростом (табл. 3, рис. 1). Значение углеродного баланса оставалось практически неизменным, указывая на невозможность эффективной реассимиляции штаммом 2-кетоглутарата с направлением его к янтарной кислоте под действием 2-кетоглутарат-дегидрогеназы и сукцинил-КоА синтазы. Вместе с тем, в случае функционирования в штамме варианта

ЦТК, опосредованного действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы, выход целевого вещества, сформированного штаммом из глюкозы, повышался до ~93%. Рекомбинант потреблял всю доступную глюкозу и, при этом, значение рассчитанного углеродного баланса возрастало до 95%, указывая на фактически исчерпывающую конверсию углеродного субстрата в секретированные продукты. Также, соответствующее изменение значений углеродного баланса и выхода янтарной кислоты свидетельствовало об эффективном потреблении штаммом секретированного в ходе утилизации глюкозы 2-кетоглутарата с его последующим превращением в целевое соединение.

В результате проведенного исследования был оптимизирован биосинтез янтарной кислоты из глюкозы ранее сконструированным рекомбинантным штаммом *E. coli*, способным к формированию целевого соединения по варианту ЦТК, опосредованному действием 2-кетоглутарат-декарбоксилазы. Улучшению биосинтетических характеристик рекомбинанта в первую очередь поспособствовала интенсификация в клетках анаэробного формирования ЦУК из пировиноградной кислоты под действием гетерологичной пируваткарбоксилазы. Сконструированный штамм SUC1.0 *P_L-pusA* (pMW119-*kgd*) был способен к аэробной конверсии глюкозы в янтарную кислоту с выходом, составляющим ~93% и практически достигающим теоретического максимума. Полученный рекомбинант может служить в качестве эффективного полноклеточного биокатализатора для получения янтарной кислоты из возобновляемого растительного сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mazzoli R. // Fermentation. 2021 V. 7. № 4. 248. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040248>
2. Escanciano I.A., Wojtusik M., Esteban J., Ladero M., Santos V.E. // Fermentation. 2022. V. 8. № 8. 368. <https://doi.org/10.3390/fermentation8080368>
3. Guettler M.V., Rumler D., Jain M.K. // Int. J. Syst. Bacteriol. 1999. V. 49. P. 207–216.
4. Nghiem N.P., Davison B.H., Suttle B.E., Richardson G.R. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1997. V. 63–65. P. 565–576.
5. Lee P.C., Lee S.Y., Hong S.H., Chang H.N. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 58. № 5. P. 663–668.
6. Liu X., Zhao G., Sun S., Fan C., Feng X.m., Xiong P. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2022. V. 10. 843887. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.843887>
7. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Моржакова А.А., Шакулов Р.С., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2012. № 2. С. 8–20.
8. Skorokhodova A.Y., Morzhakova A.A., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // J. Biotechnol. 2015. V. 214. P. 33–42.
9. Lin H., Bennett G.N., San K.Y. // Metab. Eng. 2005. V. 7. № 2. P. 116–127.

10. Park S.J., Chao G., Gunsalus R.P. // J. Bacteriol. 1997. V. 179. № 13. P. 4138–4142.
11. Скороходова А.Ю., Стасенко А.А., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 3. С. 244–252.
12. Skorokhodova A.Y., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // Biotechnol. Rep. 2022. V. 33. e00703. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00703>
13. Skorokhodova A.Y., Stasenko A.A., Krasilnikova N.V., Gulevich A.Y., Debabov V.G. // Fermentation. 2022. V. 8. № 12. 738. <https://doi.org/10.3390/fermentation8120738>
14. Tian J., Bryk R., Itoh M., Suematsu M., Nathan C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 30. P. 10670–10675.
15. Zhang S., Bryant D.A. // Science. 2011. V. 334. № 6062. P. 1551–1553.
16. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. // Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed., N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 1659 p.
17. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. № 12. P. 6640–6645.
18. Каташкина Ж.И., Скороходова А.Ю., Зименков Д.В., Гулевич А.Ю., Минаева Н.И., Дорошенко В.Г., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2005. Т. 39. № 5. С. 823–831.
19. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Прикл. биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 117–126.
20. Гулевич А.Ю., Скороходова А.Ю., Ермишев В.Ю., Крылов А.А., Минаева Н.И., Полонская З.М., Зименков Д.В., Бирюкова И.В., Машко С.В. // Молекулярная биология. 2009. Т. 43. № 3. С. 547–557.
21. Гулевич А.Ю., Сконечный М.С., Сухоженко А.В., Скороходова А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2015. № 2. С. 46–54.
22. Clomburg J.M., Vick J.E., Blankschien M.D., Rodríguez-Moya M., Gonzalez R. // ACS Synth. Biol. 2012. V. 1. P. 541–554.
23. Jitrapakdee S., St. Maurice M., Rayment I., Cleland W.W., Wallace J.C., Attwood P.V. // Biochem. J. 2008. V. 413. № 3. P. 369–387.
24. Скороходова А.Ю., Гулевич А.Ю., Дебабов В.Г. // Биотехнология. 2018. Т. 34. № 2. С. 18–25.
25. Chang D.E., Shin S., Rhee J.S., Pan J.G. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 21. P. 6656–6663.
26. Burgard A., Burk M.J., Osterhout R., Van Dien S., Yim H. // Curr. Opin. Biotechnol. 2016. V. 42. P. 118–125.
27. Seol W., Shatkin A.J. // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 9. P. 6409–6413.

Optimization of Aerobic Synthesis of Succinic Acid from Glucose by Recombinant *Escherichia coli* Strains Through the Variant Tricarboxylic Acid Cycle Mediated by the Action of 2-ketoglutarate-decarboxylase

A. Yu. Skorokhodova^a, *, A. Yu. Gulevich^a, and V. G. Debabov^a

^a Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia

*e-mail: sasha.skorokhodova@gmail.com

The biosynthesis of succinic acid from glucose by the previously engineered *E. coli* strain SUC1.0 (pMW119-*kgd*) (MG1655 Δ ackA-pta, Δ poxB, Δ ldhA, Δ adhE, Δ ptsG, P_Lglk, P_{lac}galP, Δ aceBAK, Δ glcB, Δ sdhAB, pMW119-*kgd*) was optimized. The yield of the target substance was increased, upon the activation in the strain of the variant tricarboxylic acid cycle, mediated by the action of heterologous 2-ketoglutarate decarboxylase, due to the intensification of the anaplerotic formation of oxaloacetic acid. Inactivation of the nonspecific thioesterase YciA in the strain did not considerably change the biosynthetic characteristics of the producer. The enhancement of the expression of native phosphoenolpyruvate carboxylase led to an increase in the yield of the target compound by the recombinant synthesizing succinic acid via the reactions of the native tricarboxylic acid cycle from 25 to 42%, and from 67 to 75% upon the induced expression of *Mycobacterium tuberculosis* 2-ketoglutarate decarboxylase. Expression in the strain of pyruvate carboxylase gene from *Bacillus subtilis* resulted in an increase in the yield of succinic acid up to 84%. Functioning in whole-cell biocatalyst mode, the engineered strain SUC1.0 P_L-*pycA* (pMW119-*kgd*) demonstrated a substrate to target product conversion ratio reaching 93%, approaching the corresponding theoretical maximum.

Keywords: 2-ketoglutarate decarboxylase, anaplerotic pathways, oxidative branch of the TCA cycle, succinate semialdehyde, succinic acid, *Escherichia coli*

УДК 579.852.11

КОНЬЮГАЦИОННАЯ СИСТЕМА ДОСТАВКИ ВЕКТОРОВ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКИ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

© 2023 г. А. С. Гуринович¹, И. А. Федюшко¹, М. А. Титок^{1, *}

¹ Белорусский государственный университет, биологический факультет,
кафедра микробиологии, Минск, 220030 Республика Беларусь

*e-mail: ma_titok@bsu.by

Поступила в редакцию 03.05.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Разработана система доставки векторов для молекулярного клонирования в клетки бактерий рода *Bacillus*. Особенность созданной системы заключается в использовании плазмиды pBS72, обеспечивающей конъюгационный перенос полученного условно летального вектора pKS1mob в клетки исследуемых бактерий. Способность вектора pKS1mob реплицироваться в клетках *Escherichia coli* и *B. subtilis* при пониженной температуре (30°C), наличие двух полилинкеров вокруг гена канамицин-резистентности позволяет клонировать в его состав фрагменты целевых генов с использованием традиционных генно-инженерных подходов. Инактивация гена *rok* в плазмиде pBS72 позволила с высокой эффективностью трансформировать содержащий ее штамм сконструированным вектором pKS1mob. Скрещивание донорного штамма *B. subtilis* 168, содержащего конъюгативную pBS72 и мобилизуемую pKS1mob плазмиды, со штаммом-реципиентом рода *Bacillus* позволило ввести в него плазмиду pKS1mob. Показана возможность использования созданной системы для инактивации гена *codY* бактерий *Bacillus licheniformis*.

Ключевые слова: *B. subtilis*, плаزمида pBS72, Rok белок, вектор pKS1mob, конъюгационный перенос, компетентность

DOI: 10.31857/S0555109923060065, **EDN:** CVNJOP

Бактерии рода *Bacillus*, благодаря способности синтезировать широкий спектр биологически активных соединений, широко используются в биотехнологии в качестве продуцентов ферментов, антибиотиков, стимуляторов роста растений и животных [1]. В связи с этим большой практический и научный интерес представляют исследования, направленные на изучение функциональной организации их геномов, а также отдельных генетических детерминант, определяющих практически важные свойства. Следует отметить, что для генетического анализа бактерий используются подходы, основанные на естественных процессах генетического обмена, в ходе которых генетический материал, попадая в клетку путем конъюгации, трансформации и трансдукции, встраивается в геном за счет гомологичной рекомбинации, либо наследуется вне хромосомы в составе мобильных генетических элементов. Эти широко распространенные в мире прокариот процессы обеспечивают появление новых комбинаций генов и быструю адаптацию микроорганизмов в изменяющихся условиях внешней среды. В лабораторных условиях для большинства бактерий тра-

диционно используется метод трансформации (электропорации), позволяющий вводить генно-инженерные конструкции для изучения функциональной организации генетического материала и создания штаммов с заданными свойствами. Однако, несмотря на наличие в геноме представителей рода *Bacillus* (например, *Bacillus subtilis*) генетической системы, обеспечивающей их природную компетентность, внесение в клетки этих бактерий чужеродной ДНК может быть затруднено, либо невозможно. Весьма показательным является пример коллекционного штамма *B. subtilis* 168, широко используемого для генетических и генно-инженерных исследований. Природные бактерии, на основе которых этот штамм был получен, содержали плазмиду pBS32, препятствующую трансформации [2]. Аналогичное наблюдали у природных бактерий *B. subtilis*, содержащих конъюгативную плазмиду pLS20 [3]. Сложности, возникающие при введении чужеродной ДНК путем трансформации (электропорации), наблюдали и для других биотехнологически значимых бактерий этой таксономической группы (например, природных бактерий *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amy-*

loliuefaciens, *B. pumilus* и др.) [4]. При этом в клетках многих из них присутствовали плазмиды, роль которых в подавлении процесса трансформации до сих пор не известна. В связи с этим, для введения генно-инженерных конструкций в клетки данных микроорганизмов пристальное внимание уделяется процессу конъюгации. В настоящее время показана возможность использования конъюгативного транспозона ICEBs1 и конъюгативной плазмиды pLS20 [4, 5]. Поскольку конъюгационные системы этих мобильных элементов подвержены негативной регуляции, было важно изучить возможность использования плазмиды pBS72, способной передаваться путем конъюгации и мобилизовать конъюгационный перенос векторных молекул вне зависимости от условий скрещивания (в частности, перенос не зависел от времени скрещивания и обеспечивался на плотной и в жидкой среде различного химического состава) [6].

Цель настоящей работы – создание системы конъюгационной переноса векторов в клетки бактерий рода *Bacillus* с использованием плазмиды pBS72.

МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы *B. subtilis* 72 с плазмидой pBS72 [7], *B. subtilis* d16, *B. licheniformis* FD9, *B. velezensis* 71A3 из коллекции кафедры микробиологии Белорусского государственного университета (БГУ), коллекционные штаммы *B. subtilis* 168, содержащие маркированную геном эритромицинрезистентности плазмиду pBS72 и/или плазмиду pCB16 [8], *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* TG1 и фитопатогенные грибы *Fusarium culmorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria radicina* из коллекции кафедры ботаники БГУ, а также плазмиды pMTL21C и pKS1 [9]. Бактерии выращивали в полноценной среде LB [10] и минимальной среде [11] при 37°C с аэрацией (240 об./мин). Для роста фитопатогенных грибов использовали картофельно-морковный агар: картофель – 20 г/л, морковь – 20 г/л, агар – 15 г/л.

В работе использовали коммерческие препараты ампициллина (100 мкг/мл), хлорамфеникола (10 мкг/мл), эритромицина (10 мкг/мл), стрептомицина (50 мкг/мл), тетрациклина (25 мкг/мл), и канамицина (50 мкг/мл).

Тотальную ДНК выделяли саркозиевым методом [12]. Трансформацию бактерий *E. coli* и *B. subtilis* осуществляли согласно методам, приведенным в работах [10, 13].

Для амплификации использовали Phusion HF ДНК-полимеразу производства “ThermoScientific” (США) и праймеры производства ОДО “Праймтех” (Беларусь). Реакционная смесь для ПЦР (50 мкл) содержала около 100 нг ДНК-матрицы, 0,2 ммоль/л каждого дНТФ, 0,5 мкмоль/л каждого праймера,

0,02 ед. ДНК-полимеразы и соответствующий буфер.

Для амплификации фрагмента гена *rok* плазмиды pBS72 размером 421 п.н. использовали праймеры Frok-nok (5'-TCT CTC TCT ACC TGT TTT TGC AG-3') и Rrok-nok (5'-TGT GTCAAA TGC CAA ACG AC-3'), для амплификации *mobV*-сайта плазмиды pBC16 размером 1863 п.н. – праймеры Fmob (5'-GC GCG ATT GCT GAA TAA AAG ATA C-3') и Rmob (5'-CAC TTC AAC GCA CCT TTC AG-3'), для амплификации гена *Km^R* плазмиды pKS1 размером 1009 п.н. – праймеры FKmR (5'-CGGT CCG GAG TCG ATA CTA TGT TAT ACG CCA AC-3') и RKmR (5'-CGG TCC GGA CGG CAA TTG AGC TTT TTA GAC ATC TAA ATC TAG GTA C-3'), содержащие на 5'-концах сайт рестрикции для фермента Kpn2I.

Амплификацию фрагментов гена *codY* бактерий *B. licheniformis* FD9 размером 239 п.н. и 156 п.н. проводили соответственно с использованием праймеров F1codY (5'-CCG CGG CGG AAA CGT CAT CTA ACC TTG-3') и R1codY (5'-GAT CTC TTC CGC TTT CTC TCT GAT CCG GAG AAT TTC CAT TCC TAC GAC AGT G-3'), F2codY (5'-CGG TCC GGA TCA GAG AGA AAG CGG AAG AGA TC-3') и R2codY (5'-CAA TTT TAC TAG CGA CAA GCA GG-3'). Внутренние праймеры R1codY и F2codY содержали на 5'-концах сайт рестрикции для фермента Kpn2I. Полученные ПЦР-продукты использовали в качестве матрицы для амплификации гена *codY* размером 381 п.н. с внешними праймерами F1codY и R2codY, содержащими на 5'-концах сайты рестрикции для ферментов *SacII* и *Eco147I* соответственно.

Рестрикцию и лигирование осуществляли в условиях, рекомендуемых фирмой-изготовителем (“Thermo Scientific”, США). Все продукты ПЦР встраивали в вектор pMTL21C в уникальный *SmaI*-сайт. Последовательность *mobV*-сайта вырезали из плазмиды pMTL21C рестриктазами *KpnI* и *HindIII* с последующим встраиванием в плазмиду pKS1, предварительно обработанную этими же рестриктазами. В сайт *Kpn2I* гена *codY* встраивали маркер канамицинрезистентности, вырезанный из плазмиды pMTL21C с помощью этой же рестриктазы. Встраивание гена *codY*, маркированного канамицинрезистентностью, осуществляли между сайтами *SacII* и *Eco147I* вектора pKS1mob.

Интеграцию вектора pMTL21C, содержащего фрагмент гена *rok*, в состав плазмиды pBS72 устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймера M13F (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTG-3'), отжигающегося на последовательности вектора pMTL21C, и праймера Rrok-out (5'-GTT GGG TTA TCG ATA GCG AAG-3'), комплементарно связывающегося вне области встраивания гибридной плазмиды (был

получен фрагмент искомого размера 567 п.н.). Интеграцию гибридного вектора pKS1mob, содержащего фрагмент гена *codY*, в хромосому бактерий *B. licheniformis* FD9 устанавливали с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймера FKmR (5'-CGG TCC GGA GTC GAT ACT ATG TTA TAC GCC AAC-3'), отжигающегося на последовательности вектора pKS1mob, и праймера FcodY-out (5'-GAA CAT TTT CGT CGT CAG CC-3'), комплементарно связывающегося вне области встраивания гибридной плазмиды. В результате был получен фрагмент искомого размера 1385 п.н.

Для определения частоты переноса конъюгативной плазмиды pBS72 в изогенной системе скрещивания культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста смешивали 1 : 1 и скрещивали в жидкой среде LB с аэрацией в течение 1, 2, 3, 4 или 24 ч с последующим высевом на селективные среды. Для определения частоты переноса мобилизуемого вектора в гетерогенных системах культуру донора и реципиента в логарифмической фазе роста разводили в 10 раз в свежей полноценной среде (800 мкл) с последующим культивированием с аэрацией в течение 3 или 24 ч при температуре 30°C. После 3 и 24 ч скрещивания клетки высевали на минимальную среду с канамицином и культивировали при 37°C. Полученные трансконъюганты проверяли на наличие маркеров антибиотикорезистентности методом реплик. Присутствие в клетках трансконъюгантов плазмид дополнительно определяли с использованием ПЦР-анализа.

Определение антифунгальной активности осуществляли методом посева 100 мкл взвеси конидий в концентрации (100 кон./мл) на поверхность подсушенной агаризованной питательной среды. После этого вырезали лунки диаметром 0.5 см, в которые вносили по 100 мкл жидкой культуры бактерий-антагонистов и культивировали при 28°C в течение 5 сут. Через 5 сут отмечали зону лизиса. В качестве контроля использовали питательный бульон, в котором выращивали штаммы-антагонисты. На основании трех независимых экспериментов с шестью повторами проводили статистическую обработку данных с использованием программы Microsoft Excel. Достоверность различий была подтверждена однофакторным дисперсионным анализом.

Для анализа аминокислотных последовательностей белков Rok, кодируемых плазмидами pBS72 (APB62404) и pLS20 (BAJ76946.1), а также хромосомным геном бактерий *B. subtilis* 168 (NP_389307) использовали программу BLASTN2.10.0 (сайт: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Аминокислотные последовательности гомологичных белков выравнивали с помощью программы "ClustalOmega"

(сайт <https://www.ebi.ac.uk/Tools/common/tools/help/index.html?tool=clustalo>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания системы конъюгационного переноса векторов с использованием плазмиды pBS72 необходимо было решить следующие задачи. Во-первых, определить возможность введения векторов в клетки коллекционных бактерий *B. subtilis* 168, содержащих маркированную плазмиду pBS72, и при отсутствии трансформации установить наличие в составе плазмидного репликона генов, ингибирующих данный процесс. Во-вторых, сконструировать вектор пригодный для молекулярного клонирования и способный передаваться путем конъюгации за счет плазмиды pBS72. Для этих целей предполагали использовать известный вектор pKS1, способный копироваться в клетках *E. coli*, отличительной особенностью которого являлась зависимость от температуры репликация. Он стабильно наследовался в бактериях разных систематических групп (*E. coli* и рода *Bacillus*) при температуре 30°C и утрачивался клетками при 37°C [9]. Это позволяло использовать данный репликон для введения чужеродного генетического материала при пониженной температуре и направленного мутагенеза при повышенной температуре культивирования. Для этого необходимо было клонировать в его состав *mobV*-сайт, обеспечивающий его конъюгационный перенос плазмидой pBS72. И, наконец, установить возможность использования созданной системы для генетического анализа бактерий рода *Bacillus*. Для этого предполагали встроить в состав созданного мобилизуемого вектора фрагменты бактериального гена *codY* природных бактерий *B. licheniformis* FD9. Поскольку известно, что данная детерминанта кодировала негативный регулятор синтеза антимикробных соединений (показана негативная регуляция синтеза лихенизина, определяющего антифунгальные свойства данных бактерий) [15], предполагали, что внесение направленной мутации в данный ген приведет к изменению антифунгальной активности исследуемых бактерий.

На первом этапе работы было установлено, что бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду pBS72 не трансформируются вектором pKS1. Отсутствие трансформантов свидетельствовало о присутствии в геноме плазмиды pBS72 детерминант, подавляющих поглощение чужеродной ДНК. Действительно, в результате анализа полной нуклеотидной последовательности плазмиды pBS72 была выявлена открытая рамка считывания 135, способная кодировать белок Rok, ингибирующий трансформацию у бактерий *B. subtilis*. Представлялось важным охарактеризовать данный полипептид и определить его роль в трансформации, что имело принципиальное значение при введении

Rok (pLS20)	-----MLTERQALQDRLEKIDKDEITLIKEYQKQRNQIFERLRE	39
Rok (pBS72)	MCQMPNDLIYGMNLIKGEVLHLFSEREALRLRFEQLNVAESTVRHEFOKEREKIFKRLGE	60
Rok (<i>B.s.</i> 168)	-----MFNEREALRLRLEQLNEAEVKVIREYQIERDKIYAKLRE	39
	::* : :* : ::** *:*: : *.: : :*: *	
Rok (pLS20)	IDREEYK-----NLPDLKQLASLEIHQKSK-----	64
Rok (pBS72)	LDLIEKTNKSKE-----SLDLARRAANDLNKSKK-----ENI	93
Rok (<i>B.s.</i> 168)	LDRNGSPSEIKKDFRSEKKPDSLPLVLAELAAQEIRSYQPQSQSQSVQPQLQSISSLPAGI	99
	:***** * * * * * :*:***** ****	
	↓ ↓ ↓ ↓	
Rok (pLS20)	-----PERDIRKHVAVNILKVNPDGLSADELRSKIEKETNMQILNMTNFM	109
Rok (pBS72)	RNTSEKNNISRETSTSKAAIFRETAIKILNKNKPISSDLQKQVERETGMQITNMTTFM	153
Rok (<i>B.s.</i> 168)	PDGTRRRRGRTARPGSAAKLREAAIKTLKRHNAAIKSSELQKEIEKESGLEIPNMTTFM	159
	::*****::* :* :* :*****::* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :*	
	↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓	
Rok (pLS20)	RSIMEKNPSVKKPRRGYYRFEEM-----	132
Rok (pBS72)	NNLMKKYPEVKKPNRGLYLIDKR-----	176
Rok (<i>B.s.</i> 168)	QSLIKMYPEVKKPYRGQYILEGEIESAESANE	191
	** : : : * * * * * : : * *	

Рис. 1 Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белков Rok, кодируемых плазмидами pBS72 и pLS20 и хромосомным геном бактерий *B. subtilis* 168: * – функционально значимые несинонимические замены; : – функционально незначимые замены. Функционально значимые аминокислоты, определяющие взаимодействие с молекулой ДНК, обозначены стрелками; N-концевые, спейсерные и С-концевые аминокислотные последовательности обозначены сплошной, пунктирной и жирной пунктирной линиями соответственно (согласно данным, приведенным в работе [17]).

векторов в клетки, содержащие плазмиду pBS72. Молекулярно-генетический анализ исследуемого белка Rok в сравнении с известными, кодируемыми хромосомным геном *B. subtilis* и плазмидой pLS20, позволил установить, что он подобно гомологичным полипептидам содержал вариабельную N-концевую (аминокислоты 1–45) и консервативную C-концевую (аминокислоты 96–191) аминокислотную последовательности (рис. 1). Исследуемый белок проявлял больше сходства с N- и C-концевыми последовательностями хромосомного белка бактерий *B. subtilis* 168 (идентичность составила 63 и 59% соответственно), чем с таковым, кодируемым плазмидой pLS20 (идентичность составила 42 и 59% соответственно). Присутствие в C-концевом участке ключевых аминокислот, обеспечивающих связывание с молекулами ДНК, свидетельствовало в пользу его возможной функциональной активности. Известно, что основная роль белка Rok заключалась в репрессии транскрипции гена *comK*, являющегося позитивным регулятором экспрессии большого числа генов, продукты которых необходимы для установления состояния компетентности и поглощения чужеродной ДНК бактериальной клеткой в процессе трансформации [16]. Следует отметить, что функция подавления трансформации установлена для белка Rok, кодируемого плазмидой pLS20. Показано, что мутация в гене *rok* увеличивала в 100 раз способность содержащих плазмиду pLS20 бактерий трансформироваться чужеродной ДНК

[3]. Для белка, кодируемого хромосомным геном *rok B. subtilis*, изучен более широкий спектр функциональной активности. Помимо подавления компетентности установлена его способность негативно регулировать экспрессию большого числа генов (около 250), в том числе в составе мобильных генетических элементов (в частности, ингибировать конъюгационный перенос транспозона ICE *BsI*) [17].

Сходство белка, кодируемого открытой рамкой считывания 135 с известными полипептидами, подавляющими трансформацию, обосновало внесение мутации в ген *rok* плазмиды pBS72. Инактивацию данной детерминанты осуществляли с использованием суицидального вектора pMTL21, содержащего фрагмент гена *rok*. В результате встраивания данного вектора в состав исследуемой плазмиды был отобран мутантный вариант (локализация инсерции определена с использованием ПЦР-анализа). При этом, помимо нарушения в гене *rok*, мутантная плазида содержала селективный маркер хлорамфениколрезистентности. Мутант получен в результате встраивания в ген *rok* плазмиды pMTL21. Использование бактерий *B. subtilis* 168, содержащих мутантную плазмиду pBS72 с нарушенным геном *rok*, позволило трансформировать их вектором pKS1. При этом частота трансформации вектора не отличалась от таковой при его внесении в безплазмидные клетки *B. subtilis* 168. и составила 4.6×10^3 и 5.9×10^3 соответственно (приведены значения ча

стот трансформации рассчитанные на 1 мкг ДНК плазмиды рKS1). Кроме того, было установлено, что мутация гена *rok* не влияла на частоту конъюгационного переноса плазмиды рBS72. Частота переноса исходной и мутантной плазмид в изогенной системе бактерий *B. subtilis* составила 10^{-2} – 10^{-3} при скрещиваниях в жидкой среде в течение 1, 2, 3, 4 и 24 ч (приведены частоты переноса рассчитанные относительно количества клеток донора).

Следующий этап работы был посвящен созданию мобилизуемого вектора рKS1. Для этого в его состав с использованием генно-инженерных манипуляций (ПЦР, рестрикция) был встроен *mobV*-сайт размером 1863 п.н. плазмиды рBC16, обеспечивающий ее конъюгационный перенос плазмидой рBS72 [6]. На основании ПЦР- и рестрикционного анализа было установлено, что полученная конструкция содержала все функционально значимые участки для ее дальнейшего использования. В частности, термочувствительный по репликации *rep*-ген, *mobV*-сайт, ген эритромицинрезистентности, а также два полилинкера, расположенных перед и за геном канамицинрезистентности: *BseYI*, *PspFI*, *XmaI*, *SmaI*, *SpeI*, *NotI*, *SacII*, *BstXI*, *BstZ17I* и *HindIII*, *SbfI*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *ZraI*, *SalI* соответственно, пригодные для встраивания фрагментов чужеродной ДНК (рис. 2). Поскольку *mobV*-сайт изолировали с использованием ПЦР, не исключали возможности наличия в нем нуклеотидных замен и, как следствие, потерю функциональной активности. Для доказательства способности встроеного *mob*-сайта обеспечивать конъюгационный перенос плазмиды рKS1 (обозначена как рKSmob) ее вносили в бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72 с нарушенным геном *rok*, и проверяли частоту ее переноса в скрещиваниях с природными бактериями рода *Bacillus* (табл. 1).

В результате при скрещивании в течение 3 и 24 ч был установлен конъюгационный перенос вектора рKS1mob в клетки всех исследованных бактерий. При этом частота его переноса в клетки бактерий *B. subtilis* d16 и *B. licheniformis* FD9 составила соответственно 10^{-4} и 10^{-6} вне зависимости от времени скрещивания. Тогда как в клетки *B. velezensis* 713A перенос вектора снижался со временем и составил 1.80×10^{-6} при скрещивании в течение 3 и 2.93×10^{-8} при скрещивании в течение 24 ч (табл. 1).

Установлено, что в клетках отобранных трансконъюгатов отсутствовала мобилизующая плаزمиды рBS72, а векторная молекула рKS1mob не наследовалась при культивировании бактерий в неселективных условиях при 37°C. Полученные результаты обосновали возможность использования вектора рKS1mob для клонирования фрагментов гена *codY* природных бактерий *B. licheni-*

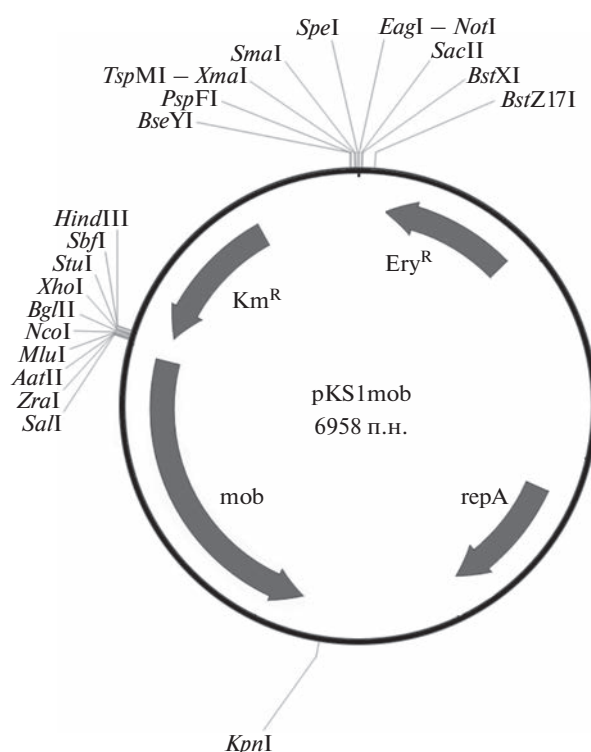


Рис. 2. Схема организации вектора рKS1mob: *rep* – ген, кодирующий термочувствительный белок инициации репликации плазмиды рKS1; *mob* – сайт, обеспечивающий конъюгационный перенос вектора путем мобилизации; *Ery^R* – ген, определяющий устойчивость к эритромицину; *Km^R* – ген, определяющий устойчивость к канамицину; *BseYI*, *PspFI*, *XmaI*, *SmaI*, *SpeI*, *NotI*, *SacII*, *BstXI*, *BstZ17I* и *HindIII*, *SbfI*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *AatII*, *ZraI*, *SalI* – уникальные сайты рестрикции.

formis FD9 с целью последующей инактивации данной детерминанты.

Ген *codY* был изолирован с использованием техники перекрывающейся ПЦР, с последующим встраиванием в его состав гена канамицинрезистентности. Фрагмент гена *codY*, маркированный геном канамицинрезистентности был встроен в вектор рKS1mob (рис. 3). Следует отметить, что все манипуляции осуществляли с использованием бактерий *E. coli*, что являлось наиболее оптимальным при создании генно-инженерных конструкций.

Полученной гибридной плазмидой трансформировали коллекционные бактерии *B. subtilis* 168, содержащие плазмиду рBS72 с нарушенным геном *rok*. Полученный донорный штамм скрещивали с бактериями *B. licheniformis* FD9. В результате конъюгационных скрещиваний трансконъюганты бактерий *B. licheniformis* были отобраны с частотой 7.9×10^{-5} (в пересчете на количество клеток донора) на минимальной среде с добавлением канами-

Таблица 1. Частота конъюгационного переноса вектора pKS1mob в клетки бактерий рода *Bacillus*

Реципиент	Время скрещивания, ч	Частота конъюгационного переноса вектора pKS1mob
<i>B. subtilis</i> d16	3	1.51×10^{-4}
	24	1.63×10^{-4}
<i>B. licheniformis</i> FD9	3	1.11×10^{-6}
	24	2.71×10^{-6}
<i>B. velezensis</i> 713A	3	1.80×10^{-6}
	24	2.93×10^{-8}

Примечание: приведены частоты переноса относительно количества клеток донора.

цина в концентрации 50 мкг/мл. Было установлено, что отобранные трансконъюганты при выращивании в неселективных условиях стабильно наследовали маркер канамицинрезистентности и не содержали устойчивости к эритромицину (ген локализовался в плазмиде pKS1mob). Это свидетельствовало в пользу того, что в результате гомологичной рекомбинации произошла замены гена *codY* дикого типа на его фрагмент, содержащий ген канамицинрезистентности. Отсутствие в хромосоме плазмидного репликона дополнительно подтверждено с использованием ПЦР-анализа.

Сравнительный анализ антифунгальной активности исходного и мутантного штаммов *B. licheniformis* FD9 показал, что нарушение в гене *codY* не влияло на его способность подавлять развитие гриба *Botrytis cinerea*, полностью название рода (табл. 2). В то же время относительно фитопатогенных грибов *Fusarium culmorum* полностью и *Alternaria radicina* полностью уровни антимикробной активности бактерий дикого типа и мутанта отличались и зависели от времени их культивирования. При этом наиболее высокие значения активностей, определяемые по размеру зоны задержки роста гриба, наблюдались для мутантного штамма (различия статистически достоверны, $p < 0.001$).

Таким образом, в результате выполнения исследования создана конъюгационная система доставки векторов для молекулярного клонирования в клетки бактерий рода *Bacillus*. Для этого отобран мутантный вариант плазмиды pBS72 с нарушенным геном *rok*, не препятствующий введению векторов методом трансформации в содержащие его клетки и сохраняющий на уровне дикого типа конъюгационные свойства. Сконструирован вектор, содержащий *mobV*-сайт (pKS1mob), обес-

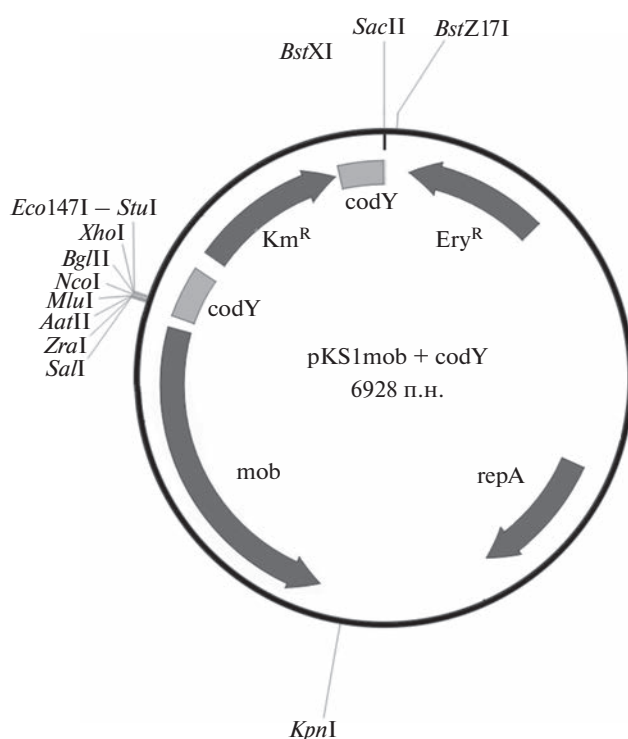


Рис. 3. Схема организации вектора pKS1mob с клонированными фрагментами гена *codY*: *rep* – ген, кодирующий термочувствительный белок инициации репликации плазмиды pKS1; *mob* – сайт, обеспечивающий конъюгационный перенос вектора путем мобилизации; *Ery^R* – ген, определяющий устойчивость к эритромицину; *Km^R* – ген, определяющий устойчивость к канамицину; *codY* – фрагменты гена *codY* бактерий *B. licheniformis* FD9; *SacII*, *BstZ17I*, *StuI*, *XhoI*, *BglII*, *NcoI*, *MluI*, *ZraI*, *AatII*, *SalI* – уникальные сайты рестрикции.

печивающий его конъюгационный перенос плазмидой pBS72 в клетки природный бактерий рода *Bacillus*. Способность вектора pKS1mob копироваться в клетках *E. coli* и наличие двух полилинкеров вокруг гена канамицинрезистентности позволяет клонировать в него фрагменты анализируемых генов с использованием традиционных генно-инженерных подходов. Присутствие в векторе pKS1mob термочувствительной системы репликации позволяет направленно инактивировать исследуемые гены для последующего функционального анализа. Преимущество созданной системы состоит в том, что для введения векторов существенно сокращаются материальные и временные затраты. Искомые мутантные варианты можно отобрать на минимальной агаризованной среде с канамицином при 37°C (отсутствие триптофана является контрселектирующим маркером) через 3 ч после скрещивания в жидкой полноценной среде при 30°C донорных и реципиентных бактерий рода *Bacillus*. При этом в качестве доно-

Таблица 2. Антимикробная активность исходного и мутантного штаммов *B. licheniformis* FD9

Патоген	Зона задержки роста гриба бактериями, мм			
	дикий тип <i>B. licheniformis</i> FD9		мутант <i>B. licheniformis</i> FD9*	
	время культивирования бактерий, ч			
	24	48	24	48
<i>F. culmorum</i>	21.2 ± 3.0	14.4 ± 4.0	12.8 ± 4.0	32.0 ± 2.0
<i>B. cinerea</i>	25.6 ± 4.0	29.5 ± 4.0	27.2 ± 4.0	29.6 ± 4.0
<i>A. radicina</i>	17.8 ± 2.0	27.2 ± 3.0	38.6 ± 3.0	15.1 ± 3.0

*Бактерии *B. licheniformis* FD9 с инактивированным геном *codY*.

ров необходимо использовать бактерии *B. subtilis* 168, содержащие конъюгативную плазмиду pBS72 с нарушенным геном *rok* и мобилизуемый вектор с фрагментами анализируемого гена.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований “Биотехнологии-2” (задание 3.6.2) и гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (№ Б21-142).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит материалов каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Harwood C.R., Mouillon J.M., Pohl S., Arnau J. // FEMS Microbiol. Rev. 2018. V. 42. P. 721–738. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy028>
2. Burton A.T., Kearns D.B. // J. Bacteriol. 2020. V. 202. № 18. P. e00290-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00290-20>
3. Singh P.K., Ramachandran G., Duran-Alcalde L., Alonso C., Wu L.J., Meijer W.J. // Environ. Microbiol. 2012. V. 14. № 10. P. 2812–2825. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02819x>
4. Jeong D.E., Kim M.S., Kim H.R., Choi S.K. // Front. Microbiol. 2022. V. 13. P. 802040. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.802040>
5. Brophy J.A.N., Triassi A.J., Adams B.L. // Nat. Microbiol. 2018. V. 3. P. 1043–1053. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0216-5>
6. Gurinovich A.S., Titok M.A. // Microbiology. 2022. V. 91. № 4. P. 395–408. <https://doi.org/10.1134/S002626172230018X>
7. Titok M.A., Chapuis J., Selezneva Y.V., Lagodich A.V., Prokulevich V.A., Ehrlich S.D., Jannière L. // Plasmid. 2003. V. 49. № 1. P. 53–62. [https://doi.org/10.1016/s0147-619x\(02\)00109-9](https://doi.org/10.1016/s0147-619x(02)00109-9)
8. Gurinovich A.S., Titok M.A. // Microbiology. 2020. V. 89. № 6. P. 660–669. <https://doi.org/10.1134/S0026261720060065>
9. Shatalin K.Y., Neyfakh A.A. // FEMS Microbiology Letters. 2005. V. 245. № 2. P. 315–319. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.03.029>
10. Harwood C.R., Cutting S.M. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. / Ed. C.R. Harwood and S.M. Cutting Chichester, New York: Wiley, 1990. 581 p.
11. Anagnostopoulos C., Spizizen J. // J. Bacteriol. 1961. V. 81. № 5. P. 741–746. <https://doi.org/10.1128/jb.81.5.741-746.1961>
12. te Riele H., Michel B., Ehrlich S.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 2541–2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2541>
13. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Ed. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 468 p.
14. Poluektova E.U., Fedorina E.A., Lotareva O.V., Prozorov A.A. // Plasmid. 2004. V. 52. P. 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.07.001>
15. Fujita Y, Satomura T, Tojo S, Hirooka K. // J. Bacteriol. 2014. V. 196. P. 3793–3806. <https://doi.org/10.1128/JB.02055-14>
16. Hoa T.T., Tortosa P., Albano M., Dubnau D. // Mol. Microbiol. 2002. V. 43. № 1. P. 15–26. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02727.x>
17. Smits W.K., Grossman A.D. // PLoS Genet. 2010. V. 11. № 6. P. e1001207. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001207>

Conjugation Vector Delivery System for Molecular Cloning into Cells of Bacteria of The Genus *Bacillus*

A. S. Gurinovich^a, I. A. Fedyushko^a, and M. A. Titok^a, *

^a Department of Microbiology, Biological Faculty, Belarusian State University, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: ma_titok@bsu.by

A delivery system for vectors for molecular cloning into bacterial cells of the genus *Bacillus* has been developed. A specific feature of the developed system is the use of the pBS72 plasmid, which provides the conjugative transfer of the conditionally lethal vector pKS1mob obtained into the cells of the studied bacteria. The ability of vector pKS1mob to replicate in *Escherichia coli* and *B. subtilis* cells at a low temperature (30°C), the presence of two polylinkers around the kanamycin resistance gene makes it possible to clone target gene fragments into its composition using traditional genetic engineering approaches. Inactivation of the *rok* gene in the pBS72 plasmid made it possible to transform the strain containing it with the constructed vector pKS1mob with high efficiency. Crossing the donor strain *B. subtilis* 168, containing conjugative pBS72 and pKS1mob mobilizable plasmids, with a recipient strain of the genus *Bacillus* made it possible to introduce the pKS1mob plasmid into it. The possibility of using the created system for inactivation of gene *codY* of bacteria *Bacillus licheniformis* was shown.

Keywords: *B. subtilis*, pBS72 plasmid, Rok protein, vector pKS1mob, conjugation transfer, competence

УДК 579.69

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ГРУППЫ *Bacillus cereus* COMPLEX, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЕЧНОЙ МЕРЗЛОТЫ В ЯКУТИИ, ДЛЯ ОЦЕНКИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ПРИ ИЗМЕНЕНИИ КЛИМАТА

© 2023 г. Ю. О. Гончарова¹ *, В. В. Евсеева¹, Р. И. Миронова¹, К. В. Хлопова¹, А. Г. Богун¹, А. А. Сизова¹, В. И. Соломенцев¹, Г. М. Титарева¹, И. В. Бахтеева¹, Т. Б. Кравченко¹, А. В. Брушков^{2,3}, В. С. Тимофеев¹, С. Г. Игнатов^{1,2} **,

¹ Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Московская область, Серпухов, р.п. Оболенск, 142279 Россия

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

³ Тюменский государственный университет, Тюмень, 625003 Россия

*e-mail: iulia.belay@yandex.ru;

**e-mail: ignatov@obolensk.org

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Из проб почвы в регионе вечной мерзлоты (Якутия, Россия) выделены штаммы рода *Bacillus* и дана их фенотипическая характеристика. Анализ полученных данных позволил отнести их к группе *Bacillus cereus* complex. ПЦР-анализ позволил определить профиль генов синтеза токсинов *B. cereus* в геномах исследуемых штаммов. Получена генетическая характеристика путем RAPD-генотипирования и с использованием MLVA-локусов, применяемых для генотипирования возбудителя сибирской язвы. Результаты генотипирования разного уровня разрешения позволили дифференцировать исследуемые штаммы от вида *B. anthracis*, показать их внутривидовые генетические различия и степень родства. Осуществлено полногеномное секвенирование, на основе данных которого проведено MLST-генотипирование, которое выявило 2 известных сиквенс-типа и один новый, впервые описанный в настоящей работе. Полученные результаты имеют прикладное значение и крайне интересны с точки зрения эволюции и филогеографии группы *B. cereus* complex, поскольку факт выделения штаммов из вечной мерзлоты дает основания предположить, что их возраст может быть гораздо выше предполагаемого.

Ключевые слова: *Bacillus cereus* complex, *Bacillus anthracis*, токсины, генотипирование, MLVA, MLST, RAPD, вечная мерзлота

DOI: 10.31857/S0555109923060053, **EDN:** CVASHJ

Сценарии изменения климата прогнозируют повышение среднегодовой температуры воздуха во всем мире. Такие климатические изменения могут иметь важные последствия: возникновение микробиологических рисков, связанных с высвобождением патогенов из вечной мерзлоты. Особенно резкие климатические изменения наблюдаются в Арктическом регионе России, на который приходится более половины всей арктической территории и населения [1]. Для прогнозирования биологических рисков, связанных с потеплением, необходимо выделение и характеристика потенциальных патогенов из мерзлотных в настоящее время областей. Спорообразующие бактерии группы *Bacillus cereus* complex представляют собой интересную модель для изучения воздействия изменения климата на патогены [2].

Группа *Bacillus cereus* complex образована 9 близкородственными видами, для которых характерна высокая степень генетического сходства, что создает проблему определения вида при исследовании выявленных штаммов рода *Bacillus* [3]. Эта проблема усугубляется наличием в группе опасных патогенов, таких как *B. cereus*, который вызывает пищевые токсикоинфекции человека [4], и *B. anthracis*, который относится ко II группе патогенности и является возбудителем сибирской язвы — карантинной инфекции травоядных животных и человека [5]. При выделении нового штамма рода *Bacillus* из того или иного источника, актуально в максимально сжатые сроки определить его вид, а также получить фенотипическую характеристику и оценить патогенный потенциал.

Основными широко используемыми приемами, которыми осуществляют фенотипическую харак-

теристику штаммов бацилл являются: определение подвижности, лецитиназной, фосфатазной и гемолитической активностей, а также чувствительности к диагностическим бактериофагам. Эти подходы также позволяют определить вид исследуемого штамма и дифференцировать его от вида *B. anthracis* [6].

Для более полноценной и точной характеристики применяют методы типирования, такие как хромосомный рестрикционный анализ ДНК, плазмидное типирование, риботипирование и импульсно-полевой гель-электрофорез (PFGE – pulsed-field gel electrophoresis) [7]. Используются также методы генотипирования, основанные на ПЦР, например, случайная амплификация полиморфной ДНК (RAPD – randomly amplified polymorphic DNA), которая позволяет дифференцировать анализируемые штаммы на основе сравнения размера и числа продуктов амплификации с использованием нескольких ПЦР-праймеров [8, 9]. Широко используется метод полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (AFLP – amplified fragment length polymorphism) [10, 11] и мультилокусный электрофорез ферментов (MEE – multilocus enzyme electrophoresis) [12]. Мультилокусное сиквентс-типирование (MLST – Multilocus Sequence Typing), основанное на анализе нуклеотидных последовательностей нескольких локусов генов домашнего хозяйства, позволяет отнести штамм к тому или иному сиквентс-типу (ST), который характерен для одного из видов группы *B. cereus* complex [13, 14]. Для возбудителя сибирской язвы разработан подход мультилокусного анализа вариативных нуклеотидных тандемных повторов (MLVA – multiple locus VNTR analysis), который рекомендуется использовать в качестве генетического анализа первой линии [15, 16]. Эти методы позволяют не только определить видовую принадлежность штамма, но и дифференцировать штаммы одного вида между собой с разной степенью разрешения.

Безусловно, при отнесении штамма к виду *B. cereus*, важно охарактеризовать его возможные патогенные свойства. Одними из факторов патогенности *B. cereus* являются токсины. Термостабильный токсин цереулид опосредует рвотный синдром при пищевом отравлении, вызванном *B. cereus*. Синтез данного токсина осуществляет белковый комплекс, компоненты которого кодируют несколько генов [17, 18]. Диарейный синдром вызывают энтеротоксины, такие как: негемолитический энтеротоксин (Nhe), гемолизин BL (Hbl), цитотоксин K (CytK) и энтеротоксин FM (EntFM) [19]. Эти токсины выявляются с помощью иммуноферментного анализа, ПЦР [17, 20–22] и масс-спектрометрии MALDI-TOF [23]. Путем ПЦР-амплификации в геномах анализируемых штаммов можно обнаружить гены перечисленных токсинов и выдвинуть предположение об их патогенности [21].

В Якутии (Россия) из проб почвы, находящейся в вечной мерзлоте, отобранных на месте находки мумий пещерных львят, были выделены и всесторонне изучены 3 штамма возбудителя сибирской язвы, описанных нами ранее [16]. Помимо них, из тех же самых проб были выделены другие 26 штаммов рода *Bacillus*, 10 из которых отнесены к группе *B. cereus* complex и исследованы в настоящей работе.

Цель работы – получение фенотипической и генетической характеристики 10 выделенных из вечной мерзлоты штаммов группы *B. cereus* complex для оценки микробиологических рисков, поскольку виды этой группы генетически близки к виду *B. anthracis*.

МЕТОДИКА

Штаммы микроорганизмов. В работе исследованы 10 штаммов группы *B. cereus* complex: YakM1, YakM2, YakM3, YakM4, YakM7, YakM8, YakM9, YakM10, YakM11-2 и YakM15. Все штаммы были выделены в 2016 г. из образцов почвы, находящейся в вечной мерзлоте.

Определение культуральных и морфологических характеристик. Культуры штаммов рассевали до получения единичных колоний и выращивали на плотной питательной среде ГРМ-агар (панкреатический гидролизат рыбной муки, ГНЦ ПМБ, Россия) при температуре 37°C в течение 18–24 ч. Морфологию колоний оценивали по микроскопии с использованием микроскопа “AxioStar” (“K. Zeiss”, Германия, окуляр – 10×, объектив – 40×).

Подвижность, фосфатазную и лецитиназную активности, а также чувствительность к бактериофагам определяли согласно Маринину [6].

Подвижность микробных клеток определяли методом микроскопического исследования в раздавленной капле.

Фосфатазную активность выявляли при выращивании культур на плотной питательной среде агар Хоттингера (ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 0.001% фенолфталеинфосфата натрия в течение 24 ч. при 36°C. После этого в крышку чашки Петри помещали фильтровальную бумагу и наливали 1–2 мл 23%-ного водного раствора аммиака. Под действием паров аммиака колонии, продуцирующие щелочную фосфатазу, окрашивались в розовый цвет.

Лецитиназную активность определяли путем выращивания культур на плотной яично-желточной среде, которую готовили путем добавления желтка куриного яйца в агар Хоттингера. Учет проводили через 12, 24 и 48 ч. культивирования при 36°C по ореолу преципитации.

Гемолитическую активность проверяли, выращивая культуры штаммов на агаризованной сре-

Таблица 1. Праймеры для проведения RAPD-генотипирования

Праймер	Последовательность 5' → 3'
Primer A	ATCAGCGCACCA
Primer B	GCCAGCTGTACG
Primer C	TGCCTCGCACCA
Primer D	GCCCCGTTAGCA
Primer E	CCGCAGTTAGAT
Primer F	ACTGGCCGAGGG
Primer G	TTCGGACGAATA
Primer H	AGAATTGGACGA

де, содержащей 5% дефибринированной крови. Высевы выдерживали 18–20 ч при 36°C, после чего учитывали результаты.

Определение чувствительности микробной культуры к бактериофагам осуществляли следующим образом: на агаризованную среду высевали по 0.2 мл 18-часовой бульонной культуры, в центр подсохшего газона наносили препарат бактериофага, содержащий 1×10^6 БОЕ/см³, результаты учитывали через 18–24 ч.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение ДНК исследуемых штаммов осуществляли с помощью набора “Genomic DNA Purification Kit” (“Thermo Fisher Scientific”, США). Обеззараживание материала осуществляли в соответствии с МУ 1.3.2569-2009.

Полногеномное секвенирование. Библиотеки были подготовлены с помощью набора “Nextera DNA Library Preparation Kit” (“Illumina”, США). Полногеномное секвенирование осуществляли с использованием прибора “MiSeq” (“Illumina”,

США) и соответствующего набора реагентов “Miseq Reagent Kit v3” (“Illumina”, США).

RAPD-генотипирование и ПЦР-индикация наличия в геноме штамма группы *B. cereus* генов энтеротоксинов. RAPD-генотипирование осуществляли, как описано в работе Инатсу с соавт. [24], с использованием праймеров, представленных в работе Кувана с соавт. [25] (табл. 1).

Наличие в геномах штаммов генов синтеза токсинов (*cytK*, *hblC*, *entFM*, *nheA*, *ces*, *CER*) определяли методом ПЦР-детекции с использованием праймеров, предложенных в работе Ким с соавт. [21] (табл. 2).

Реакции амплификации проводили с использованием термоциклера “T100 thermal cycler” (“Bio-Rad”, США) и набора реагентов и “5X реакционная смесь qPCRmix-HS” (“Евроген”, Россия) согласно инструкциям производителей. В качестве источника матрицы добавляли раствор ДНК исследуемых штаммов (5–20 нг ДНК на реакцию). Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 1.0–1.2%-ном агарозном геле (“Sigma-Aldrich”, США) в 1 × Трис-ацетатном электродном буфере (ТАЕ). Размер фрагмента определяли по маркеру молекулярных масс “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США).

MLVA-генотипирование. MLVA-генотипирование осуществляли согласно протоколу, описанному в работе [26], по 17 MLVA-маркерам [15, 26–29]: *vrrA*, *bams03*, *bams05*, *bams22*, *bams34*, *bams44*, *VNTR23*, *vrrC2*, *bams01*, *bams21*, *bams23*, *bams24*, *bams25*, *bams28*, *bams51*, *vrrB1*, *vrrB2*, используемым для MLVA-генотипирования *B. anthracis*. Генотипирование штамма включало 17 ПЦР-реакций. Праймеры представлены в табл. 3.

Таблица 2. Праймеры для ПЦР-индикации наличия в геноме штамма группы *B. cereus* complex генов энтеротоксинов

Энтеротоксин <i>B. cereus</i>	Ген-мишень	Последовательность 5'→3'	Размер ПЦР-продукта, п.о.
Цитотоксин К	<i>cytK</i>	TGCTAGTAGTGCTGTAACCTC	881
		CGTTGTTTCCAACCCAGT	
Негемолитический энтеротоксин А	<i>nheA</i>	GGAGGGGGCAAACAGAAGTGAA	750
		CGAAGAGCTGCTTCTCTCGT	
Гемолизин BL	<i>hblC</i>	CGCAACGACAAATCAATGAA	421
		ATTGCTTCACGAGCTGCTTT	
Цереулид	<i>ces</i>	TTCCGCTCTCAATAAATGGG	634
		TCACAGCACATTCCAAATGC	
	<i>CER</i>	GCGTACCAAATCACCCGTTT	546
		TGCAGGTGGCACACTTGTTA	
Энтеротоксин FM	<i>entFM</i>	AGGCCAGCTACATACAACG	327
		CCACTGCAGTCAAAACCAGC	

Таблица 3. Праймеры для MLVA-генотипирования

Локус	Наименование праймера	Последовательность 5'→3'
vrrA	vrrA-F	CACAAC TACCACCGATGGCACA
	vrrA-R	GCGCGTTTCGTTTGATTCATAC
vrrB1	vrrB1-F	ATAGGTGGT TTTCCGCAAGTTATTC
	vrrB1-R	GATGAGTTTGATAAAGAATAGCCTGTG
vrrB2	vrrB2-F	CACAGGCTATTCTTTATCAAAC TCA TC
	vrrB2-R	CCCAAGGTGAAGATTGTTGTTGA
vrrC2	vrrC2-F	CCAGAAGAAGTGGAACCTGTAGCAC
	vrrC2-R	GTCTTTCCATTAATCGCGCTCTATC
bams01	bams01-F	GTTGAGCATGAGAGGTACCTTGTCCTTTT
	bams01-R	AGTTCAAGCGCCAGAAGGTTATGAGTTATC
bams03	bams03-F	GCAGCAACAGAAAAC TCTCTCCAATAACA
	bams03-R	TCCTCCCTGAGAACTGCTATCACCTTTAAC
bams05	bams05-F	GCAGGAAGAACA AAAAGAACTAGAAAGAGCA
	bams05-R	ATTATTAGCAGGGG CCTCTCCTGCATTACC
bams21	bams21-F	TGTAGTGCCAGATTTGTCTTCTGTA
	bams21-R	CAAATTTTGAGATGGGAGTTTACT
bams22	bams22-F	ATCAAAAAT TCTTGGCAGACTGA
	bams22-R	ACCGTTAATTCACGTTTAGCAGA
bams23	bams23-F	CGGTCTGTCTCTATTATTCAGTGGT
	bams23-R	CCTGTTGCTCCTAGTGATTTCTTAC
bams24	bams24-F	CTTCTACTTCCGTACTTGAAATTGG
	bams24-R	CGTCACGTACCATTTAATGTTGTTA
bams25	bams25-F	CCGAATACGTAAGAAATAAATCCAC
	bams25-R	TGAAAGATCTTGAAAAACAAGCATT
bams28	bams28-F	CTCTGTTGTAACAAAATTTCCGTCT
	bams28-R	TATTAAACCAGGCGTTACTTACAGC
bams34	bams34-F	CAGCAAAATCAATCGAATCAAA
	bams34-R	TGTGCTAAATCATCTTGCTTGG
bams44	bams44-F	GCGAATTAATTGCTCCTCAAAT
	bams44-R	GCACTTGAATATTTGGCGGTAT
bams51	bams51-F	ATTTCTCTGAGCAGGTTGTGTT
	bams51-R	TGCATCTAACAATGCAGAACAA
VNTR23	VNTR23-F	TTTAGAAACGTTATCACGCTTA
	VNTR23-R	GTAATACGTATGGTTCATTCCC

Продукты амплификации разделяли методом электрофореза в 2–3%-ном агарозном геле и 0.5× Трис-боратном электродном буфере (ТБЕ). Размер фрагмента определяли по маркерам молекулярных масс “GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder” (“Thermo Fisher Scientific”, США) и “EZ Load 20 bp

Molecular Ruler” (“Bio-Rad”, США) с использованием программы “PhotoCampMw 99.04” (“VilberLourmat”, Франция). В качестве референсного штамма для сравнения длин фрагментов использовали *B. anthracis* Pasteur II (“ГКПМ-Оболensk”, Россия). Полученные размеры ампликонов пере-

Таблица 4. Фенотипическая характеристика штаммов

Штамм	Подвижность	Лейцитиназная активность	Фосфатазная активность	Гемолитическая активность	Гамма А-26	В-Fah
YakM1	+	+	+	+	—	—
YakM2	+	+	+	+	—	—
YakM3	+	+	+	+	—	—
YakM4	+	+	+	—	—	—
YakM7	+	+	+	+	+	—
YakM8	+	+	+	+	—	—
YakM9	+	+	+	+	—	—
YakM10	+	+	+	+	+	—
YakM11-2	+	+	+	+	—	—
YakM15	+	+	+	+	+	—

Примечание: + — признак выражен; — признак не выражен.

водили в количество tandemных повторов для данного локуса, как описано в работе [29]. В результате получали MLVA-профили штаммов.

MLST-генотипирование. Для MLST-генотипирования использовали схему, описанную в работе Прист с соавт. в 2004 г. [14]. Для исследуемой выборки получены сборки и определены нуклеотидные последовательности следующих локусов: *glpF*, *gmk*, *ilvD*, *pta*, *pur*, *pycA*, *tpi*. Полученным последовательностям присваивали номера аллелей, а на основе комбинации номеров аллелей определяли ST штаммов в соответствии с сервисом базы данных PubMLST (<https://pubmlst.org/bcereus/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Культуральная и морфологическая характеристика штаммов. На первом этапе у исследуемых штаммов был определен ряд диагностически важных фенотипических признаков: морфология колоний, подвижность, лецитиназная, фосфатазная и гемолитическая активности, чувствительность к диагностическим сибиреязвенным бактериофагам Гамма А-26 и В-Fah (ВНИИВВиМ). Результаты представлены в табл. 4. Каждый штамм имел мономорфные колонии, однако между собой штаммы морфологически различались. Полученные результаты в совокупности позволили отнести все исследуемые штаммы к группе *B. cereus* complex и дифференцировать их от вида *B. anthracis*. Однако, интересно отметить, что штамм YakM4 не обладал гемолитической активностью, характерной для данного вида, а штаммы YakM7, YakM10 и YakM15 оказались чувствительны к сибиреязвенному бактериофагу Гамма А-26. Это позволило сделать предположение о тесной связи перечисленных штаммов с *B. anthracis*, поскольку ранее уже были описаны подобные случаи негемолитичных и чувствительных к гамма-фагу штаммов *B. cereus*, близкородственных возбудителю сибирской язвы [30, 31].

Определение профиля энтеротоксинов. Штаммы *B. cereus* способны вызывать серьезные пищевые токсикоинфекции, поэтому одним из важных аспектов при исследовании вновь выделенного штамма является определение профиля энтеротоксинов, как основных факторов патогенности данного вида микроорганизмов. Одним из способов решения этой задачи является ПЦР-индикация генов, кодирующих соответствующие токсины в геноме штамма [17, 21]. Нами были использованы праймеры, предложенные в работе [21] для ПЦР-индикации 6 генов синтеза токсинов — цитотоксина К (*cytK*), негемолитического энтеротоксина А (*nheA*), гемолизина BL (*hblC*), энтеротоксина FM (*entFM*) и рвотного токсина цереулида (*ces* и *CER*). Перечисленные токсины синтезируются штаммами *B. cereus*, вызывающими пищевые токсикоинфекции с диарейной или рвотной симптоматикой [20]. Полученные результаты приведены в табл. 5.

Как видно из табл. 5, только штаммы YakM1, YakM2 и YakM4 несут в геноме ген *hblC* и лишены гена *entFM*, ген *nheA* выявлен у всех штаммов исследуемой выборки и ни у одного из штаммов не выявлено положительной реакции на гены *cytK*, *CER* и *ces*. Однако, согласно результатам полногеномного секвенирования, ген *cytK* обнаружен у YakM9 и YakM11-2, ген *hblC* выявлен в геномах YakM1, YakM2, YakM3, YakM7, YakM10 и YakM15, *entFM* обнаружен у YakM1 и YakM15, *nheA* выявлен у всех штаммов, за исключением YakM4. Расхождение результатов ПЦР и секвенирования может быть обусловлено отсутствием референсного штамма и, соответственно, генома, для вида *B. cereus* и группы *B. cereus* complex, а также выраженным полиморфизмом перечисленных генов.

Эти результаты интересны с учетом факта выделения штаммов из вечной мерзлоты. Поскольку функция токсинов, как факторов патогенности, заключается в поражении желудочно-кишечного тракта хозяина, интересно предположить, в отношении каких видов-хозяев данные токсины могли

Таблица 5. Профиль генов синтеза токсинов штаммов группы *B. cereus* complex

Штамм	Детектируемый ген					
	<i>cytK</i>	<i>hblC</i>	<i>entFM</i>	<i>nheA</i>	<i>ces</i>	<i>CER</i>
YakM1	—	+	—	+	—	—
YakM2	—	+	—	+	—	—
YakM3	—	—	+	+	—	—
YakM4	—	+	—	+	—	—
YakM7	—	—	+	+	—	—
YakM8	—	—	+	+	—	—
YakM9	—	—	+	+	—	—
YakM10	—	—	+	+	—	—
YakM11-2	—	—	+	+	—	—
YakM15	—	—	+	+	—	—

использоваться при условии экспрессии генов, наличие которых выявлено в геномах.

Помимо фенотипических характеристик, которые, в свою очередь, определили спектр следующих подходов, примененных для изучения данных штаммов, возникла необходимость также охарактеризовать штаммы с генетической точки зрения.

RAPD-генотипирование. RAPD-генотипирование является одним из наиболее простых методов генотипирования штаммов рода *Bacillus* [8, 9, 24, 32], позволяет получить генетическую характеристику штамма за несколько часов и не требует использования данных секвенирования, что крайне важно с финансовой точки зрения, поэтому оно было проведено в первую очередь. Этот подход позволил определить, являются ли штаммы, име-

ющие одинаковую фенотипическую характеристику, идентичными на уровне генома.

RAPD-генотипирование показало, что все исследуемые изоляты имеют различия. Однако наиболее схожий RAPD-профиль выявлен у штаммов: YakM8, YakM9 и YakM11-2, а также YakM10 и YakM15. Примеры результатов RAPD-генотипирования представлены на рис. 1 и 2.

Эти результаты позволили сделать предварительный вывод о том, что штаммы, взятые из одной географической точки, имеют генетические различия, что вызвало интерес к проведению более глубоких генетических исследований.

Применение MLVA-локусов *B. anthracis* в отношении других видов группы *B. cereus* complex. Поскольку *B. anthracis* и другие виды группы *B. cereus* complex являются крайне близкородственными на генетическом уровне, было выдвинуто предположение о возможности применения хромосомных VNTR-локусов *B. anthracis* для MLVA-генотипирования и дифференцирования других штаммов данной группы. В ряде работ была показана возможность не только применения этого высокоразрешающего метода для генетической характеристики штаммов *B. anthracis*, но и возможность его использования для дифференцирования *B. anthracis* от других видов рода *Bacillus*, поскольку по ряду VNTR-локусов возможна амплификация продуктов, размер которых значительно отличается от типичных для *B. anthracis* [15, 31, 33]. Мы предположили, что в случае успешного использования данного подхода, возможно выявление наиболее близких с филогенетической точки зрения штаммов к виду *B. anthracis*, как, например *B. cereus* bv. *anthracis*, который известен способностью вызывать

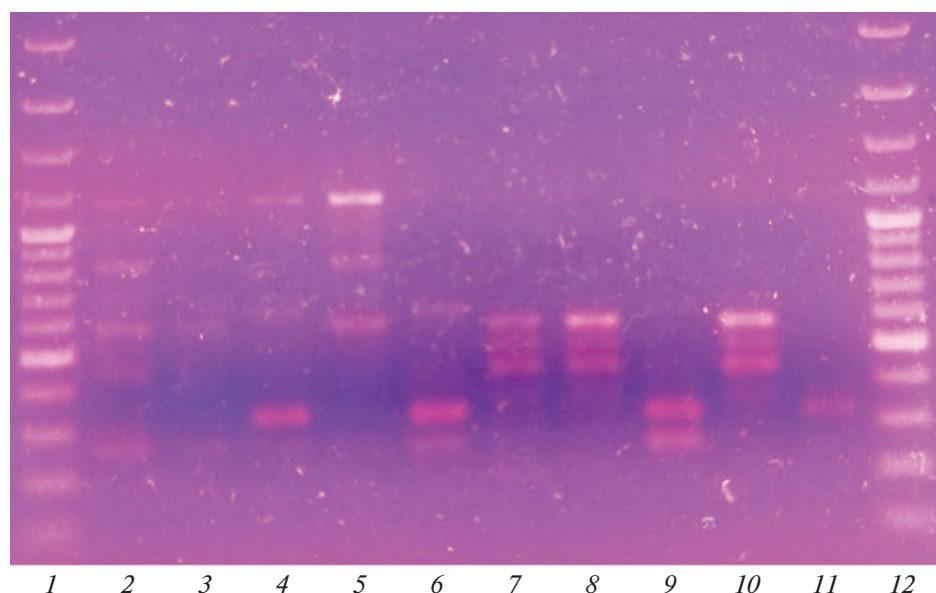


Рис. 1. RAPD-генотипирование с использованием праймера Primer A: 1, 12 – маркер молекулярных масс “GeneRuler 100 bp DNA Ladder”; продукты амплификации штаммов: 2 – YakM1, 3 – YakM2, 4 – YakM3, 5 – YakM4, 6 – YakM7, 7 – YakM8, 8 – YakM9, 9 – YakM10, 10 – YakM11-2, 11 – YakM15.

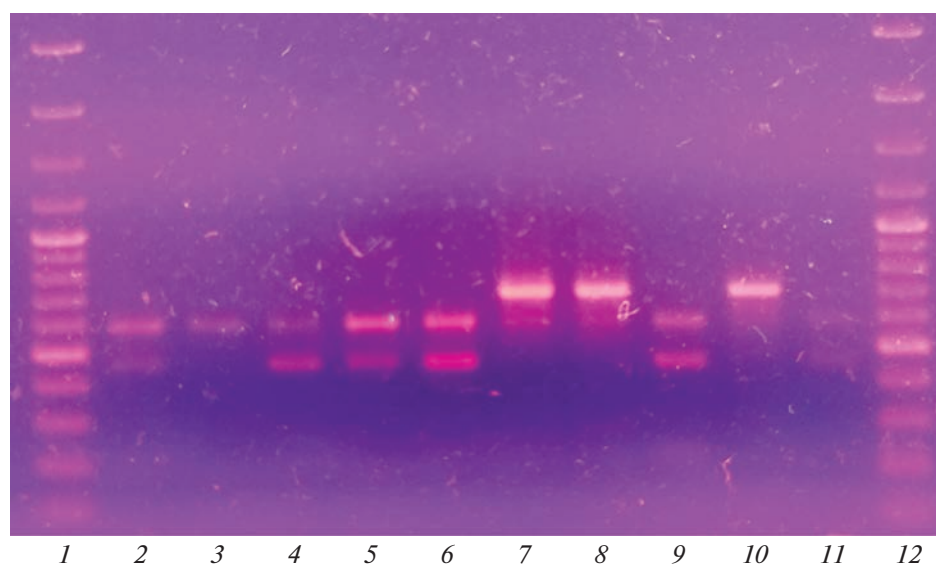


Рис. 2. RAPD-генотипирование с использованием праймера Primer B: 1, 12 – маркер молекулярных масс “GeneRuler 100 bp DNA Ladder”; продукты амплификации штаммов: 2 – YakM1, 3 – YakM2, 4 – YakM3, 5 – YakM4, 6 – YakM7, 7 – YakM8, 8 – YakM9, 9 – YakM10, 10 – YakM11-2, 11 – YakM15.

схожее с сибирской язвой заболевание у приматов [34]. Поэтому, мы применили предложенные рядом авторов праймеры для MLVA-генотипирования *B. anthracis* [15, 26–29] при генотипировании исследуемых в данной работе штаммов. Результаты приведены в табл. 6.

Таким образом, осуществлен MLVA-анализ исследуемой выборки с использованием 17 VNTR-локусов. Обнаружено, что несмотря на то, что используемые праймеры сконструированы для *B. anthracis*, по ряду локусов у исследуемых изолятов проходила амплификация. Однако часть локусов (bams01, bams22, bams23, bams34, vrrC2) оказалась неприменима из-за отсутствия продукта амплификации или его неспецифичного накопления, при котором размер составил более

900 п.н., в связи с чем невозможно определить его точный размер по результатам электрофореза в агарозном геле. Тем не менее, одинаковый MLVA-профиль выявлен у штаммов YakM1, YakM2 и YakM4, YakM8, YakM9 и YakM11-2, а также YakM7 и YakM10. Близкий, хоть и не одинаковый, MLVA-профиль характерен для штаммов YakM3, YakM15 и YakM7, YakM10. Данные результаты частично согласуются с результатами RAPD-генотипирования, однако MLVA может иметь более низкое разрешение и основано на полиморфизме других локусов. Это говорит в пользу необходимости комплексного подхода генотипирования при исследовании таких мономорфных групп как *B. cereus* complex. Однако, поскольку данный метод является одним из наиболее высокоразрешаю-

Таблица 6. MLVA-профили штаммов

Штамм	VNTR-локус											
	vrrA	bams03	bams05	bams44	VNTR23	bams21	bams24	bams25	bams28	bams51	vrrB1	vrrB2
YakM1	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM2	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM3	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	7	26	15
YakM4	5	НЛ	НЛ	7	10	НЛ	10	14	16	7	НЛ	13
YakM7	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	НЛ	26	НЛ
YakM8	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM9	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM10	8	НЛ	6	4	2	9	7	11	15	НЛ	26	НЛ
YakM11-2	7	33	6	8	2	НЛ	10.5	НЛ	16	9	23	13
YakM15	8	—*	6	4	2	9	7	11	14	НЛ	26	3

Примечание: цифрами обозначено число нуклеотидных повторов в VNTR-локусах; * – размер фрагмента слишком большой для определения по результатам электрофореза в агарозном геле; НЛ – нет локуса (локус не амплифицируется).

Таблица 7. MLST-генотипирование штаммов группы *B. cereus* complex

Штамм	Аллельный профиль							MLST-ST
	<i>glpF</i>	<i>gmk</i>	<i>ilvD</i>	<i>pta</i>	<i>pur</i>	<i>pycA</i>	<i>tpi</i>	
YakM1	8	10	79	36	56	22	11	—*
YakM2	8	10	79	36	56	22	11	—
YakM3	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM4	8	10	79	36	56	22	11	—
YakM7	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM8	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM9	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM10	86	57	81	80	80	90	32	217
YakM11-2	5	4	3	4	15	6	16	32
YakM15	86	57	81	80	80	90	32	217

Примечание: цифрами обозначены номера аллелей по каждому из локусов и номера сиквенс-типов, согласно сервису PubMLST; *выявлен впервые описанный сиквенс-тип.

ших способов генотипирования *B. anthracis*, вероятно, одинаковый MLVA-профиль исследуемых нами штаммов говорит о их крайне близком родстве, либо о том, что они, по сути, являются одним штаммом. Ранее была показана возможность использования сибирезвенных MLVA-локусов для дифференцирования *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis*, а также поиска наиболее тесно связанных с *B. anthracis* других штаммов рода *Bacillus* [31, 33]. В настоящей работе показана возможность дифференцирования путем MLVA штаммов *B. anthracis* и группы *B. cereus* complex и выявлены различия по ряду локусов между исследуемыми штаммами.

MLST-генотипирование. MLST является одним из самых надежных способов генотипирования для группы *B. cereus* complex и особенно успешно позволяет определить вид исследуемого изолята. Мы использовали одну из наиболее популярных схем MLST в отношении исследуемых штаммов [14]. По результатам полногеномного секвенирования были определены номера аллелей и ST в соответствии с базой данных (<https://pubmlst.org/bcereus/>). Результаты представлены в табл. 7.

Среди исследуемой выборки к ST-217 принадлежали 4 штамма, а к ST-32 — 3 штамма. В базе данных PubMLST, в которой на момент написания работы содержалась информация о 5521 штаммах группы *B. cereus* complex, к ST-217 относится один штамм — KW14 (место и дата выделения неизвестны), а к ST-32 отнесены 27 штаммов (выделены из пищевых продуктов в США, Канаде, Южной Корее, Китае и Тайване). Как видно из табл. 7, у штаммов YakM1, YakM2 и YakM4 выявлена комбинация аллелей, которая не соответствует ни одному из ранее описанных сиквенс-типов. Однако, согласно PubMLST, данный ST входит в состав 196 клонального комплекса, куда входят 58 других ST. Таким образом, в данной работе мы выявили новый ранее не описанный MLST-ST у

штаммов группы *B. cereus* complex, найденных в почве вечной мерзлоты.

Выявление как редких, так и ранее не описанного ST представляет интерес с точки зрения эволюции группы *B. cereus* complex. В географической точке на месте находки мумий пещерных львят, был выделен ряд штаммов *B. anthracis*, причем 3 из них принадлежали разным эволюционным линиям — А и В [16, 35]. Позднее из тех же образцов почвы были выделены и штаммы, исследуемые в настоящей работе. Интересно, что эти 10 штаммов относятся к трем известным и одному новому ST, а штаммы *B. anthracis* отнесены к ST-1 и ST-3. То есть большинство штаммов рода *Bacillus* относятся к разным эволюционным ветвям и в данной географической точке наблюдается значительный полиморфизм как среди *B. anthracis*, так и среди группы *B. cereus* complex в целом. Кроме того, важно отметить, что локусы, используемые для MLST-генотипирования, представляют собой гены домашнего хозяйства, которые обладают сравнительно медленной эволюцией, что является еще одним аргументом в пользу высокого биоразнообразия штаммов, принадлежащих к близкородственным видам и выделенных буквально в одной точке [14]. Необходимо обратить внимание на то, что все штаммы выделены в Якутии из образцов почвы, находящейся в аллювиальных отложениях Голоцена [16]. Несмотря на то, что ранее время консервации штаммов *B. anthracis* в мерзлоте определено, как относящееся к XIII–XVI векам, факт выделения их из вечной мерзлоты дает основания предположить, что их возраст может быть гораздо больше предполагаемого, вплоть до нескольких тысячелетий, в то время как вид *B. anthracis* появился приблизительно 12–26 тыс. лет назад [36]. Это свидетельствует о важности данного региона Якутии в происхождении и эволюции самого вида *B. anthracis*. Поэтому данная гипотеза требует дальнейшей разработки, а новые штаммы — более глубокого изучения.

Таким образом, в настоящей работе проведено исследование 10 штаммов *B. cereus* complex, выделенных из образцов почвы, находящейся в вечной мерзлоте на территории Якутии. Проведено фенотипическое исследование штаммов культуральными и биохимическими методами. Методом ПЦР определен профиль наличия в их геноме генов, кодирующих энтеротоксины. Затем проведено MLVA-генотипирование с использованием локусов, применяемых для генотипирования штаммов возбудителя сибирской язвы, что позволило дифференцировать штаммы *B. cereus* complex от *B. anthracis* и выявить их различия и сходства по ряду локусов. На основе результатов проведенного секвенирования геномов осуществлено MLST-генотипирование, в результате которого выявлено 2 ранее описанных, но достаточно редких ST и один не описанный и не зарегистрированный в базе данных PubMLST ST, что очень важно в целом для фундаментальных и филогенетических исследований группы *B. cereus* complex.

Полученные результаты подчеркивают важность использования методов генотипирования при исследовании такой мономорфной группы как *B. cereus* complex, причем необходимо использовать именно комплекс подходов, преимущественно основанных на данных полногеномного секвенирования. Исследование данной группы микроорганизмов показало свою актуальность и с точки зрения оценки микробиологических рисков в Арктическом регионе при изменении климата, в связи с выявлением вирулентных штаммов возбудителя сибирской язвы, а также крупной вспышкой этого заболевания среди оленей летом 2016 г., которая была спровоцирована таянием вечной мерзлоты с законсервированными в ней спорами, а также выделением других родов микроорганизмов, имеющих патогенный потенциал [16, 39, 40].

Материал подготовлен в рамках секторальной программы Роспотребнадзора. Работа частично выполнена в рамках Соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ГНЦ ПМБ и АНО "Губернская академия".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stepanov I., Makarov I., Makarova E. et al. // Climatic Change. 2023. V. 176. № 4. P. 39. <https://doi.org/10.1007/s10584-023-03512-5>
2. Baldwin V.M. // Front. Microbiol. 2020. P. 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01731>
3. Carroll L.M., Kovac J., Miller R.A., Wiedmann M. // Appl. Environ. Microbiol. 2017. V. 83. № 17. e01096-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01096-17>
4. Jovanovic J., Ornelis V.F.M., Madder A., Rajkovic A. // Compr. Rev. Food. Sci. Food. Saf. 2021. V. 20. № 4. P. 3719–3761. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12785>
5. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. / М.: ЗАО МП Гигиена, 2008. 416 с.
6. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. Методы изучения биологических и молекулярно-генетических свойств возбудителя сибирской язвы: учебно-методическое пособие. / Ред. И.А. Дятлов. М.: Издательство "Династия", 2021. 240 с.
7. Drean P., Fox E.M. // Methods Mol. Biol. 2015. № 1301. P. 71–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2599-5_7
8. Daffonchio D., Borin S., Frova G., Gallo R., Mori E., Fani R. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 3. P. 1298–303. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.3.1298-1303.1999>
9. Oh M.H., Ham J.S., Cox J.M. // Int. J. Food Microbiol. 2012. V. 152. № 1–2. P. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018>
10. Ripabelli G., McLauchlin J., Mithani V., Threlfall E.J. // Lett. Appl. Microbiol. 2000. V. 30. № 5. P. 358–63. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2000.00729.x>
11. Hill K.K., Ticknor L.O., Okinaka R.T., Asay M., Blair H., Bliss K.A. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 2. P. 1068–1080. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1068-1080.2004>
12. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 6. P. 2627–2630. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000>
13. Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolstø A.B. // Appl. Environ. Microbiol. 2004. V. 70. № 1. P. 191–201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004>
14. Priest F.G., Barker M., Baillie L.W., Holmes E.C., Maiden M.C. // J. Bacteriol. 2004. V. 186. № 23. P. 7959–7970. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004>
15. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. // J. Bacteriol. 2000. V. 182. № 10. P. 2928–2936. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2928-2936.2000>
16. Timofeev V., Bahtejeva I., Mironova R., Titareva G., Lev I., Christiany D. et al. // PLoS One. 2019. V. 14. № 5. e0209140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209140>
17. Ehling-Schulz M., Guinebretiere M.H., Monthan A., Berge O. // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 260. № 2. P. 232–240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00320.x>
18. Marxen S., Stark T.D., Frenzel E., Rüttschle A., Lücking G., Pürstinger G. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 9. P. 2439–2453. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8511-y>
19. Dietrich R., Jessberger N., Ehling-Schulz M., Märtlbauer E., Granum P.E. // Toxins (Basel). 2021. V. 13. № 2. P. 98. <https://doi.org/10.3390/toxins13020098>
20. Kim J.B., Kim J.M., Kim S.Y., Kim J.H., Park Y.B., Choi N.J. et al. // J Food Prot. 2010. V. 73. № 7. P. 1219–1224. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.7.1219>
21. Kim J.M., Forghani F., Kim J.B., Park Y.B., Park M.S., Wang J. et al. // Food Science and Biotechnology. 2012. V. 21. № 5. P. 1439–1444. <https://doi.org/10.1007/s10068-012-0189-8>
22. Tallent S.M., Hait J.M., Bennett R.W. // J. Appl. Microbiol. 2015. V. 118. № 4. P. 1068–1075. <https://doi.org/10.1111/jam.12766>
23. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovic A., Uyttendaele M. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 404. № 6–7. P. 1691–1702. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6254-6>

24. Inatsu Y., Chotiko A., Ananchaipattana C. // Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ. 2020. V. 54. № 1. P. 47–51.
<https://doi.org/10.6090/jarq.54.47>
25. Kuwana R., Imamura D., Takamatsu H., Watabe K. // Biocontrol Sci. 2012. V. 17. № 2. P. 83–86.
<https://doi.org/10.4265/bio.17.83>
26. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Ramišse V. et al. // BMC Microbiol. 2001. V. 1. P. 2.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-2>
27. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., le Doujet C. et al. // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 33.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-33>
28. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J. et al. // PLoS One. 2007. V. 2. № 5. e461.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000461>
29. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C. et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 6. e95131.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095131>
30. Turnbull P.C. // J. Appl. Microbiol. 1999. V. 87. № 2. P. 237–240.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00876.x>
31. Marston C.K., Gee J.E., Popovic T., Hoffmaster A.R. // BMC Microbiol. 2006. V. 6. P. 22.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-22>
32. Calvigioni M., Cara A., Celandroni F., Mazzantini D., Panattoni A., Tirloni E. et al. // J. Appl. Microbiol. 2022. V. 133. № 2. P. 1078–1088.
<https://doi.org/10.1111/jam.15636>
33. Valjevac S., Hilaire V., Lisanti O., Ramišse F., Hernandez E., Cavallo J.D. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. V. 71. № 11. P. 6613–6623.
<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6613-6623.2005>
34. Antonation K.S., Grützmacher K., Dupke S., Mabon P., Zimmermann F., Lankester F. et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2016. V. 10. № 9. e0004923.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004923>
35. Goncharova Y., Bahtejeva I., Titareva G., Kravchenko T., Lev A., Dyatlov I., Timofeev V. // Pathogens. 2021. V. 10. № 12. P. 1556.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10121556>
36. Kolstø A.B., Tourasse N.J., Økstad O.A. // Annu. Rev. Microbiol. 2009. № 63. P. 451–476.
<https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073255>
37. Federhen S., Rossello-Mora R., Klenk H.P., Tindall B.J., Konstantinidis K.T., Whitman W.B. et al. // Stand. Genomic Sci. 2016. V. 11. № 1.
<https://doi.org/10.1186/s40793-016-0134-1>
38. Ciufò S., Kannan S., Sharma S., Badretin A., Clark K., Turner S. et al. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. № 7. P. 2386–2392.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002809>
39. Stella E., Mari L., Gabrieli J., Barbante C., Bertuzzo E. // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 16460.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-72440-6>
40. da Silva T.H., Queres Gomes E.C., Gonçalves V.N., da Costa M.C., Valério A.D., de Assis Santos D. et al. // Fungal Biol. 2022. V. 126. № 8. P. 488–497.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2022.04.003>

Characteristics of *Bacillus cereus* complex Group Strains Isolated from Permafrost in Yakutia for Assessment of Microbiological Risks During Climate Change

Y. O. Goncharova^{a, *}, V. V. Evseeva^a, R. I. Mironova^a, K. V. Khlopova^a, A. G. Bogun^a, A. A. Sizova^a, V. I. Solomentsev^a, G. M. Titareva^a, I. V. Bahtejeva^a, T. B. Kravchenko^a, A. V. Brushkov^{b, c}, V. S. Timofeev^a, and S. G. Ignatov^{a, b, **}

^a State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region, 142279 Russia

^b Moscow State University M.V. Lomonosov, Moscow, 119991 Russia

^c Tyumen State University, Tyumen, 625003 Russia

*e-mail: iulia.belay@yandex.ru

**e-mail: ignatov@obolensk.org

Strains of *Bacillus* genus were isolated from soil samples in the permafrost region (Yakutia, Russia). The phenotypic characteristics of the strains are given. The analysis of the obtained data made it possible to assign them to the group *Bacillus cereus* complex. PCR analysis made it possible to determine the profile of *B. cereus* toxin synthesis genes in the genomes of the studied strains. Genetic characterization was obtained by RAPD genotyping and using MLVA loci used for genotyping of the anthrax pathogen. The results of genotyping at different levels of resolution made it possible to differentiate the studied strains from the *B. anthracis* species, to show their intraspecific genetic differences and the degree of relationship. Whole genome sequencing was carried out, based on the data of which MLST genotyping was carried out, which revealed 2 known sequence types and one new one, described for the first time in this work. The results obtained are of practical importance and are extremely interesting from the point of view of the evolution and phylogeography of the *B. cereus* complex group, since the fact that strains were isolated from permafrost suggests that their age may be much older than expected.

Keywords: *Bacillus cereus* complex, *Bacillus anthracis*, toxins, genotyping, MLVA, MLST, RAPD, permafrost

УДК 579.61

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИ ИНЕРТНЫХ КЛЕТОК *Mycobacterium abscessus* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 2023 г. Б. А. Мартини¹, Е. Г. Салина^{1, 2, *}

¹ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

*e-mail: elenasalina@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Исследовали эффективность действия антибиотиков (амикацин, бедаквилин, линезолид, моксифлоксацин, рифампицин) на метаболически инертные клетки *Mycobacterium abscessus*, полученные *in vitro* в условиях дефицита калия. Обнаружено, что бедаквилин приводил к существенному снижению способности бактерий образовывать колонии на плотных средах, но не приводил их к гибели, поскольку было показано, что при культивировании в жидкой среде наблюдалась их реверсия к состоянию активного деления и роста. Моксифлоксацин обладал бактерицидным действием в отношении метаболически инертных бактерий, необратимо и значительно снижая число жизнеспособных клеток в культуре, что подчеркивает эффективность его применения для терапии инфекций, вызываемых *M. abscessus*.

Ключевые слова: *Mycobacterium abscessus*, муковисцидоз, лекарственная устойчивость, новые лекарственные средства

DOI: 10.31857/S0555109923060089, **EDN:** SKTNEU

Бактерия *Mycobacterium abscessus* относится к нетуберкулезным быстрорастущим микобактериям, и в последнее время этот вид вызывает большие опасения в связи с ростом числа инфицированных ею людей [1]. Несмотря на то, что бактерия *M. abscessus* относится к числу условно патогенных микроорганизмов, она способна вызывать тяжелые трудноизлечимые инфекции легких у лиц, страдающих различными легочными патологиями: муковисцидозом, бронхоэктазами, хронической обструктивной болезнью легких, а также ранее перенесших туберкулез [1, 2]. Кроме того, у людей с ослабленной иммунной системой *M. abscessus* может вызывать инфекцию кожи, мягких тканей, глаз и др. [1, 3]. В настоящее время неясно, в какой степени увеличение числа случаев инфицирования связано улучшенной диагностикой *M. abscessus*, и каков фактический рост заболеваемости. Фактором, который способствует наблюдаемому росту, может выступать увеличение продолжительности жизни пациентов с муковисцидозом и другими предрасполагающими заболеваниями легких. Геном *M. abscessus* имеет значительное сходство с геномом патогенной бактерии *Mycobacterium tuberculosis*, но ис-

пользование противотуберкулезных препаратов для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*, малоэффективно, поскольку эта бактерия обладает чрезвычайно высокой устойчивостью к большинству антибиотиков [1, 2]. Несмотря на значительные усилия по поиску новых препаратов для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*, эффективные лекарственные средства все еще не найдены. Одной из причин этого является значительные различия условий, в которых микобактерии инкубируют *in vitro* при тестировании антибактериальной активности соединений — кандидатов в лекарственное средство (сбалансированные среды, богатые компонентами питания), и в клинических условиях “реальной” инфекции, где бактерии вынуждены адаптироваться к неоптимальным условиям окружающей среды, имеющим место во время инфекции, включая недостаток кислорода, нехватку основных компонентов питания и т.д., что приводит к снижению активности метаболических реакций *M. abscessus* и, как следствие, “выключенности” многих мишеней, что делает бактерию толерантной к антибактериальным агентам [4, 5].

Цель работы — изучение влияния дефицита калия, приводящего к переходу в состояние метаболической инертности у микобактерий [6, 7] на восприимчивость *M. abscessus* к лекарственным средствам.

МЕТОДИКА

Объект исследования и условия культивирования. Клетки бактерии *M. abscessus* штамма ATCC 19977, полученного из исследовательского университета “Европейская политехническая школа Лозанны” (Швейцария) хранили при -70°C . Выращивание проводили в синтетической среде Миддлбука (7Н9) (“Himedia”, Индия) или среде Сотона с добавлением 10% ростовой добавки ADC (“Himedia”, Индия) и 0.05% твина-80 (“Neofroxx GmbH”, Германия) при 37°C с перемешиванием (200 об./мин). Состав среды Сотона (на г/л): KH_2PO_4 — 0.5 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.4; L-аспарагин — 4; глицерин — 60 мл; цитрат железа-аммония — 0.05; цитрат натрия — 2; ZnSO_4 — 0.001, pH 7.0 [8].

Получение метаболически инертных клеток. Для получения метаболически инертных клеток культуру *M. abscessus* выращивали в среде 7Н9 с добавлением 10% ADC и 0.05% твина-80. По достижении значения оптической плотности $\text{OD}_{600} = 5$ –6 культуру пересевали на модифицированную, не содержащую калия среду Сотона с добавлением 10% ростовой добавки ADC и 0.05% твина-80. Процент посевного материала 0.25%, что соответствует стартовой концентрации бактерий 5×10^6 кл. в мл. Состав среды Сотона, не содержащей калия (г/л): $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 8.9; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1.4; L-аспарагин — 4; глицерин — 60 мл; цитрат железа-аммония — 0.05; цитрат натрия — 2; ZnSO_4 — 0.001, pH 7.0 (доводили 1 М NaOH).

Определение числа колониеобразующих единиц. Из суспензии бактериальных клеток последовательно готовили серию десятикратных разведений в свежей среде роста, а затем аликвоты каждого разведения высевали на агаризованную (1.5% агара) синтетическую питательную среду Сотона с добавлением ростовой добавки ADC. Чашки инкубировали при 37°C , число колониеобразующих единиц (КОЕ) *M. abscessus* подсчитывали через 6 сут после посева, определяя его как среднее из результатов подсчета, сделанного в 3 повторностях.

Определение наиболее вероятного числа жизнеспособных клеток. Аликвоты (0.1 мл) серии десятикратных разведений суспензии клеток инокулировали в лунки стерильного 48-луночного планшета (“Corning”, США), содержащие 0.9 мл “среды оживления” [9] с добавлением ростовой добавки ADC, причем каждое разведение было представлено в минимум в 3 повторностях. Планшеты инкубировали в течение 12 сут при 37°C в статическом режиме. При подсчете наиболее ве-

роятного числа (НВЧ) жизнеспособных клеток по стандартным статистическим таблицам [10] учитывали лунки с видимым бактериальным ростом.

Определение минимальной ингибирующей концентрации. Оценку величины минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводили в среде 7Н9 для активнорастущих клеток и среде Сотона, не содержащей калия, для метаболически инертных клеток с добавлением 10% ростовой добавки ADC. Каждая лунка стерильного 96-луночного планшета (“Corning”, США), содержала 0.2 мл среды и 5×10^5 активнорастущих клеток *M. abscessus*, взятых из логарифмической фазы роста, или метаболически инертных клеток после 24 сут их инкубации в условиях дефицита калия, а также различные концентрации антибиотиков, уменьшающихся с шагом 1/2 от максимальной (32 мг/мл) к минимальной. Часть лунок содержала только среду без клеток (отрицательный контроль) или только среду с клетками без добавления антибиотиков (положительный контроль). Планшеты инкубировали при 37°C 24 ч в статическом режиме, после чего в каждую лунку добавляли раствор окислительно-восстановительного индикатора резазурина (“Merck”, Германия) в концентрации 0.025 мг/мл и инкубировали при 37°C еще 16–18 ч. В лунках, которых наблюдалось деление бактериальных клеток (т.е. отсутствие ингибирования антибиотиками) происходило превращение резазурина в флуоресцентный продукт резазурина [11, 12], уровень флуоресценции которого регистрировали на планшетном монохроматорном спектрофлуориметре Fluostar Omega (“BMG-Labtech”, Германия) при длине волны возбуждения 544 нм (длина волны испускания 590 нм). Интенсивность флуоресценции в экспериментальных лунках с антибиотиками сравнивали с интенсивностью флуоресценции в лунках без добавления антибиотиков (положительный контроль). МИК антибиотиков определяли как концентрацию, в присутствии которой наблюдалось падение интенсивности флуоресценции, пропорциональной уменьшению числа жизнеспособных бактериальных клеток, на 80% и более по сравнению с интенсивностью флуоресценции в лунках, соответствующих положительному контролю без антибиотика [11, 12].

Определение бактерицидной активности. Бактерицидную активность антибиотиков в отношении метаболически инертных клеток, полученных после 24 сут инкубации в условиях недостатка калия, определяли в соответствии с протоколом [13], регистрируя динамику изменения КОЕ и НВЧ в культуре. Для этого культуру инертных клеток $\text{OD}_{600} = 6$ –7 разводили супернатантом до $\text{OD}_{600} = 0.1$ и инкубировали на качалке при 37°C и 200 об./мин в присутствии 100 мкг/мл антибиотиков. Через

определенные промежутки времени клетки отмывали свежей средой от антибиотиков и делали высевы аликвот серии десятикратных разведений на жидкую и плотную питательные среды. Значения КОЕ и НВЧ определяли как среднее из результатов эксперимента, сделанного в 3 повторностях.

Измерение дыхательной активности. Для оценки уровня дыхательной активности клеток измеряли изменение оптической плотности при 600 нм искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорфенола-индофенолята натрия (ДФИ) ("Merck", Германия) в присутствии менадиона при 37°C [14]. Измерения проводили в планшетном монохроматорном спектрофлуориметре Fluostar Omega ("BMG-Labtech", Германия). Реакционная смесь объемом 0.2 мл содержала: 0.5 мМ 2,6-ДФИ, 0.15 мМ менадиона, 1×10^7 жизнеспособных клеток микобактерий, подсчитанных методом НВЧ, и ресуспендированных в 0.01 М фосфатном буфере pH 6.8. Дыхательную активность определяли как число моль ДФИ, превращенных 1 кл. за 1 мин, определяя ее как среднее из результатов 3 измерений, относительная погрешность при этом не превышала 5%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование динамики изменения числа КОЕ *M. abscessus* при инкубации в условиях дефицита калия. Ранее было установлено, что условия дефицита калия являются специфическим внешним сигналом для перехода бактерий *M. tuberculosis* и *Mycobacterium smegmatis* в состояние покоя и "некультивируемости" *in vitro* [6, 7]. Полученные покоящиеся "некультивируемые" клетки характеризовались существенно сниженной способностью к образованию колоний на плотных питательных средах. Используя условия дефицита калия в питательной среде, мы разработали модельную систему *in vitro* для поиска антибактериальных агентов, направленных против латентной формы туберкулеза. В этой модельной системе число КОЕ обратимо снижалось до нуля с сохранением жизнеспособности клеток и их способности ревертировать в состояние активного деления и роста [15].

В настоящей работе подход, связанный с недостатком калия в питательной среде, был также применен нами для формирования метаболически инертного состояния у *M. abscessus*, характеризующегося снижением способности клеток к делению и росту. В результате продолжительного инкубирования (24 сут) *M. abscessus* в условиях недостатка калия были получены клетки со сниженным уровнем метаболической активности, что подтверждалось снижением их дыхательной активности, определенной по способности клеток превращать искусственный акцептор электронов ДФИ. Так, дыхательная активность клеток,

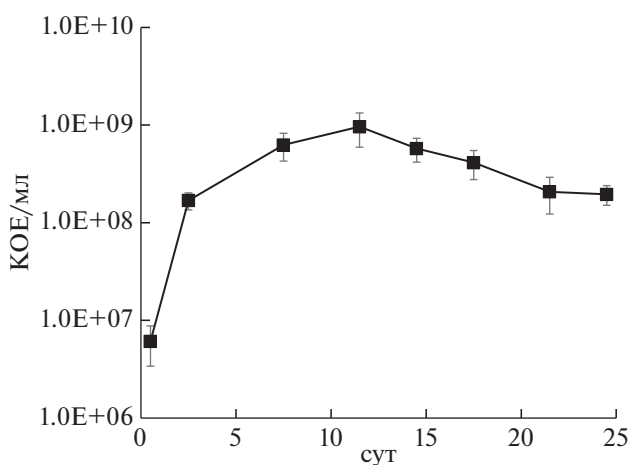


Рис. 1. Динамика КОЕ *M. abscessus* при инкубации в среде без калия.

инкубировавшихся в K^+ -лимитированной среде в течение 24 сут, составила $0.27 \pm 0.03 \times 10^{-15}$ моль ДФИ/(кл. · мин), тогда как для клеток логарифмической фазы роста, растущих в стандартной среде Сотона, дыхательная активность соответствовала $1.91 \pm 0.23 \times 10^{-15}$ моль ДФИ/(кл. · мин), что указывало на снижение дыхательной активности более чем в 7 раз. При этом у *M. abscessus* не было обнаружено драматического снижения числа КОЕ до нуля при ограничении доступности калия, как это наблюдалось у *M. smegmatis* и *M. tuberculosis* в K^+ -лимитированной среде [6, 7]. Через 24 сут инкубирования в условиях дефицита калия число КОЕ у *M. abscessus* уменьшалось всего на 79.7% (рис. 1).

Изучение эффективности антибиотиков в отношении активных и инертных клеток. Известно, что ввиду отсутствия специфических лекарственных средств, эффективных в отношении *M. abscessus*, для лечения инфекций, вызываемых этой бактерией, часто рекомендуются такие препараты, как амикацин, линезолид, моксифлоксацин и др., однако данные об их эффективности являются неполными и иногда противоречивыми. Мы определили значения МИК амикацина, бедаквилина, линезолида, моксифлоксацина, рифампицина в отношении активно делящихся клеток *M. abscessus* логарифмической фазы роста, растущих без дефицита калия, и обнаружили, что они находятся в интервале 2–16 мкг/мл (табл. 1). Далее мы определили МИК для указанных антибиотиков в отношении метаболически инертных клеток, полученных после 24 сут инкубации в условиях дефицита калия, и получили примерно такой же интервал значений (табл. 1). Полученные значения МИК являются хотя и достаточно высокими, но, тем не менее, позволяют рассматривать данные антибиотики

Таблица 1. Значения МИК антибиотиков в отношении *M. abscessus*

Антибиотики	МИК, мкг/мл	
	Активные клетки	Инертные клетки
Амикацин	16	16
Бедаквилин	2	2
Линезолид	2–4	4
Моксифлоксацин	2–4	4
Рифампицин	4	8

Таблица 2. Значения КОЕ, НВЧ и индекса реверсии для метаболически инертных клеток *M. abscessus*, полученных в условиях дефицита калия, после 12 сут инкубации в присутствии антибиотиков в концентрации 100 мкг/мл

Антибиотик	КОЕ/мл	НВЧ/мл	Индекс реверсии, НВЧ/КОЕ
Контроль	1.13×10^6	1.10×10^8	97
Амикацин	9.75×10^5	1.50×10^7	15
Бедаквилин	1.05×10^4	1.10×10^8	10476
Линезолид	1.45×10^5	1.50×10^7	103
Моксифлоксацин	4.25×10^3	4.60×10^5	108
Рифампицин	1.25×10^6	1.10×10^8	88

как перспективные для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*.

Изучение бактерицидной активности антибиотиков в отношении метаболически инертных клеток, полученных в условиях дефицита калия. Принимая во внимание снижение активности метаболических процессов и возможную толерантность *M. abscessus* к антибактериальным агентам при инфекции, на следующем этапе мы изучали бактерицидную активность антибиотиков в отношении метаболически инертных клеток, полученных в условиях дефицита калия. Для этого мы регистрировали изменение числа КОЕ клеток *M. abscessus*, полученных после 24 сут инкубации в калий-дефицитной среде, под действием 100 мкг/мл исследуемых антибиотиков в динамике, делая высеvy на плотные питательные среды через 4, 8 и 12 сут инкубации с антибиотиками (рис. 2). В контрольном образце клеток *M. abscessus* без дополнительного внесения антибиотиков, которые продолжали инкубироваться в калий-дефицитной среде, происходило дальнейшее постепенное снижение числа КОЕ, и присутствие рифампицина и амикацина в концентрации 100 мкг/мл в культуре клеток не приводило к дополнительному его снижению

(рис. 2). Внесение линезолида в концентрации 100 мкг/мл незначительно влияло на изменение числа КОЕ через 4 и 8 сут инкубации, однако через 12 сут число КОЕ снижалось в 10 раз по сравнению с контрольным образцом без антибиотика (рис. 2). Добавление моксифлоксацина и бедаквилина вызывало максимальное – на 2 и более порядка по сравнению с контрольным образцом клеток – снижение числа КОЕ через 12 сут инкубации (рис. 2).

Для того, чтобы оценить, являлось ли наблюдаемое снижение КОЕ необратимым, то есть следствием гибели клеток под действием тестируемых антибиотиков (и свидетельством их “истинной” бактерицидной активности в отношении инертных бактерий), или же имел место частичный обратимый переход *M. abscessus* в состояние сниженной культивируемости под действием высоких концентраций антибиотиков без потери их жизнеспособности, параллельно с высевом на плотные среды и подсчетом КОЕ через 12 сут инкубации нами был проведен высеv культуры на жидкую синтетическую среду “оживления” с применением метода конечных разведений [7]. Культивирование на указанной среде предполагает выявление и учет форм с возможной сниженной способностью к делению и росту. Подсчет числа жизнеспособных бактерий производился методом НВЧ исходя из числа лунок с видимым бактериальным ростом. Оказалось, что после 12 сут инкубации с исследуемыми антибиотиками только присутствие моксифлоксацина приводило к выраженному снижению числа как КОЕ (4.30×10^3 /мл), так и НВЧ (4.60×10^5 /мл) по сравнению с контрольным образцом клеток (табл. 2), что свидетельствовало об их гибели. То есть, моксифлоксацин проявлял “истинную” бактерицидную активность в отношении клеток *M. abscessus* со сниженной дыхательной активностью, полученным в условиях недостатка калия, с незначительной реверсией к состоянию активного деления и роста при отмывке клеток от антибиотика и перенесении их в сбалансированную жидкую среду “оживления”. Бедаквилин, который также вызывал заметное снижение числа КОЕ после 12 сут инкубирования с *M. abscessus* (более чем на 4 порядка по сравнению с начальной точкой, рис. 2), не вызывал снижения НВЧ жизнеспособных клеток (оно совпадало со значением НВЧ контрольного образца, табл. 2). Таким образом, инкубация метаболически инертных *M. abscessus* с бедаквилином в концентрации 100 мкг/мл не приводила к их гибели, поскольку при переносе клеток в жидкую сбалансированную среду “оживления” наблюдался высокий (свыше 10000) индекс реверсии к состоянию активного роста и деления (табл. 2).

Проблема поиска лекарственных средств для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*, стоит очень остро, поскольку данная бактерия явля-

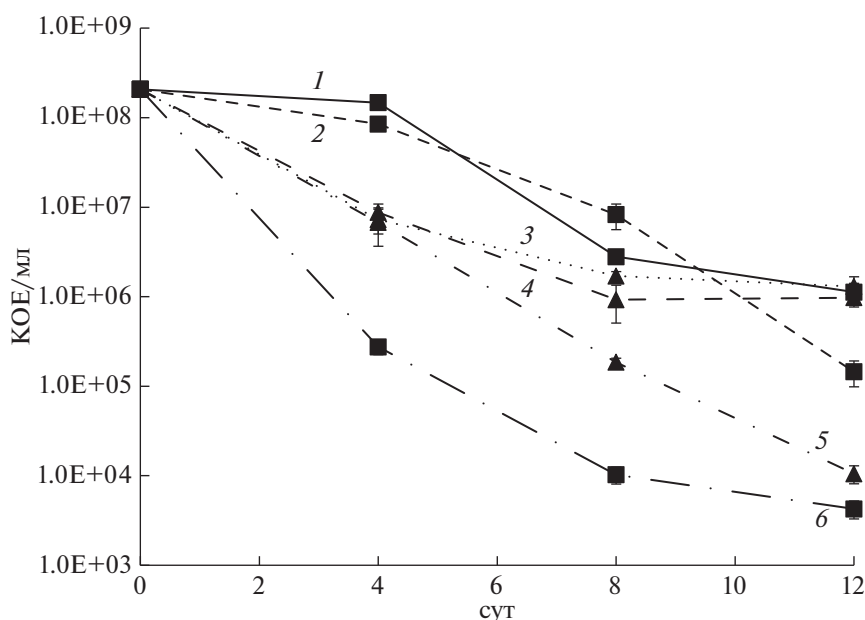


Рис. 2. Динамика снижения числа КОЕ метаболчески инертных *M. abscessus* под действием антибиотиков в концентрации 100 мкг/мл: 1 — контроль, 2 — линезолид, 3 — амикацин, 4 — рифампицин, 5 — бедаквилин, 6 — моксифлоксацин.

ется мультирезистентным микроорганизмом и обладает устойчивостью к большинству антибиотиков [1–3]. Необычайно широкий арсенал ферментов-деактиваторов антибактериальных агентов и эффлюксных насосов, что является одной из особенностей *M. abscessus*, служит существенным препятствием в разработке эффективных терапевтических схем лечения инфекций [1, 2]. Кроме того, большое значение имеет принципиальное различие условий, в которых *M. abscessus* находится в процессе тестирования антибактериальной активности соединений-кандидатов в лекарственное средство в условиях лаборатории, и в клинической практике, где они испытывают давление со стороны инфицированного макроорганизма и подвергаются воздействию многих стрессовых факторов, адаптируя свои метаболические реакции с целью повысить толерантность к неблагоприятным внешним условиям [4, 5].

Подход к анализу эффективности лекарственных средств *in vitro*, связанный с использованием в качестве модели для тестирования клеток со сниженной метаболической активностью, полученных в условиях дефицита калия, подтвердил неэффективность применения рифампицина при терапии инфекций, вызываемых *M. abscessus*; механизм устойчивости бактерии к рифампицину был выявлен и описан ранее [1, 16]. Однако мы обнаружили, что активно используемые в настоящее время в клинической практике для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*, линезолид и особенно амикацин, имели низкую эффективность

в модельной системе *in vitro* с использованием метаболчески инертных клеток. Моксифлоксацин — один из антибиотиков для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus* [2], характеризовался максимальной эффективностью в модельной системе с применением клеток со сниженной метаболической активностью. Необходимо отметить, что бедаквилин, который в настоящее время не применяется для лечения инфекций, вызываемых *M. abscessus*, может также обладать существенным терапевтическим потенциалом, поскольку он эффективно снижал число КОЕ метаболчески инертных клеток. Реверсия клеток, обработанных бедаквилином, в активное, делящееся состояние при переносе в жидкую сбалансированную среду “оживления”, установленная методом конечных разведений с подсчетом НВЧ жизнеспособных клеток, исключающим возобновление роста за счет персистеров, могла быть связана с непродолжительным временем воздействия антибиотика, используемого в эксперименте. О потенциальной возможности применения бедаквилина как альтернативного агента для борьбы с инфекциями, вызываемыми *M. abscessus*, ранее уже сообщалось в работе [17].

Таким образом, изучение эффективности лекарственных препаратов в отношении клеток *M. abscessus* со сниженной метаболической активностью, которые по своим характеристикам ближе к клеткам *in vivo* при инфекции, чем активно делящиеся *M. abscessus*, в будущем может выявить перспективные антимикобактериальные агенты с

бактерицидной активностью в отношении *M. abscessus*, увеличить эффективность проводимой терапии и сократить ее сроки.

Работа частично поддержана Российским научным фондом, грант 23-15-00173 (изучение условий получения метаболически инертных форм *M. abscessus*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Johansen M.D., Herrmann J.L., Kremer L. // Nat. Rev. Microbiol. 2020. V. 18. № 1. P. 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>
2. Recchia D., Stelitano G., Stamilla A., Gutierrez D.L., Degiacomi G., Chiarelli L.R., Pasca M.R. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 5. P. 4635. <https://doi.org/10.3390/ijms24054635>
3. Sepulcri C., Vena A., Bassetti M. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2023. V. 36. № 2. P. 74–80. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000905>
4. Berube B.J., Castro L., Russell D., Ovechkina Y., Parish T. // Front Microbiol. 2018. V. 9. P. 2417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02417>
5. Yam Y.K., Alvarez N., Go M.L., Dick T. // Front Microbiol. 2020. V. 11. P. 359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00359>
6. Shleeva M., Mukamolova G.V., Young M., Williams H.D., Kaprelyants A.S. // Microbiology. 2004. V. 150. P. 1687–1697. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26893-0>
7. Salina E.G., Waddell S.J., Hoffmann N., Rosenkrands I., Butcher P.D., Kaprelyants A.S. // Open Biol. 2014. V. 4. P. 140106. <https://doi.org/10.1098/rsob.140106>
8. Connell N. // Methods Cell Biol. 1994. V. 45. P. 107–125. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61848-8](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61848-8)
9. Shleeva M.O., Kudykina Y.K., Vostroknutova G.N., Suzina N.E., Mulyukin A.L., Kaprelyants A.S. // Tuberculosis (Edinb). 2011. V. 91. P. 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2010.12.006>
10. de Man J.C. // J. Appl. Microbiol. 1975. V. 1. P. 67–78. <https://doi.org/10.1007/BF01880621>
11. Palomino J.C., Martin A., Camacho M., Guerra H., Swings J., Portaels F. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 8. P. 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002>
12. Coban A.Y., Deveci A., Sunter A.T., Palomino J.C., Martin A. // Int J Mycobacteriol. 2014. V. 3. № 4. P. 230–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.09.002>
13. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. // Clinical and Laboratory Standard Institute Wayne, V. 27(1). 17th Information Supplement.
14. Myers A. // J. Biol. Educ. 1990. V. 24. № 2. P. 123–127. <https://doi.org/10.1080/00219266.1990.9655123>
15. Salina E., Ryabova O., Kaprelyants A., Makarov V. // Antimicrob. Agents Chemother. 2014. V. 58. № 1. P. 55–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.01308-13>
16. Hurst-Hess K.R., Saxena A., Rudra P., Yang Y., Ghosh P. // Mol. Cell. 2022. V. 82. № 17. P. 3166–3177. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.034>
17. Vesenbeckh S., Schönfeld N., Roth A., Bettermann G., Krieger D., Bauer T.T., Rüssmann H., Mauch H. // Eur. Respir. J. 2017. V. 49. № 5. P. 1700083. <https://doi.org/10.1183/13993003.000083-2017>

Use of Metabolic Inert *Mycobacterium abscessus* Cells to Study the Efficiency Of Drugs

B. A. Martini^a and E. G. Salina^{a, b, *}

^aA.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnologies Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bShemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

*e-mail: elenasalina@yandex.ru

We investigated the effectiveness of antibiotics (amikacin, bedaquiline, linezolid, moxifloxacin, rifampicin) on metabolically inert *M. abscessus* obtained under conditions of potassium deficiency *in vitro*. It was found that bedaquiline led to a significant decrease in the ability of bacteria to form colonies on solid media, but did not lead to their death, since it was shown that during cultivation in a liquid medium, they reverted to a state of active division and growth. Moxifloxacin had a bactericidal effect against metabolically inert bacteria, irreversibly and significantly reducing the number of viable cells in culture, which emphasizes the effectiveness of its use for the treatment of infections caused by *M. abscessus*.

Keywords: *Mycobacterium abscessus*, cystic fibrosis, drug tolerance, new drugs

УДК 579.66

СОЗДАНИЕ ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОЙ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ПЕРОКСИДАЗЫ VP2 *Trametes hirsuta* В *Penicillium canescens*

© 2023 г. О. С. Савинова¹*, А. М. Чулкин¹, К. В. Моисеенко¹, Т. В. Федорова¹

¹ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

Поступила в редакцию 20.04.2023 г.

После доработки 05.05.2023 г.

Принята к публикации 10.05.2023 г.

Интерес к пероксидазам секретируемого ферментного комплекса базидиальных грибов обусловлен их широкой субстратной специфичностью и способностью участвовать в процессе биodeградации таких трудно деградируемых биополимеров, как лигнин. Однако из-за сложности выделения этих ферментов из нативных источников, их изучение затруднено. В работе были получены экспрессионные векторы, несущие последовательность, кодирующую универсальную пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072, которые были трансформированы в геном штамма *P. canescens*. Скрининг трансформантов показал наличие пероксидазной активности до 1 ед./мл. Целевой белок идентифицирован в культуральной жидкости отобранных трансформантов методом масс-спектрометрического анализа. Впервые получен новый штамм *P. canescens* rVP2D-6 – продуцент рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 и показана способность секретируемого им ферментного комплекса к модификации щелочного лигнина.

Ключевые слова: пероксидаза, лигнолитические ферменты, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, гетерологичная экспрессия, лигнин

DOI: 10.31857/S0555109923060120, **EDN:** CJQZRR

Лигнин – распространенный природный гетерогенный полимер, составляющий до одной трети всей растительной биомассы, источник ценных ароматических соединений [1, 2]. Наиболее значительным потенциалом в отношении его биodeструкции обладают базидиомицеты, в частности грибы белой гнили рода *Trametes*, приспособившиеся в ходе эволюции к включению в свои метаболические пути всех компонентов лигноцеллюлозы [3]. Эта способность обусловлена наличием у грибов белой гнили активного секретируемого мультиферментного лигнолитического комплекса, в состав которого входят пероксидазы (использующие H₂O₂ в качестве окислителя), лакказы (медь-содержащие оксидазы, окисляющие субстраты, восстанавливая кислород до H₂O) и различные вспомогательные ферменты (целлобиозодегидрогеназы, хинонредуктазы, а также оксидазы, генерирующие H₂O₂, такие как арил-алкогольоксидаза) [2, 4–6]. По сравнению с другими пероксидазами и лакказами лигнолитические пероксидазы (ЛП) обладают более высоким окислительно-восстановительным потенциалом, что позволяет им окислять широкий спектр субстратов [7], и привлекают особое внимание исследователей.

Известно, что в геномах базидиомицетов ЛП кодируются обширными мультигенными семействами. Ранее было показано [8], что базидиомицет *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 принимает непосредственное участие в процессе биотрансформации лигнина, и в его геноме было обнаружено 18 генов, кодирующих 9 предполагаемых изоферментов лигнин-пероксидазы (LiP; КФ 1.11.1.14), 7 марганец-зависимых пероксидаз (MnP; КФ 1.11.1.13) и 2 универсальные пероксидазы (VP; КФ 1.11.1.16) [9]. Однако при культивировании этого гриба в различных средах в секретах были детектированы только изоферменты марганецпероксидаз MnP1, MnP2, MnP5, MnP7, лигнинпероксидаза LiP9 и универсальная пероксидаза VP2 [10].

Считается, что LiP базидиомицетов принимают участие в расщеплении преобладающих и наиболее трудно деградируемых нефенольных структур лигнина, тогда как MnP могут участвовать в окислении второстепенных фенольных фрагментов лигнина [11]. Универсальные пероксидазы VP представляют особый интерес благодаря своей способности катализировать процесс деградации соединений, которые другие пероксидазы не способны окислять напрямую. Универсальность этих изоферментов позволяет использовать их в Mn³⁺-

опосредованных или независимых от Mn реакциях с ароматическими соединениями с низким или высоким окислительно-восстановительным потенциалом [12] без применения медиаторов. Однако все еще возникают вопросы о роли универсальных пероксидаз в лигнинолизе. Кроме того, преимуществом этих ферментов является высокая активность в присутствии органических растворителей [13].

На сегодняшний день отсутствие всесторонней характеристики всех членов мультигенного семейства ЛП, в частности гриба *T. hirsuta* LE-BIN072, сильно ограничивает потенциал использования этих ферментов в биокаталитических технологиях (биопереработка, биоремедиация, целлюлозно-бумажная промышленность). К сожалению, выделение и очистка индивидуальных изоферментов пероксидаз является нетривиальной задачей, так как они имеют близкие молекулярные массы и величины изоэлектрической точки, поэтому подробное изучение свойств индивидуальных изоферментов пероксидаз затруднено. Поскольку получение изоферментов с помощью нативных продуцентов трудно реализуемо, единственным способом решения задачи полной характеристики всех членов мультигенного семейства ЛП является переход к гетерологичным системам экспрессии.

Гетерологичной экспрессии секретируемых базидиальных ферментов в разных организмах посвящен большой объем исследований. Так, например, гетерологичная экспрессия пероксидазы *Pleurotus eryngii* в *Escherichia coli* обеспечивает быструю продукцию белка с высоким выходом, однако она ограничена необходимостью посттрансляционных модификаций (фолдинг, включения гема в белок, гликозилирование), которые возможны только у эукариотических организмов [14]. В этом отношении дрожжевые [15] и грибные [16, 17] системы экспрессии имеют явные преимущества. Хорошо зарекомендовали себя системы экспрессии на основе аскомицетов рода *Penicillium* [18]. Для некоторых из них были разработаны системы клонирования, которые позволили повысить активность продуцентов и существенно расширить спектр продуктов, получаемых на их основе. Так, ранее [19, 20] удалось успешно получить и охарактеризовать 4 рекомбинантных изофермента лакказы *T. hirsuta* LE-BIN072 (LacA, LacC, LacD и LacF) в аскомицете *Penicillium canescens*, причем на примере LacA было показано сходство нативного и рекомбинантного ферментов [21]. Таким образом, на основе изученной литературы и собственного опыта коллектива авторов, в качестве перспективного объекта для гетерологичной экспрессии ЛП *T. hirsuta* LE-BIN072 было предложено использовать аскомицеты рода *Penicillium*.

Цель работы – создание продуцента рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 гриба *T. hirsuta* LE-BIN 072 в штамме *Penicillium canescens* и оценка способности секретируемого ферментного комплекса нового штамма к модификации лигнина.

МЕТОДИКА

Материалы. Олигонуклеотиды были синтезированы в “Евроген” (Россия). Щелочной лигнин с низким содержанием сульфонатов приобретен у “Sigma-Aldrich” (США). Другие материалы и реактивы были приобретены у российских производителей, если не указано иное.

Штаммы и условия культивирования. В работе были использованы штамм базидиомицета *Trametes hirsuta* LE-BIN 072 из Коллекции культур Ботанического института им. В.Л. Комарова (Санкт-Петербург, Россия), штамм *Penicillium canescens* PCA10 (*niaD*⁻) [22] и штамм *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США).

Гриб *T. hirsuta* LE-BIN 072 выращивали глубинным способом на орбитальной качалке в колбах объемом 750 мл на глюкозо-пептонной (ГП) среде следующего состава (г/л): пептон – 3.0, глюкоза – 10, KH_2PO_4 – 0.6, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, CaCl_2 – 0.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.05, ZnSO_4 – 0.001, FeSO_4 – 0.0005, при 27°C, 180 об./мин в течение 10 сут. Культуральную жидкость (КЖ) отделяли центрифугированием, отбирали образцы мицелия для выделения ДНК и РНК.

Штамм-реципиент *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) культивировали 7 сут при 30°C в термостате на агаризованной среде (МС) следующего состава (г/л): NH_4Cl – 0.53, D-глюкоза – 10, агар – 2%, раствор минеральных солей – 20 мл/л. Раствор минеральных солей имел следующий состав (г/л): KCl – 26, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 26, KH_2PO_4 – 76, раствор микроэлементов – 50 мл/л. Раствор микроэлементов включал (мг/л): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 400, $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 800, $\text{B}_4\text{Na}_2\text{O}_7$ – 40.

Трансформанты *P. canescens* выращивали на агаризованной среде МС, в качестве источника азота использовали NaNO_3 . При глубинном культивировании штаммов *P. canescens* использовали жидкую ферментационную среду (ФС) следующего состава (г/л): свекловичный жом – 30, пептон – 50, KH_2PO_4 – 25, pH 4.5 [23]. Водной суспензией конидий (4×10^5 конидий/мл) засеивали 100 мл среды. Культивирование проводили на орбитальной качалке в колбах объемом 750 мл при 240–250 об./мин и 30°C в течение 7 сут.

Выделение ДНК и РНК. ДНК из мицелия *T. hirsuta* выделяли с помощью набора DNeasy

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность
POD17_For	5'-GCGAGGCCCAATCCCCTTA-3'
POD17_Rev	5'-CGGTCTGCTCGAACTTCTG-3'
BGASD	5'-CAAGCTGCTGAAGCTGAAGCTC-3'
BGASRS	5'-CTCATATTTACCCTGGCATGTCT-3'
VP2D	5'-TAGAAG ACCGGGCCACCTGCAGCG-3'
VP2DR	5'-TATCTCGAGTTAAGAGTTGAGGGGGCTAAAATCACA-3'
VP2RR	5'-TATCTCGAGTTAAGAGTTGAGGGGGATGGCC-3'

Plant Mini Kit (“Qiagen”, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для быстрого скрининга трансформантов ДНК *P. canescens* выделяли из споровой суспензии методом, описанным в работе [24]. Выделение РНК проводили с использованием реагента TRIzol Reagent (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно инструкции производителя. Количественно ДНК и РНК оценивали на приборе NanoDrop Lite (“Thermo Fisher Scientific”, США), качественно – электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. кДНК получали обратной транскрипцией с использованием обратной транскриптазы Maxima H Minus Reverse Transcriptase (“Thermo Fisher Scientific”, США) согласно рекомендациям производителя.

Конструирование экспрессионных плазмид. С помощью высокоточной ДНК-полимеразы Q5 (“NEB”, Англия) амплифицировали интронированные и сплайсированные последовательности фрагмента гена, кодирующие зрелую пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 (GenBank: ON230121.1), с геномной ДНК и кДНК в качестве матрицы соответственно. Использовали праймеры с введенными сайтами рестрикции: *BpiI* в районе отщепления сигнального пептида и *XhoI* после сайта терминации трансляции. Для амплификации интронированного фрагмента гена использовали праймеры VP2D и VP2DR, для сплайсированного – VP2D и VP2RR (последовательности праймеров представлены в табл.1; жирным шрифтом выделены сайты узнавания, подчеркнуты сайты отщепления). Полученные ДНК-фрагменты очищали от реакционной смеси с помощью набора Cleanup S-car (“Евроген”, Россия) и обрабатывали пятикратным избытком эндонуклеаз *BpiI* и *XhoI*. ДНК вектора pPCGMX также обрабатывали избытком эндонуклеаз *BspI20I* и *XhoI*, после чего ДНК разделяли в 0.8%-ном агарозном геле. Группу фрагментов размером около 6 т. п. н. элюировали из геля. Для элюирования и очистки амплифицированных фрагментов использовали набор Cleanup S-car (“Евроген”, Россия).

Обработанные эндонуклеазами ПЦР-фрагменты целевого гена и ДНК фрагмента вектора pPCGMX, несущего промотор гена *bgaS* с после-

довательностью, кодирующей сигнальный пептид гена *bgaS* и терминатор *bgaS*, смешивали в молярном соотношении 3 : 1 и обрабатывали T4 DNA Ligase (“Thermo Fisher Scientific”, США). Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* XL-10 Gold (“Stratagene”, США) для наработки генетического материала. Клетки наращивали с последующим выделением плазмидных ДНК с помощью набора Plasmid Miniprep Color (“Евроген”, Россия). Полученные плазмиды проверяли электрофорезом по подвижности в агарозном геле, а также проводили скрининг рестрикцией по сайтам *XhoI* и *BamHI* на присутствие фрагментов нужного размера. Проверку отобранных плазмид на правильность сборки и отсутствие ошибок в процессе ПЦР осуществляли секвенированием с использованием праймеров BGASD и BGASRS (табл.1).

Трансформация полученных конструкций в геном *P. canescens*. Плазмиды, несущие целевые последовательности вводили в геном мутантного по нитратредуктазе штамма *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻) путем котрансформации в протопласты [22] совместно с плазмидой pSTA10 [25], несущей комплементирующий ген нитратредуктазы (*niaD*) гриба *Aspergillus niger*. Трансформанты, высевали на селективную агаризованную среду следующего состава (г/л): сорбитол – 218.6; агар – 20; глюкоза – 8; раствор микроэлементов – 50 мл/л, а также 10 мМ нитрат натрия в качестве источника азота.

Проверку полученных трансформантов на наличие целевых вставок проводили амплификацией целевых фрагментов с ДНК, полученных из споровых суспензий с применением специфических праймеров POD17_For и POD17_Rev (табл. 1).

Оценка оксидазной активности (ОА). ОА оценивали экспресс-методом при росте трансформантов на агаризованной среде МС, содержащей 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)диаммониевую соль (АБТС) в качестве хромогенного субстрата (1.1 мг/мл). Трансформанты, образующие в процессе роста зеленое гало считались перспективными для дальнейшего анализа. ОА в КЖ определяли при выращивании

грибов на жидкой среде ФС спектрофотометрически на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 (“PerkinElmer”, США) при длине волны $\lambda = 436$ нм в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5, как описано в работе [19] с использованием раствора АБТС в качестве хромогенного субстрата в присутствии 0.1 мМ H_2O_2 . За 1 условную единицу активности принимали увеличение оптической плотности в 1 мл реакционной смеси за 1 мин.

Электрофорез белков. КЖ анализировали методом ДДС-электрофореза по методу Лэммли в 12%-ном полиакриламидном геле на приборе Mini Protean III (“Bio-Rad”, США) с окраской Кумасси бриллиантовым голубым R-250. В качестве стандарта использовали смеси белков Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (“Fermentas”, Литва) в диапазоне 10–200 кДа.

Масс-спектрометрический анализ белков. Полученные белковые пятна анализировали на масс-спектрометре Ultraflex II (“Bruker”, Германия) с матричной лазерной десорбцией/ионизацией на источнике и tandemным времяпролетным масс-анализатором (MALDI TOF/TOF MS/MS). Масс-спектры обрабатывали с помощью пакета программ FlexAnalysis 3.3 (“Bruker Daltonics”, Германия), идентификацию белков – с помощью программы Mascot (www.matrixscience.com). Полученные данные были сопоставлены с базой данных белков *T. hirsuta* LE-BIN 072 (GeneBank: PRJNA271118) [26] и NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Белки-кандидаты с показателем достоверности >76 в базе данных NCBI считались надежными ($p < 0.05$), белки с показателем достоверности >50 считались вероятными.

Биотрансформация щелочного лигнина. КЖ концентрировали ультрафильтрацией на мембране Vivaspin Turbo, 10K MWCO (“Sartorius”, Германия) в 10 раз.

Биотрансформацию проводили как описано в [6] с некоторыми модификациями. Раствор щелочного лигнина (“Sigma-Aldrich”, США) с концентрацией 2 г/л, pH 5.0, разливали по 1 мл в пластиковые пробирки объемом 5 мл. Затем добавляли равный объем концентрированной КЖ. В качестве контроля также готовили образцы, где вместо лигнина добавляли стерильную воду. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 144 ч с перемешиванием на ротационном смесителе ELMi Rotamix RM-1 (Латвия). Обесцвечивание лигнина отслеживали в ходе инкубирования на 24, 72 и 144 ч, измеряя поглощение при 465 нм на спектрофотометре PerkinElmer Lambda 35 [27]. Спектры снимали в диапазоне 200–700 нм сразу после добавления лигнина к КЖ, а также через 24 и 144 ч инкубации.

Все измерения проводили в 3 биологических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении достоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

Визуализацию плазмидных карт и подбор олигонуклеотидов осуществляли в программе Vector-NTI 10.1.1 (“Invitrogen”, США).

Для определения сайтов отщепления сигнального пептида пероксидазы использовали программное обеспечение SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-6.0>)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для создания продуцента рекомбинантной универсальной пероксидазы VP2 базидиомицета *T. hirsuta* LE-BIN072 в качестве реципиента был использован штамм мицелиального гриба *P. canescens* PCA-10 (*niaD*[−]). Этот штамм обладал следующими преимуществами: быстрый рост биомассы, наличие развитой системы биосинтеза внеклеточных ферментов, сильные промоторы, обеспечивающие высокую экспрессию целевых генов, наличие эффективного метода трансформации целевых плазмид для этого штамма, мутация в гене нитратредуктазы (*niaD*[−]) [28], позволяющая отбирать трансформанты на селективной среде, а также возможность получения целевого белка в активной форме [20, 21].

Создание плазмидных конструкций. Поскольку регулирование экспрессии белка в аскомицетах происходит в основном на уровне транскрипции, использование высокоактивных областей контроля транскрипции грибов имеет решающее значение при гетерологичной экспрессии. При создании плазмид использовали промотор гена *bgaS*, кодирующий β -галактозидазу гриба *P. canescens*, обеспечивающий гетерологичную экспрессию ферментов в клетках гриба с высоким выходом [23, 28]. Ген пероксидазы экспрессировали с использованием сигнальной последовательности гена *bgaS* β -галактозидазы *P. canescens*.

Плазмиды были созданы на основе вектора pPCGMX, содержащего полный ген *bgaS* секретрируемой β -галактозидазы *P. canescens*, имеющего уникальный сайт рестрикции *Bsp*120I в районе отщепления сигнального пептида и сайт *Xho*I перед терминатором транскрипции [29].

Интронированные и сплайсированные последовательности, кодирующие пероксидазу VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 (GenBank: ON230121.1) были амплифицированы, причем при амплификации в целевые последовательности вводили уникальные сайты рестрикции *Bpi*I и *Xho*I. Для этого олигонуклеотиды были выбраны так, чтобы при последующей состыковке целевых фрагментов с областью,

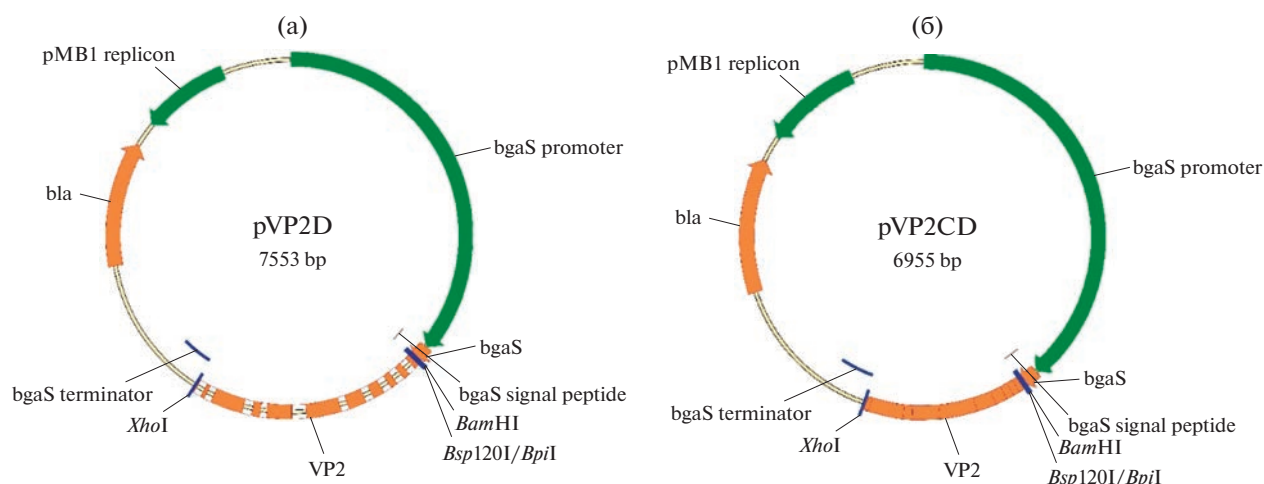


Рис. 1. Карты полученных плазмидных конструкций, несущих интронированную (а) и сплайсированную (б) кодирующие последовательности пероксидазы VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072.

кодирующей сигнальный пептид β -галактозидазы, сохранялась рамка считывания и аминокислотная последовательность в месте соединения. В результате слияния полученных целевых ПЦР-фрагментов с ДНК фрагмента вектора pPCGMX, несущего промотор гена *bgaS*, с последовательностью, кодирующей сигнальный пептид гена *bgaS* и терминатор *bgaS*, были получены целевые плазмиды. Проверка выделенных плазмид на правильность сборки рестрикцией и последующим секвенированием кодирующих областей пероксидазы позволила отобрать 2 плазмиды — pVP2D и pVP2CD, с правильной интронированной и сплайсированной кодирующей последовательностью соответственно. Карты отобранных плазмид представлены на рис. 1.

Отбор трансформантов. При трансформации полученных плазмид, несущих целевые последовательности пероксидазы, в геном *P. canescens* PCA-10 (*niaD*⁻), было получено не менее 100 трансформантов для каждой плазмиды. Для дальнейшего скрининга из них отбирали по 30 трансформантов для каждой плазмиды.

Выращивание отобранных трансформантов глубинным способом в среде ФС в течение 7 сут показало, что максимальная пероксидазная активность по АБТС в присутствии H₂O₂ (1 усл. ед./мл) была зафиксирована на 5–6 сут культивирования трансформантов. В качестве отрицательного контроля использовали КЖ реципиента. По 10 наиболее активных трансформантов-продуцентов рекомбинантной пероксидазы VP2 было выбрано для обоих штаммов (по 5 с плазмидой pVP2D и по 5 — с pVP2CD).

Для оптимизации процедуры подтверждения присутствия плазмид с целевыми вставками в отобранных трансформантах была проведена

ПЦР-амплификация целевых областей с использованием ДНК, выделенной экспресс-методом из спорных суспензий каждого трансформанта [24]. Применение этого метода позволило ускорить процесс отбора целевых клонов. Результат оценивали методом электрофореза по подвижности в агарозном геле и размеру полученных фрагментов (пример, рис. 2а). По результатам амплификации было выбрано 2 трансформанта-продуцента VP2 — *P. canescens* pVP2D-6 и *P. canescens* pVP2D-8.

Анализ КЖ трансформантов методом ДДС-электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2б) с последующей масс-спектрометрической идентификацией (MALDI TOF/TOF MS/MS) белков, обнаруженных в диапазоне 30–55 кДа позволил подтвердить наличие VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072 в КЖ отобранных трансформантов *P. canescens* pVP2D-6 и *P. canescens* pVP2D-8.

Необходимо отметить, что в настоящей работе при создании продуцента рекомбинантной VP2 успешнее оказалась конструкция с интронированной кодирующей целевой последовательностью. Подобный результат был показан Абяновой и соавт. [21] при получении рекомбинантной лакказы А *T. hirsuta* LE-BIN072 в этом же реципиенте. Таким образом, можно сделать вывод, что в выбранном штамме *P. canescens* происходит правильный сплайсинг интронов в полном гене VP2 пероксидазы, как и в случае гена *lacA* лакказы базидиального гриба *T. hirsuta*. Однако полученные результаты не исключают наличие особенностей посттрансляционных модификаций и секреции пероксидаз в *P. canescens*, оказывающих влияние на активность целевого фермента. Активность полученной КЖ по АБТС в присутствии H₂O₂ не превышала 1 усл. ед. /мл (рис. 3).

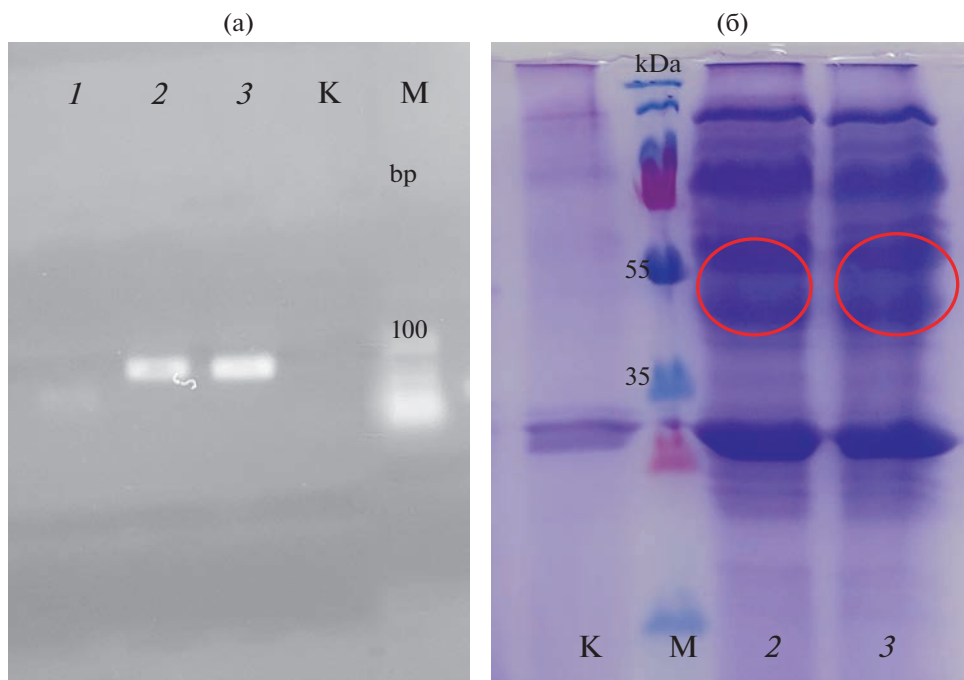


Рис. 2. Электрофорез в агарозном геле ПЦР-фрагментов, полученных в результате амплификации со специфическими праймерами (а); ДДС-электрофорез в ПААГ (б) КЖ *P. canescens* (красным отмечена область, в которой найдены фрагменты VP2): К - реципиент *P. canescens* PCA10 (*niaD*⁻) (отрицательный контроль), 1 – трансформант *P. canescens* pVP2D-3, 2 – *P. canescens* pVP2D-6, 3 – *P. canescens* pVP2D-8, М – маркеры молекулярной массы.

Таким образом, использованную экспрессионную систему можно считать достаточно эффективной с точки зрения получения секретируемого рекомбинантного изофермента пероксидазы VP2. Однако требуются дополнительные эксперименты по оптимизации условий культивирования с целью повышения активности и количества секретируемого белка. В дальнейшей работе использовали штамм *P. canescens* pVP2D-6 как более активный.

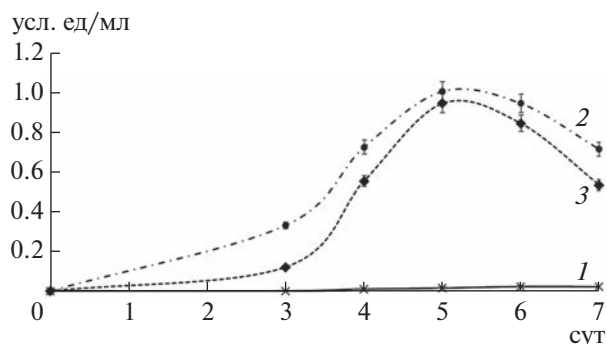


Рис. 3. Динамика активности пероксидазы (по АБТС в присутствии H_2O_2) у отобранных рекомбинантных штаммов: 1 – реципиент *P. canescens* PCA10 (*niaD*⁻) (отрицательный контроль), 2 – трансформант *P. canescens* pVP2D-6, 3 – трансформант *P. canescens* pVP2D-8.

Биотрансформация щелочного лигнина. Поскольку пероксидазам отводят ведущую роль в процессе деструкции лигнина [6, 30], была проведена оценка способности секретируемых ферментов нового штамма *P. canescens* pVP2D-6, включающих пероксидазу VP2 *T. hirsuta*, к модификации щелочного лигнина.

Структура лигнина включает мономерные звенья трех типов – *n*-гидроксифенильные (H-звенья), гваяцильные (G-звенья), и сирингильные (S-звенья), сшитые различными кислород- и углерод-углеродными связями [31]. Хромофорные функциональные группы, содержащиеся в лигнине, включая хиноны и метоксизамещенные фенокси-группы, могут быть сопряжены с двойными связями или карбонильными функциональными группами. Ненасыщенные функциональные группы поглощают видимый свет и придают лигнину коричневый цвет [32]. Обесцвечивание лигнина предполагает его трансформацию [33].

В настоящей работе к концентрированной КЖ, полученной после выращивания нового штамма *P. canescens* pVP2D-6, добавляли раствор лигнина в соотношении 1 : 1 и инкубировали в течение 144 ч. Концентрация лигнина в реакционной смеси составила 1 г/л, при этом реакционная смесь имела насыщенный желто-коричневый цвет (рис. 4, 1). По мере увеличения времени инкубирования наблюдалось обесцвечивание реакционной смеси

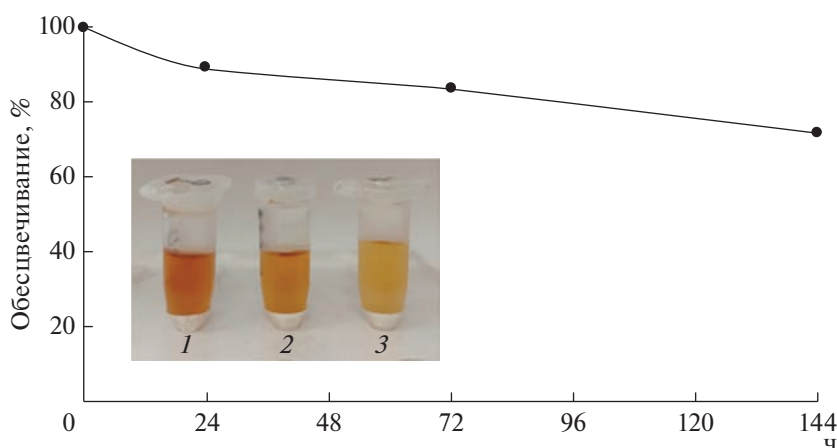


Рис. 4. Обесцвечивание щелочного лигнина в КЖ гриба *P. canescens* pVP2D-8: 1 — исследуемый образец лигнина сразу после добавления концентрата КЖ, 2 — через 24 ч инкубирования, 3 — через 144 ч инкубирования.

(рис. 4 2, 3), которое не наблюдали в контрольном образце (с КЖ реципиента). Уже за сутки происходило обесцвечивание реакционной смеси на 11%, а через 144 ч — на 28% по сравнению с исходным.

Известно, что для различных типов лигнина характерно наличие локального максимума в УФ-спектре поглощения при 280 нм [31]. Изменение поглощения при 280 нм при биотрансформации лигнина, в частности мицелиальными грибами, считается показателем его модификации. Ранее Лара с соавт. [33] показали уменьшение интенсивности поглощения при длине волны 280 нм (гипохромный эффект) в процессе инкубирования синтетического черного щелока, содержание лигнина в котором может составлять до 40%, с мицелием *Trametes elegans* в течение 15 сут, объяснив это “изменениями в молекулах за счет лигнинолитических реакций”.

В настоящем исследовании при увеличении времени инкубации исследуемых образцов с КЖ штамма *P. canescens* pVP2D-6 наблюдалось некоторое изменение поглощения в диапазоне 260–500 нм (рис. 5), однако, несмотря на видимое обесцвечивание реакционной смеси, в спектре при 280 нм вместо ожидаемого уменьшения через 24 ч наблюдалось незначительное увеличение оптической плотности, которое сохранялось до конца инкубации (144 ч). Аналогичные эффекты наблюдали при окислении катехина и кверцетина (полифенольных соединений из группы флавоноидов) рекомбинантной универсальной пероксидазой TvVP2 базидиомицета *Trametes versicolor* [34]. Авторы показали, что инкубация этих флавоноидов с пероксидазой TvVP2 в присутствии пероксида водорода приводила к значительным изменениям оптического спектра. В случае катехина наблюдали значительное увеличение ОП около 400 нм, что свидетельствовало об образовании хи-

нонов, а в случае кверцетина — уменьшение пика при 370 нм и небольшое увеличение поглощения ~290 нм. Последнее, по мнению авторов, могло соответствовать продукции 3,4-дигидроксibenзойной (протокатеховой) кислоты.

Известно, что универсальные пероксидазы грибов белой гнили способны напрямую окислять фенольные и нефенольные структурные единицы лигнина с образованием катион-радикалов, которые затем могут, как подвергаться серии неферментативных реакций, включая расщепление С–С и С–О-связей, так и сочетаться между собой в случайном порядке, приводя к реполимеризации лигнина [11, 30, 35].

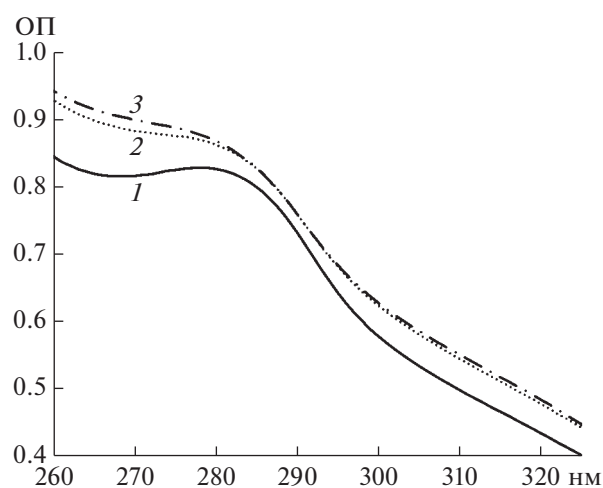


Рис. 5. УФ-спектры поглощения исследуемых образцов в диапазоне 260–320 нм: 1 — исследуемый образец лигнина сразу после добавления концентрата КЖ, 2 — через 24 ч инкубирования, 3 — через 144 ч инкубирования.

В работе [11] авторами было показано, что универсальная пероксидаза базидиомицета *Pleurotus ostreatus* способна расщеплять наиболее частые межзвенные связи в лигнине (β -О-4'), приводя тем самым к деполимеризации лигнина и высвобождению фенольных соединений. Образующиеся при биотрансформации лигнина промежуточные фенольные соединения, такие как ванилин, синаповая кислота, конифериловый спирт и др. [36], могут вносить вклад в интенсивность поглощения реакционной смеси при 280 нм.

В работе [35] было показано, что атака универсальной пероксидазы базидиомицета *P. eryngii* (VPL2, GenBank: AF007222) начинается с наиболее легко окисляемых фенольных фрагментов лигнина, а метилированный и ацетилованный лигнин значительно хуже окислялись ферментом. При этом VP *P. eryngii* была способна модифицировать также и нефенольный лигнин, но значительно хуже, чем содержащий фенольные структуры. Кроме того, VP *P. eryngii* проявляла более высокое сродство в отношении полимерного лигнина, чем к простым ароматическим соединениям [35]. Действительно, ранее было показано, что секрета лигнолитических пероксидаз в процессе роста гриба *T. hirsuta* в среде с добавлением лигнина менялась волнообразно [37]. При этом универсальная пероксидаза VP2 начинала секретироваться на более ранних сроках культивирования и уже на 3–6 сут хорошо детектировалась в культуральной среде. Далее по мере трансформации лигнина в секретоме гриба детектировались и другие лигнолитические пероксидазы (разные изоферменты марганец-пероксидаз).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволили сделать вывод, что рекомбинантная универсальная пероксидаза VP2 гриба белой гнили *T. hirsuta* модифицировала структурные звенья щелочного лигнина, о чем свидетельствовало обесцвечивание реакционной смеси. Однако этот фермент, по всей видимости, подобно универсальной пероксидазе VP базидиомицета *P. eryngii*, окислял в первую очередь фенольные фрагменты лигнина.

Полученный в работе новый штамм *P. canescens* pVP2D-6 – продуцент рекомбинантной лигнолитической пероксидазы VP2 базидиомицета *T. hirsuta* LE-BIN072, планируется использовать для выделения целевого изофермента VP2 и изучения его свойств, что в дальнейшем может помочь более детально установить механизм биоразложения лигнина грибами белой гнили *Trametes* sp., тем самым открыть новые перспективы для направленного применения ферментов лигнолитического комплекса грибов, в частности пероксидаз.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования

“Промышленные биотехнологии” Федерального государственного учреждения “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-74-00078, <https://rscf.ru/project/22-74-00078>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ponnusamy V.K., Nguyen D.D., Dharmaraja J., Shobana S., Banu J.R., Saratale R.G. et al. // *Bioresour. Technol.* 2019. V. 271. P. 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.070>
2. Biko O. D.V., Viljoen-Bloom M., van Zyl W. H. // *Enzyme Microb. Technol.* 2021. V. 141, 109669. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109669>
3. Kainthola J., Podder A., Fechner M., Goel R. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 321. 124397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124397>
4. Abbas A., Koc H., Liu F., Tien M. // *Curr Genet.* 2005. V. 47. P. 49–56. <https://doi.org/10.1007/s00294-004-0550-4>
5. Dashtban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. // *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 1. P. 36–50.
6. Zhang S., Xiao J., Wang G., Chen G. // *Bioresour. Technol.* 2020. V. 304. 122975. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122975>
7. Liers C., Aranda E., Strittmatter E., Piontek K., Plattner D.A., Zorn H. et al. // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2014. V. 103. P. 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.09.025>
8. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Zhrebker A.Ya., Kulikova N.A. et al. // *Bioresour. Technol.* 2021. V. 335. 125229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125229>
9. Vasina D.V., Moiseenko K.V., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V. // *PLoS ONE.* 2017. V. 12. № 3. e0173813. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173813>
10. Savinova O.S., Shabaev A.V., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Fedorova T.V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. Suppl. 1. P. S113–S125.
11. Fernández-Fueyo E., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez M.J., Romero A., Hammel K.E., Medrano F.J., Martínez A.T. // *Biotechnol. Biofuels.* 2014. V. 7. № 2. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-2>
12. Ruiz-Duenas F.J., Morales M., Garcia E., Miki Y., Martinez M.J., Martinez A.T. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. № 2. P. 441–452. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern261>
13. Rodakiewicz-Nowak J., Jarosz-Wilkolazka A., Luterek J. // *Applied Catalysis A: General.* 2006. V. 308. P. 56–61.
14. Perez-Boada M., Doyle W.A., Ruiz-Duenas F.J., Martinez M.J., Martinez A.T. // *Enzyme Microb. Technol.* 2002. V. 30. P. 518–524.
15. Majeke B.M., Garcia-Aparicio M., Biko O.D., Viljoen-Bloom M., van Zyl W.H., Görgens J.F. // *Enzyme Microb. Technol.* 2020. V. 139. 109593. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109593>
16. Stewart P., Whitwam R. E., Kersten P. J., Cullen D., Tien M. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 3. P. 860–864. <https://doi.org/10.1128/aem.62.3.860-864.1996>

17. Sugano Y., Nakano R., Sasaki K., Shoda M. // Physiology and Biotechnology. 2000. V. 66. № 4. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1754-1758.2000>
18. Chekushina A.V., Dotsenko G.S., Sinitsyn A.P. // Catalysis in Industry. 2013. V. 5 № 1. P. 98–104. <https://doi.org/10.1134/S2070050413010042>
19. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Biochimie. 2017. V. 142. P. 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.013>
20. Savinova O.S., Moiseenko K.V., Vavilova E.A., Chulkin A.M., Fedorova T.V., Tyazhelova T.V., Vasina D.V. // Front. Microbiol. 2019. V. 10. 152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00152>
21. Abyanova A.R., Chulkin A.M., Vavilova E.A., Fedorova T.V., Loginov D.S., Koroleva O.V., Benevolensky S.V. // Appl. Biochem. Microbiol. 2010. V. 46. № 3. P. 313–317.
22. Aleksenko A.Y., Makarova N.A., Nikolaev I.V., Clutterbuck A.J. // Curr. Genet. 1995. V. 28. P. 474–478.
23. Чулкин А.М., Логинов Д.С., Вавилова Е.А., Абьянова А.Р., Зоров И.Н., Курзеев С.А., Королева О.В., Беневоленский С.В. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 2. С. 163–170.
24. Fraczek M.G., Zhao C., Dineen L., Lebedinec R., Bowyer P., Bromley D., Delneri M. Current Protocols in Microbiology. 2019. V. 54. e89. <https://doi.org/10.1002/cpmc.89>
25. Unkles S.E., Campbell E.I., Punt P.J., Hawker K.L., Contreras R., Hawkins A.R. et al. // Gene. 1992. V. 111. № 2. P. 149–155.
26. Shabaev A.V., Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Fedorova T.V. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 10322. <https://doi.org/10.3390/ijms231810322>
27. Лисов А.В., Заварзина А.Г., Белова О.В., Леонтьевский А.А. // Микробиология. 2020. Т. 89. № 3. С. 300–307. <https://doi.org/10.31857/S0026365620030118>
28. Sinitsyn A.P., Rozhkova A.M. Microorganisms in Biorefineries. *Penicillium canescens* Host as the Platform for Development of a New Recombinant Strain Producers of Carbohydrases. / Ed. B. Kamm Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2015. V. 26. P. 1–19.
29. Королева О.В., Федорова Т.В., Беневоленский С.В., Вавилова Е.А., Чулкин А.М. // Патент РФ. 2015. № 2538149.
30. Айзеништадт М.А., Боголицын К.Г. // Химия растительного сырья. 2009. № 2. С. 5–18.
31. Ruwoldt J., Tanase-Opedal M., Syverud K. // ACS Omega. 2022. V. 7. P. 46371–46383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04982>
32. Sadeghifar H., Ragauskas A. // Polymers. 2020. V. 12. № 5. P. 1134. <https://doi.org/10.3390/polym12051134>
33. Lara M.A., Rodriguez-Malaver A.J., Rojas O.J., Holmquist O., Gonzalez A.M., Bullon J., Penaloza N., Araujo E. // International Biodeterioration & Biodegradation. 2003. V. 52. P. 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00055-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00055-6)
34. Amara S., Perrot T., Navarro D., Deroy A., Benkhelfallah A., Chalak A. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2018. V. 84. e02826-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02826-17>
35. Sáez-Jiménez V., Rencoret J., Rodríguez-Carvajal M.A., Gutiérrez A., Ruiz-Dueñas F.J., Martínez A.T. // Biotechnol Biofuels. 2016. V. 9. P. 198. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0615-x>
36. Silva D., Sousa A.C., Robalo M.P., Martins L.O. // New Biotechnology. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.12.003>
37. Moiseenko K.V., Glazunova O.A., Savinova O.S., Vasina D.V., Zhrebker A.Ya., Kulikova N.A., Nikolaev E.N., Fedorova T.V. // Bioresour. Technol. 2021. V. 335. 125229. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125229>

The Obtaining of Recombinant Producer of *Trametes hirsuta* Versatile Peroxidase VP2 in *Penicillium canescens*

O. S. Savinova^a, *, A. M. Chulkin^a, K. V. Moiseenko^a, and T. V. Fedorova^a

^a Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: savinova_os@rambler.ru

The interest in peroxidases of the basidiomycetes secreted enzyme complex is due to their wide substrate specificity and the ability of these enzymes to participate in the biodegradation of such difficultly degradable biopolymers as lignin. However, due to the difficulty of isolating these enzymes from native sources, their study is difficult. In this work, expression vectors were created that carried the sequence encoding the *T. hirsuta* LE-BIN072 versatile peroxidase VP2, which was transformed into the genome of the *P. canescens* strain. Screening of transformants showed the presence of peroxidase activity up to 1 U/mL. Fragments of the target protein in the culture liquid of the selected transformants were identified by mass spectrometric analysis. A new strain of *P. canescens* pVP2D-6, a producer of the recombinant universal peroxidase VP2 *T. hirsuta* LE-BIN072, was obtained for the first time, and the ability of the enzyme complex secreted by it to modify alkaline lignin was shown.

Keywords: peroxidase, lignolytic enzymes, *Trametes hirsuta*, *Penicillium canescens*, heterologous expression, lignin

УДК 577.112.083

НОВЫЙ Ni^{2+} -АФФИННЫЙ ВАРИАНТ eGFP СО СВОБОДНЫМИ С- И N-КОНЦАМИ

© 2023 г. А. Г. Тарабарова¹, *, М. С. Юркова¹, А. Н. Федоров¹

¹ Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии”
Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tarabarovan@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Работа посвящена получению зеленого флуоресцентного белка eGFP с Гис-меткой, введенной в состав полипептидной цепи. В результате получен белок eGFP157_7Н со встроенной Гис-меткой и свободными N- и С-концами для последующего получения слитых белков. Добавленная Гис-метка позволит проводить очистку конструкций с eGFP методом металл-хелатной аффинной хроматографии в нативных условиях. Полученный вариант eGFP157_7Н сохранил флуоресцентные свойства полностью соответствующими исходному варианту eGFP.

Ключевые слова: eGFP, Гис-метка, металл-аффинная очистка eGFP

DOI: 10.31857/S0555109923060193, **EDN:** CXYUQZ

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) широко используется в качестве референсного белка благодаря своим флуоресцентным свойствам. Фьюжн-конструкции с участием GFP создают для отслеживания местоположения исследуемого белка в клетке [1–3], внутриклеточного значения pH [4] и изучения белок-белковых [5, 6] и РНК-белковых взаимодействий [7]. В настоящее время белок широко используется в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии для изучения экспрессии клеточных белков. Разработаны модификации белка для применения в биосенсорах.

Однако GFP, в отличие от других успешно используемых белков-лидеров в слитых конструкциях, таких, как полипептидные последовательности A, Z, ABP, GST, поли-His, MBP, FLAG, Pim-Point [8], не является аффинной меткой, в связи с чем очистка конструкций с участием GFP может представлять существенные затруднения. Одно из решений задачи выделения рекомбинантных белков заключается в присоединении к ним какой-либо аффинной метки, из которых наиболее употребимой является метка из нескольких остатков гистидина [9]. Полигистидиновая метка способна взаимодействовать с ионами двухвалентных металлов Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} [10], что придает белку аффинность к смоле с иммобилизованными ионами двухвалентных металлов, например, Ni^{2+} . Преимущество использования металл-хелатной аффинной хроматографии за-

ключается в небольших размерах самих пептидов, придающих сродство к ионам металлов, а также в том, что данный вид аффинной хроматографии проводится в мягких физиологических условиях, что особенно важно при работе с белками.

В уже ставшем классическим подходе использования гистидиновых меток рассматривается присоединение шести или более расположенных подряд остатков гистидина к N- или С-концу белка: для этих случаев эмпирически подобранным оптимальным вариантом является метка 6Н [11]. Увеличение числа остатков гистидина может приводить к незначительному снижению равновесной K_D , но не к ее повышению, а вот уменьшение числа остатков приводит к значительному снижению сродства к Ni^{2+} [11].

Включение Гис-метки в составе полипептидной цепи белка позволит использовать такой белок абсолютно так же, как и его исходный вариант, то есть сохранив возможность присоединять белки как к N-, так и С-концу фьюжн-партнера, и при этом полностью использовать свойства аффинной метки, избегая стерических затруднений.

Новая стратегия использования Гис-меток в составе полипептидной цепи чаще всего применяется для очистки и концентрации вирусных векторов с целью их дальнейшего использования при вакцинации или же генной терапии [12]. Примером может служить встраивание гексагистидиновой (6Н) метки, экспонированной на поверхности капсида, в капсидный белок gp64 баку-

ловируса [13] или вируса простого герпеса 1-го типа [14], который используют для разработки терапии заболеваний нервной системы. Аналогичный подход также использовали для белков капсида вируса ящура [15], ретровируса [16], вируса гриппа типа А [17] и лентивирусных векторов [18], сенекавируса [19].

Включение Гис-метки в состав полипептидной цепи возможно не только для капсидных белков вирусных векторов, но и для белков с иными функциями. Например, в работе [20] описывается вариант модификации белка путем включения 6Н метки внутрь петли термосомы организма *T. Acidophilum*. Метка не только не нарушила структуру белка, но и способствовала его выделению при помощи металл-аффинной хроматографии.

Таким образом, 6Н метка — это универсальный инструмент, который можно использовать на разных белках и для решения различных задач: от выделения и очистки белка до его детектирования *in vitro* и *in vivo*. Однако в некоторых случаях использование 6Н метки как на С- или N-конце, так и при встраивании в полипептидную цепь, влияет на структуру или функции модифицированного белка. Таким образом, выбор места введения метки, а также конфигурации самой метки, может иметь решающее значение для функционирования полученной конструкции.

Цель работы — разработка варианта GFP, получившего аффинность к металл-хелатной смоле и при этом сохранившего свободные N- и С-концы, а также функцию флуоресценции.

МЕТОДИКА

Введение Гис-метки. Для получения плазмиды pET15b_eGFP в качестве матрицы для клонирования гена eGFP использовали плазмиду eGFP-N1. Клонирование гена осуществляли методом ПЦР с использованием ДНК-полимеразы Q5 (“NEB”, Великобритания) на амплификаторе C1000 Touch (“Bio-Rad”, США) по стандартному протоколу со следующими праймерами (“Евроген”, Россия): NcoI_eGFP_IG: 5'TTTTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGG3'; BamHI_eGFP_IG: 5'TTTTGTGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG3'.

Полученный ген клонировали в экспрессионный вектор pET15b по сайтам NcoI и BamHI. Реакции рестрикции и лигирования проводили по инструкциям стандартных протоколов.

Для получения плазмид pET15b_eGFP157_3H3G3H и pET15b_eGFP157_7H использовали метод сайт-направленного мутагенеза с некоторыми изменениями [10]. Для внесения вставок использовали следующие праймеры (Евроген, Россия): для внесения вставки 3H3G3H прямой F_gfp157_3H3G3H: 5'CATGGCCGACAAGCAGCATCATCATGGTGGTGGTTCATCA-

TCATAAGAACGGCATCAAGG3' и обратный R_gfp157_3H3G3H: 5'CCTTGATGCCGTTCTTATGATGATGACCACCACCATGATGATGCTGCTTGTCCGCCATG3'; для внесения вставки 7H прямой F_gfp157_7H: 5'CATGGCCGACAAGCAGCATCATCATCATCATCATCACAAGAACGGCATCAAGG3' и обратный R_gfp157_7H: 5'CCTTGATGCCGTTCTTGTGATGATGATGATGATGATGCTGCTTGTCCGCCATG3'.

В отличие от классического протокола сайт-направленного мутагенеза, в стандартную реакционную смесь для ПЦР с Q5 ДНК-полимеразой добавляли один из праймеров, либо F_gfp_157, либо R_gfp_157. В качестве матрицы использовали 100 нг плазмиды pET15b_eGFP. Температура отжига для F_gfp_157 составила 65°C, а для R_gfp_157 — 72°C.

После ПЦР реакционные смеси с праймерами F_gfp_157 и R_gfp_157 объединяли в соотношении 1 : 1 и проводили денатурацию и отжиг комплементарных цепей ДНК.

Для удаления матричной ДНК полученную смесь плазмид обрабатывали ферментом DpnI (ThermoFisher, США) по стандартному протоколу при 37°C в течение 16 ч. Полученной плазмидной ДНК трансформировали приготовленные по стандартному протоколу Ca²⁺-компетентные клетки DH5α и далее отбирали положительные клоны стандартным методом ПЦР с колоний.

Последовательность полученных конструкций была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера (“Евроген”, Россия).

Экспрессия генов целевых белков. Для получения целевых белков использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7 в бактериях *E. coli* штамма ArcticExpress(DE3) (“Agilent”, США). Для этого одиночный клон с чашки Петри инокулировали в питательную среду LB объемом 5 мл с антибиотиками ампициллином (100 мкг/мл) и гентамицином (20 мкг/мл). Клетки оставляли расти в шейкерах-инкубаторах при 37°C со скоростью перемешивания в 250 об./мин в течение 16 ч. Полученную ночную культуру инокулировали в соотношении 1 : 100 в 500 мл среды ТВ, содержащей те же антибиотики, и инкубировали при 37°C и 250 об./мин в течение 3 ч до достижения оптической плотности (λ 600) 0.6–0.8 о.е./мл. Далее вносили индуктор экспрессии ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ, после чего понижали температуру инкубации до 10°C и продолжали культивирование в течение 24 ч, а затем температуру понижали до 4°C и инкубировали культуру еще 12 ч. После завершения культивирования клетки отделяли от жидкой среды центрифугированием при 1500 g и 4°C в течение 20 мин.

Уровень продукции целевых белков оценивали, проводя электрофорез в 12.5%-ном ПААГ в денатурирующих условиях в присутствии доде-

цил-сульфата натрия (ДДС-Na). Полученную биомассу замораживали и хранили при -20°C .

Выделение и очистка целевых белков. Биомассу штамма-продуцента ресуспендировали в 50 мМ натрий-фосфатного буфера pH 7.5 с добавлением 1 мМ фенилметилсульфонил фторида, ингибитора сериновых протеаз, и разрушали ультразвуковым дезинтергратором Q500 Sonicator® на льду. Далее супернатант отделяли от дебриса центрифугированием при 9800 g в течение 30 мин при 4°C .

Хроматографическую очистку целевых белков из супернатанта проводили в несколько этапов. Очистку eGFP проводили на 1 мл колонке с анионообменной смолой HiTrap Q-сефарозой в 50 мМ натрий-фосфатном буфере pH 7.5. Элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 500 мМ на первом этапе и от 100 до 500 мМ при рехромаатографии.

При очистке конструкторов eGFP157_3H3G3H и eGFP157_7H первую хроматографию проводили на той же смоле в тех же условиях. Элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 500 мМ. Вторую хроматографию проводили на металл-аффинной смоле HisTrap HP в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.5, с 100 мМ NaCl. Колонку со связавшимся белком промывали 1 М NaCl в том же буфере. Элюировали белки линейным градиентом имидазола от 20 до 500 мМ.

Для перевода белка в другой буфер перед следующим этапом очистки или же для дальнейших исследований использовали диализ. Фракции, содержавшие целевой белок, объединяли и концентрировали при помощи металл-хелатной смолы с ионами Ni^{2+} .

Наличие примесей нуклеиновых кислот в белковых препаратах контролировали спектрофотометрически при длине волны 260 нм.

Установление времени удерживания на смоле. Для определения времени удерживания белков eGFP157_7H и eGFP157_3H3G3H на смоле хроматографические фракции исследовали при помощи электрофоретического разделения в денатурирующих условиях в присутствии ДДС-Na. Для фракции с наибольшим содержанием целевого белка рассчитывали время от начала элюции до времени выхода половины этой фракции. Для этих же фракций устанавливали концентрацию имидазола, при которой происходит элюция. Характеристика колонки и потока: 1 мл, "HisTrap HP" ("Cytiva", Германия), скорость потока 0.5 мл/мин, объем фракции 0.5 мл, градиент от 0 до 300 мМ имидазола в объеме, равном 15 объемам колонки. Буфер А: 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4, 250 мМ NaCl, буфер Б: 500 мМ имидазола, 20 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7.4, 250 мМ NaCl.

Определение концентрации белка. Концентрацию белка определяли методом денситометрии

электрофореграмм с помощью программного обеспечения "OnedScan" (Stratagene, США). В качестве стандарта использовали известные концентрации бычьего сывороточного альбумина.

Спектроскопия кругового дихроизма (КД). Исследование вторичной структуры белков проводили с использованием спектроскопии КД на спектрополяриметре "Chirascan" ("Applied Photophysics", Великобритания) в диапазонах длин волн от 180 до 260 нм. Значения молярной эллиптичности $[\theta]$ рассчитывали из уравнения:

$$[\theta] = [\theta]_{\text{изм}} M_{\text{ост}} - LC,$$

в котором $[\theta]_{\text{изм}}$ — измеренная эллиптичность (градусы) и $M_{\text{ост}}$ — средняя молекулярная масса остатка пептида (Да), рассчитанная из его аминокислотной последовательности, L — длина оптического пути кюветы (мм), C — концентрация белка (мг/мл). Измерения проводили в 0.1 мм кювете при концентрации белка 0.2–0.3 мг/мл в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.5. Полученные значения молярной эллиптичности относительно длины волны анализировали при помощи программного обеспечения DichroWeb [21], чтобы определить количественный состав элементов вторичной структуры белков.

Для сравнения формы спектров делали их нормализацию по минимальным значениям на длине волны 222 нм для белка со спиральными элементами и 218 нм для белка с β -слоями. Полученные формы спектров сравнивали со спектром eGFP исходного типа, который был предсказан по родственной структуре PDB: 6YLQ в программе PDBMD2CD [9].

Измерение спектров эмиссии, вычисление молярного коэффициента экстинкции, квантового выхода флуоресценции и яркости eGFP. Снятие спектров эмиссии флуоресценции выделенных белков eGFP, eGFP157_3H3G3H, eGFP157_7H проводили с использованием спектрофлуориметра "FluoroMax-4" ("Horiba", Япония) в Центре коллективного пользования ФИЦ Биотехнологии РАН. Длина волны возбуждения — 488 нм, размер щели — 5 нм. Спектр эмиссии снимали от 480 до 650 нм при длине волны возбуждения 488 нм. Спектр возбуждения снимали от 380 до 500 нм, при длине волны эмиссии 510 нм. Для сравнения форм спектров пересчитывали полученные значения в относительные единицы.

Для вычисления молярного коэффициента экстинкции хромофора нативного GFP использовали методику, описанную в статье [20].

По полученным значениям молярной концентрации и поглощению нативного белка на длине волны 488 нм построили график зависимости поглощения от молярной концентрации, умноженной на длину оптического пути. Для нахождения молярного коэффициента экстинкции вычисля-

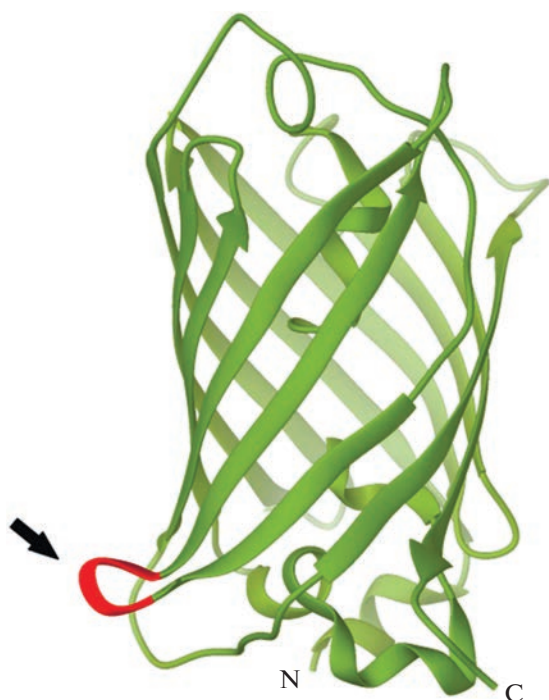


Рис. 1. Положение Гис-меток в исходном варианте eGFP (PDB: 6YLQ). Визуализация пространственной структуры белка в программе UCSF Chimera [31]. Стрелкой показано и выделено красным цветом место вставки Гис-меток между 157Q и 158K.

ли наклон прямой, полученной методом линейной аппроксимации с величиной достоверности >0.9 .

Вычисление относительного квантового выхода флуоресценции проводили по флуоресцеин-йодацетамиду, квантовый выход которого 0.5 ед. Для этого получали спектр поглощения каждого белка при длине волны 488 нм и считали значение площади под кривой. По зависимости значений площади под кривой спектра эмиссии от поглощения на длине волны 488 нм для белков и флуоресцеин-йодацетамида получили наклон прямой, полученной методом линейной аппроксимации с величиной достоверности >0.9 . Полученные результаты сравнили относительно вещества с известным квантовым выходом и по простой пропорции рассчитали относительный квантовый выход флуоресценции для всех вариантов eGFP.

Вычисление яркости флуоресцентных белков проводили по формуле:

$$B = \frac{QYCE}{1000},$$

где B — значение яркости; QY — относительный квантовый выход; CE — молярный коэффициент экстинкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Место для введения полигистидиновой метки между аминокислотными остатками № 157 и 158 (рис. 1) было выбрано с учетом известных литературных данных о влиянии мутаций на eGFP [25–30] и с учетом анализа опубликованной структуры eGFP (PDB: 6YLQ).

Для встраивания в полипептидную цепь были выбраны и протестированы два варианта Гис-меток: каноническая последовательность из последовательно расположенных остатков гистидина (7Н) и предложенная в настоящей работе неканоническая последовательность, в которой остатки гистидина чередуются с остатками глицина (Н–Н–Н–G–G–G–Н–Н–Н или 3Н3G3Н).

Каноническая последовательность из остатков гистидина обладает определенной степенью ригидности, что может влиять на фолдинг белка при встраивании такой метки именно внутрь полипептидной цепи. Аминокислотные остатки глицина обладают большой конформационной подвижностью, из-за чего они обычно встречаются в начале или конце спиральных элементов вторичной структуры, а также внутри неструктурированных элементов [30]. Введение остатков глицина в состав Гис-метки должно увеличить общую конформационную подвижность предлагаемой неканонической Гис-метки, что может позволить использовать ее внутри петель или поворотов полипептидной цепи без значительного влияния на общую укладку белка, поэтому триплеты из остатков гистидина были разделены остатками глицина.

Создание соответствующих генетических конструкций было проведено с помощью стандартных методов молекулярной биологии (см. Методика), идентичность полученных конструкторов была подтверждена секвенированием. Экспрессию гена исходного eGFP и его вариантов с введенными Гис-метками проводили в экспрессионном штамме *E. coli* ArcticExpress (DE3) при пониженной температуре, чтобы избежать образования телец включения. По окончании экспрессии клетки были лизированы. Распределение целевых белков между растворимой и нерастворимой фракциями было проанализировано методом электрофоретического разделения белков (рис. 2). Формирования телец включения белком eGFP и eGFP с метками 7Н или 3Н3G3Н между 157 и 158 аминокислотными остатками обнаружено не было.

Полученные в растворимой форме целевые белки были очищены хроматографическими методами (см. Методика) и использованы в дальнейшей работе.

Подтверждение взаимодействия Гис-меченных вариантов eGFP с иммобилизованными ионами Ni^{2+} было проведено измерением времени удерживания белков на Ni^{2+} -смоле при одина-

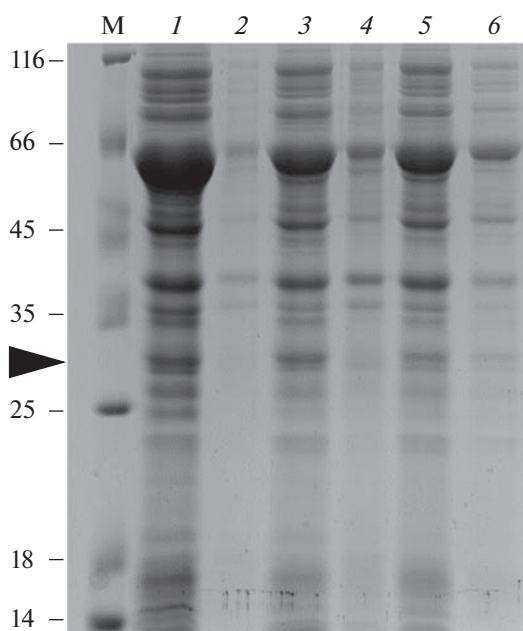


Рис. 2. Электрофореграмма распределения вариантов eGFP между растворимой и нерастворимой фракциями в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na: М – маркер молекулярного веса белков; 1, 3, 5 – супернатант, 2, 4, 6 – осадок; 1 и 2 – eGFP; 3, 4 – eGFP157_3H3G3H; 5, 6 – eGFP157_7H; стрелка указывает положение целевого белка.

ковых условиях проведения хроматографии и в диапазоне концентрации имидазола, необходимой для элюции белка. Факт взаимодействия белка со встроенной в полипептидную цепь Гис-меткой с Ni^{2+} -смолой позволил утверждать, что метка действительно экспонирована к растворителю, а также что нет стерических затруднений между взаимодействием имидазольных радикалов остатков гистидина с иммобилизованным Ni^{2+} . С практической точки зрения, более прочное взаимодействие с металл-аффинной смолой повышает качество хроматографической очистки белка, однако слабые взаимодействия все же позволяют использовать Ni^{2+} -смолу как этап концентрирования белка.

Электрофоретический анализ фракций, полученных в результате элюции конструций eGFP со встроенными Гис-метками (рис. 3) показал, что оба белка способны связываться с Ni^{2+} -содержащей смолой. Однако, в зависимости от олигои-

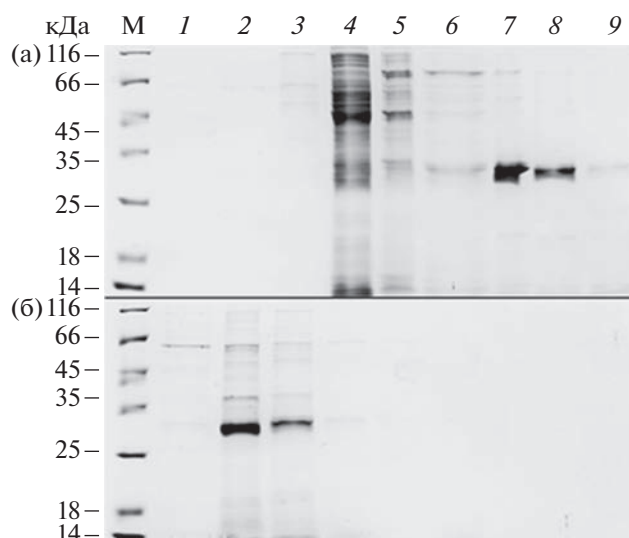


Рис. 3. Электрофореграмма профилей элюции eGFP157_7H (а) и eGFP157_3H3G3H (б) в 12%-ном ПААГ в присутствии ДДС-Na: М – маркер молекулярного веса белков; 1–9 – фракции профиля элюции белка.

стидиновой метки, белки проявляли различную способность удерживаться на аффинной смоле.

Время удерживания eGFP157_7H на Ni^{2+} -смоле было больше, чем eGFP157_3H3G3H, и соответствовало концентрации имидазола 142 ± 14 mM. Более слабое взаимодействие eGFP157_3H3G3H с металл-аффинной смолой не позволило полностью его очистить от неспецифических примесей. Как видно на рис. 3а (дорожки 7 и 8) и рис. 3б (дорожки 2 и 3), очистка eGFP и использовании встроенных Гис-меток 7Н и 3Н3G3Н осуществлялись довольно эффективно. Металл-аффинная хелатная хроматография позволила избавиться от большинства примесных белков. По результатам денситометрии электрофореграммы чистота полученного белка превышала 95%.

Оценку влияния введенных Гис-меток на вторичную структуру белка проводили методом спектроскопии кругового дихроизма (рис. 4). В табл. 1 приведены результаты количественного анализа спектра КД.

Спектры Гис-меченных вариантов eGFP (рис. 4а) были схожи между собой и свидетельствовали о со-

Таблица 1. Результаты количественного анализа спектра КД

Образец		Спираль, %	β -слои, %	Повороты, %	Нерегулярные структуры, %
eGFP	3H3G3H	14 ± 1	34 ± 3	21 ± 2	31 ± 3
	7H	10 ± 1	37 ± 4	21 ± 2	32 ± 3
	wt	10 ± 1	46 ± 5	12 ± 1	32 ± 3

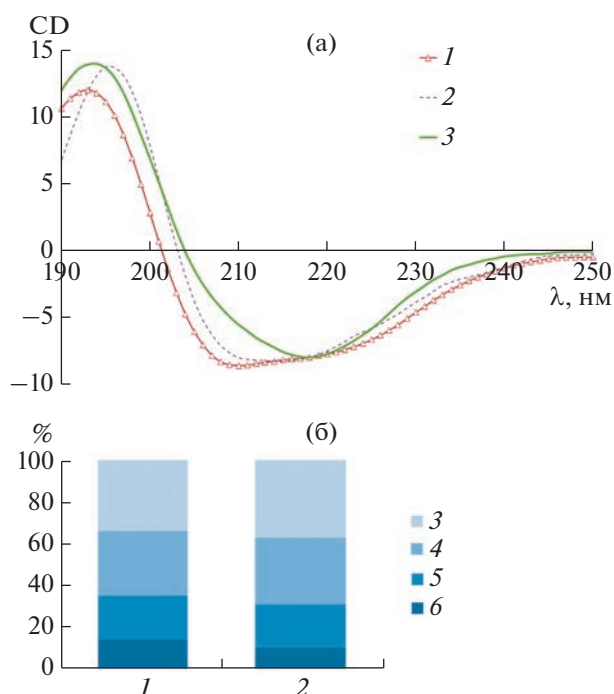


Рис 4. Влияние Гис-меток на вторичную структуру целевых белков: а — наложение экспериментально полученных спектров КД eGFP157_3H3G3N (1) и eGFP157_7N (2) на спектр eGFP (3), рассчитанный при помощи программы PDBMD2CD [24]; б — количественный анализ вторичных элементов спектров КД Гис-меченных вариантов eGFP при помощи программы DichroWeb [21]: 1 — eGFP157_3H3G3N.; 2 — eGFP157_7N.; 3 — нерегулярные структуры, 4 — повороты, 5 — бета-слои, 6 — альфа-спирали.

хранении общей укладки белка. Внесение меток внутрь структуры не приводило к ее денатурации. Тем не менее, наблюдалось отличие спектров от референсного значения. Это отличие можно объяснить увеличением вклада вторичной структуры типа α -спиралей. Количественный анализ спектров на содержание типов вторичных структур (рис. 4б и табл. 1) показал увеличение количества спиральных элементов в спектре образца eGFP157_3H3G3N. В случае eGFP157_3H3G3N увеличение составило 14% по сравнению с 10% у eGFP157_7N. Оба варианта eGFP с введенными Гис-метками сохранили растворимость и приобрели способность взаимодействовать с аффинной смолой, но анализ спектров КД не позволил сделать вывод о полном сохранении функциональности eGFP, поскольку в спектрах изменилось соотношение содержания типов вторичных структур. Для понимания того, как введение меток сказалось непосредственно на флуоресценции eGFP, были получены спектры эмиссии исходного варианта eGFP, eGFP157_7N и eGFP157_3H3G3N. Сравнение формы спектров эмиссии трех экспериментально полученных вариантов eGFP (рис. 5) и

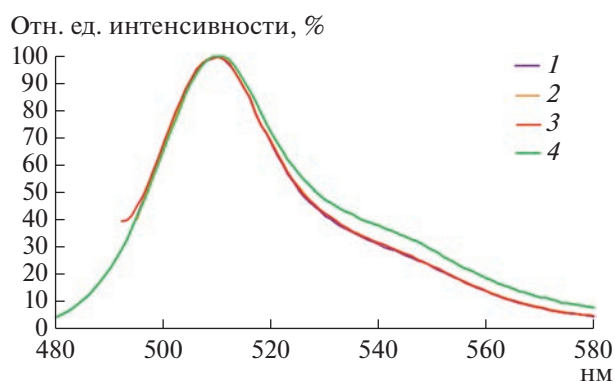


Рис. 5. Сравнение спектров флуоресценции (отн. ед. интенсивности) вариантов eGFP: 1 — спектр eGFP157_3H3G3N, 2 — спектр исходного варианта eGFP, 3 — спектр eGFP157_7N, 4 — спектр, рассчитанный [9] для исходного варианта eGFP.

референсного спектра, рассчитанного по литературным источникам [9], показало, что они идентичны.

Для сравнения яркости eGFP, eGFP157_7N и eGFP157_3H3G3N (рис. 6) были получены значения коэффициентов молярной экстинкции и относительных квантовых выходов (см. Методика), представленные в табл. 2.

Значимое снижение характеристик наблюдалось у варианта eGFP157_3H3G3N. Его яркость составляла 76% от яркости eGFP исходного типа. Яркость варианта с 7Н меткой соответствовала экспериментально рассчитанному уровню яркости исходного варианта eGFP, а также согласовывалась с данными литературы [30].

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы. В результате встраивания метки 3H3G3N в положение между 157 и 158 ами-

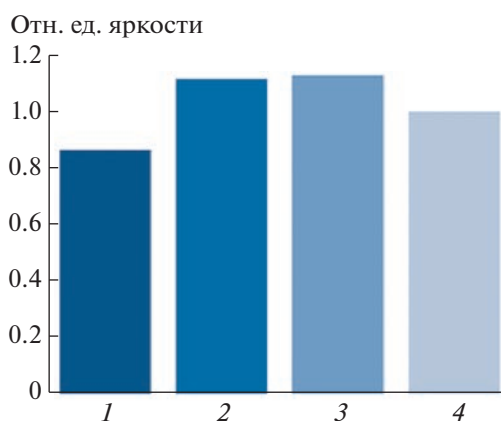


Рис. 6. Сравнение яркости вариантов eGFP: 1 — eGFP157_3H3G3N; 2 — eGFP157_7N; 3 — исходный вариант eGFP; 4 — референсный вариант eGFP, литературные данные [30].

Таблица 2. Характеристика исследуемых вариантов eGFP

Образец	ϵ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Квантовый выход	Яркость, отн. ед.	Относительная яркость
eGFP157_3H3G3H	47067	0.6	29	0.86
eGFP157_7H	53354	0.7	37	1.11
eGFP	54016	0.7	38	1.13
eGFP [30]	55900	0.6	34	1.00

нокислотными остатками eGFP квантовый выход и коэффициент молярной экстинкции хромофора белка оказались меньше, чем у eGFP исходного типа. При этом аналогичное встраивание 7H метки сохраняло флуоресцентные показатели белка близкими к показателям исходного. Снижение относительного квантового выхода и, как следствие, яркости у варианта eGFP157_3H3G3H могло происходить из-за увеличения конформационной свободы флуорофора [26]. Можно предположить, что использование метки 3H3G3H между 157 и 158 аминокислотными остатками eGFP, вероятно, приводило к некоторой релаксации пространственной структуры, вследствие чего увеличилась подвижность хромофора и снизилась яркость флуоресценции белка. Это может объясняться большей конформационной подвижностью метки 3H3G3H по сравнению с вариантом 7H. Для eGFP157_7H снижения яркости не наблюдалось.

Таким образом, можно заключить, что оба варианта предложенных меток в составе белка eGFP способны связываться с Ni^{2+} -смолой, однако метка 7H, вероятно, вызывает меньше структурных и функциональных изменений по сравнению с меткой 3H3G3H. В результате работы был получен вариант eGFP157_7H, имеющий высокое сродство к Ni^{2+} -содержащей смоле, со свободными N- и C-концами и сохранявший уровень флуоресценции исходного белка. Этот вариант eGFP можно использовать как инструмент для создания слитых конструкций и решения самых различных исследовательских задач.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках программы по развитию генетических технологий на 2019–2027 годы (Соглашение № 075-15-2021-1071)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Heger T., Stock C., Laursen M. J., Habeck M., Dieudonné T., Nissen P. In: *Methods in Molecular Biology. Advanced Methods in Structural Biology.* / Ed. Â. Sousa, L. Passarinha. N.Y.: Springer US, 2023. P. 171–186.
- Le Bail A., Schulmeister S., Perroud P.-F., Ntefidou M., Rensing S.A., Kost B. // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. P. 456.
- Xiang X., Li C., Chen X., Dou H., Li Y., Zhang X., Luo Y., Xiang X. // *Methods in Mol. Biol.* 2019. P. 255–269. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_16
- Nakamura S., Fu N., Kondo K., Wakabayashi K.-I., Hisabori T., Sugiura K. // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 100134. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016847>
- Barnard E., Timson D.J. In: *Methods in Molecular Biology. Molecular and Cell Biology Methods for Fungi.* / Ed. A. Sharon. Totowa. N.J.: Humana Press, 2010. V. 638. P. 303–317. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-611-5_23
- Pedelacq J.-D., Waldo G.S., Cabantous S. // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2025. P. 423–437.
- Alam S.R., Mahadevan M.S., Periasamy A. // *Current Protocols.* 2023. V. 3. P. e689. <https://doi.org/10.1002/cpz1.689>
- Nilsson J., Ståhl S., Lundeberg J., Uhlén M., Nygren P.-åke // *Protein Exp. Purif.* 1997. V. 11. P. 1–16.
- Booth W.T., Schlachter C.R., Pote S., Ussin N., Mank N.J., Klapper V. et al. // *ACS Omega.* 2018. V. 3. P. 760–768.
- Hochuli E. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 444. P. 293–302.
- Knecht S., Ricklin D., Eberle A. N., Ernst B. // *J. Mol. Recognit.* 2009. V. 22. P. 270–279. <https://doi.org/10.1002/jmr.941>
- Chung Y.H., Volckaert B.A., Steinmetz N.F. // *Bioconjugate Chem.* 2023. V. 34. P. 269–278.
- Hu Y.-C., Tsai C.-T., Chung Y.-C., Lu J.-T., Hsu J.T.-A. // *Enzyme and Microb. Technol.* 2003. V. 33. P. 445–452.
- Jiang C., Wechuck J.B., Goins W.F., Krisky D.M., Wolfe D., Ataai M.M., Glorioso J.C. // *J. Virology.* 2004. V. 78. № 17. P. 8994–9006. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.8994-9006.2004>
- Biswal J.K., Bisht P., Subramaniam S., Ranjan R., Sharma G.K., Pattnaik B. // *Biologicals.* 2015. V. 43. C. 390–398.
- Ye K., Jin S., Ataai M.M., Schultz J.S., Ibeh J. // *J. Virology.* 2004. V. 78. P. 9820–9827.
- Opitz L., Hohlweg J., Reichl U., Wolff M.W. // *J. Virol. Methods.* 2009. V. 161. P. 312–316.
- Cheeks M.C., Kamal N., Sorrell A., Darling D., Farzaneh F., Slater N.K.H. // *J. Chromatogr. A.* 2009. V. 1216. P. 2705–2711.

19. Fan J. Xiao P., Kong D., Liu X., Meng L., An T. et al. // *Vaccines*. 2022. V. 10. P. 170.
<https://doi.org/10.3390/vaccines10020170>
20. Paul D.M., Beuron F., Sessions R.B., Brancaccio A., Bigotti M.G. // *Sci Rep*. V. 6. P. 20696.
<https://doi.org/10.1038/srep20696>
21. Edelheit O., Hanukoglu A., Hanukoglu I. // *BMC Biotechnol*. 2009. V. 9. P. 61.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-61>
22. Miles A.J., Ramalli S.G., Wallace B.A. // *Protein Sci*. 2022. V. 31. P. 37–46.
23. Drew E.D., Janes R.W. // *Nucleic Acids Res*. 2020. V. 48. P. W17–W24.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa296>
24. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 11. P. 1547.
<https://doi.org/10.3390/biom10111547>
25. Arpino J.A.J., Reddington S.C., Halliwell L.M., Rizkallah P.J., Jones D.D. // *Structure*. 2014. V. 22. P. 889–898.
26. Chiang C.-F., Okou D.T., Griffin T.B., Verret C.R., Williams M.N.V. // *Arch. Biochem. Biophys*. 2001. V. 394. P. 229–235.
27. Leibly D.J., Arbing A.M., Pashkov I., DeVore N., Waldo G.S., Terwilliger T.C., Yeates T.O. // *Structure*. 2015. V. 23. P. 1754–1768.
28. Williams D.E., Williams D.E., Dolgoplova E.A., Pellechia P.J., Palukoshka A., Wilson T.J. et al. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. P. 2223–2226.
29. Zimmer M. // *Chem. Rev*. 2002. V. 102. P. 759–782.
30. Hovmöller S., Zhou T., Ohlson T. // *Acta Cryst D*. 2002. V. 58. P. 768–776.
31. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem*. 2004. V. 25. P. 1605–1612.

New eGFP Mutant with Intact C- and N-Termini and Affinity for Ni²⁺

A. G. Tarabarova^a, *, M. S. Yurkova^a, and A. N. Fedorov^a

^a Federal Research Centre “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: tarabarovan@yandex.ru

The green fluorescent protein GFP has long been used in research practice as a molecular tool. It is often used as a fusion partner. To create fusion constructs, target molecules are attached to the N- or C-terminus of GFP. On the other hand, the N- or C-termini of GFP required to create fusion constructs are also used to attach affinity tags that is greatly facilitating purification. Simultaneous introduction of affinity tag and GFP to both or the same end of GFP can create steric hindrances both in the process of biosynthetic folding of the construct and in its affinity purification. This work is devoted to the production of GFP with a His-tag introduced into the polypeptide chain. This work resulted in eGFP157_7H protein with an embedded His-tag and free N- and C-termini to create fusion proteins. The added His-tag will allow purification of the construct with GFP by metal-chelated affinity chromatography under native conditions. The resulting eGFP157_7H variant retained the original fluorescent properties completely similar to those of wild-type eGFP.

Keywords GFP, internal His-tag, IMAC, protein purification in native condition

УДК 577.175.539

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ 1,2-ДЕГИДРИРОВАНИЕ 11-ТРИФТОРАЦЕТАТА 6 α -МЕТИЛГИДРОКОРТИЗОНА

© 2023 г. Т. С. Савинова^{1, *}, А. Ю. Аринбасарова², А. В. Казанцев³,
О. С. Савинова⁴, Н. В. Лукашёв³

¹ Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Московская область,
городской округ Мытищи, город Мытищи, 141014 Россия

² Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований
Российской Академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина
(ИБФМ РАН), Пушкино, Московская область, 142290 Россия

³ Химический факультет, Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

⁴ Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

Поступила в редакцию 17.06.2023 г.

После доработки 29.06.2023 г.

Принята к публикации 03.07.2023 г.

Проведена трансформация 11-трифторацетата 6 α -метилгидрокортизона (**11-ТФА МГК**) клетками актинобактерий рода *Arthrobacter* (*Nocardioide*s) в присутствии α -циклодекстрина (**α -ЦД**). Изучен состав и динамика накопления в культуральной среде продуктов трансформации при различных значениях pH и соотношении α -ЦД/субстрат. Показано, что добавление α -ЦД в среду для трансформации при pH < 7 способствует увеличению скорости 1,2-дегидрирования с образованием 11-трифторацетата 6 α -метилпреднизолон (**11-ТФА МПЛ**). При pH > 7 первичным процессом является гидролиз 11 β -трифторацетилоксигруппы. При этом можно предположить, что α -ЦД участвует в этих процессах как акцептор трифторацетил-иона.

Ключевые слова: 6 α -метилгидрокортизона 11-трифторацетат, 6 α -метилпреднизолон 11-трифторацетат, 6 α -метилпреднизолон, 1,2-дегидрирование, *Arthrobacter*, *Nocardioide*s, α -циклодекстрин

DOI: 10.31857/S0555109923060132, **EDN:** CXLIBX

Известно, что 1,2-дегидропроизводные Δ^4 -3-кетостероидов, применяемые в качестве активных фармацевтических ингредиентов (**АФИ**) лекарственных препаратов, например, кортикостероидов, проявляют больший терапевтический эффект с меньшим побочным действием по сравнению с 1,2-насыщенным предшественником. Так, 6 α -метилпреднизолон (11 β ,17 α ,21-тригидрокси-6 α -метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион, **МПЛ**) фармакологически более эффективен по сравнению с 6 α -метилгидрокортизоном (11 β ,17 α ,21-тригидрокси-6 α -метилпрегна-4-ен-3,20-дион, **МГК**) [1], который в качестве АФИ не применяется. МПЛ — 1,2-дегидропроизводное МГК — является АФИ лекарственных средств для лечения воспалительных, аллергических, онкологических и других заболеваний. В медицинской практике широкое применение получили эфиры МПЛ, такие как 21-ацетат, 21-сукцинат натрия, а также аце-

понат — 17-пропионилокси-производное 21-ацетата МПЛ [https://www.rlsnet.ru].

МПЛ получают преимущественно реакцией микробиологического 1,2-дегидрирования МГК, используя в качестве биокатализатора различные бактерии, способные продуцировать 3-кетостероид- Δ^1 -дегидрогеназу (**3-КСД**) (К.Ф. 1.3.99.4). Трансформацию проводят, как правило, покоящимися клетками, используя в качестве среды буферные растворы со значением pH в диапазоне 6.8–7.5 [2–4].

В последние годы большое значение приобрело изучение микробиологического 1,2-дегидрирования 21-ацетокси-производных Δ^4 -3-кетостероидов с диоксиацетоновой боковой цепью [5–8]. Известно, что в процессе микробиологической трансформации возможно элиминирование сложноэфирной защиты гидроксильной группы при C²¹, которое может происходить в результате действия эстераз в широком диапазоне значений pH [7, 9]. Однако также из-

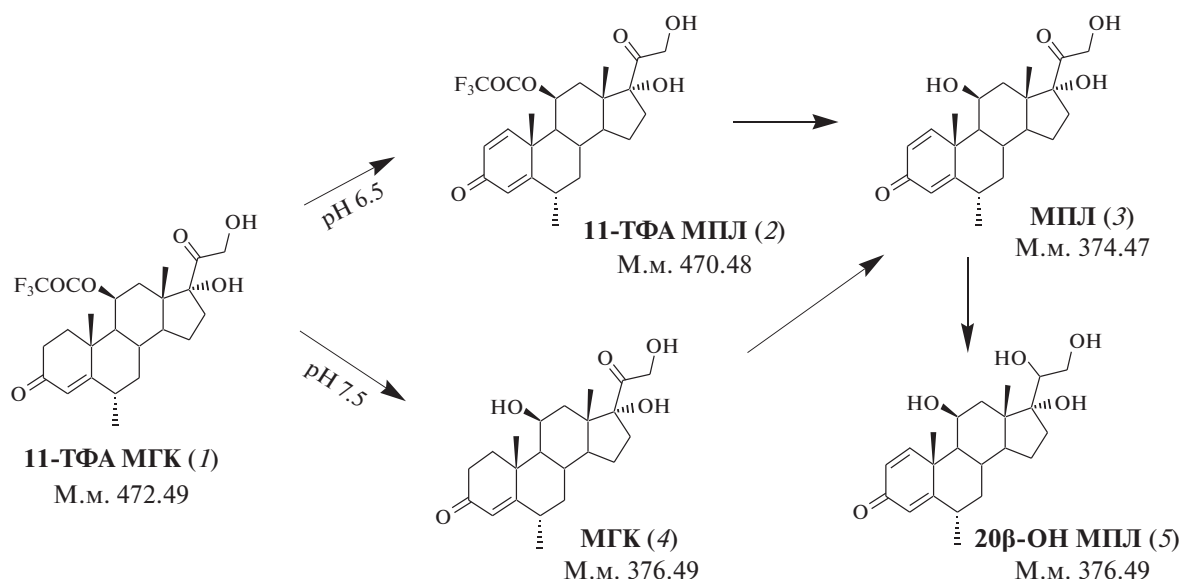


Рис. 1. Схема трансформации 11-ТФА МГК (1) клетками *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528.

вестно, что в зависимости от условий проведения процесса биотрансформация может протекать с сохранением сложноэфирной группировки. В связи с этим большое значение приобретает изучение микробиологического 1,2-дегидрирования этерифицированных субстратов с целью сохранения не только 21-ацетокси-группы [7, 8, 10, 11], но и других сложноэфирных защитных групп. Поскольку МПЛ применяется в медицинской практике в виде C^{21} -эфиров, большой интерес уделяется изучению 1,2-дегидрирования C^{21} -эфиров МГК. Известны, в частности, работы по синтезу 21-ацетата МПЛ из 21-ацетата МГК [3, 5, 6].

В химическом синтезе ацепоната МПЛ из МПЛ или 21-ацетата МПЛ важным условием этерификации третичной гидроксильной группы при C^{11} является защита вторичного гидроксила при C^{17} является защита вторичного гидроксила при C^{11} [12]. Наиболее предпочтительным для этой цели служит образование 11-трифторацетилокси-защитной группы, которая легко удаляется основным сольволизом в мягких условиях [12–14]. 11-Трифторацетилокси-защита, как было показано ранее [14], является наиболее приемлемой и в химическом синтезе 6α-метил-производных, в частности МГК из гидрокортизона (ГК) [15, 16]. Причем удаление защитных группировок, включая 11-трифторацетильную, происходит на последней стадии его синтеза. Становится очевидным, что 11-трифторацетат МГК (11-ТФА МГК, рис. 1, 1) можно рассматривать как потенциальный субстрат для дальнейшего 1,2-дегидрирования как с образованием 11-трифторацетата МПЛ (11-ТФА МПЛ, 2), так и его гидролизованного аналога МПЛ (3).

Ранее [16] была показана возможность микробиологического 1,2-дегидрирования производных МГК со сложноэфирной группой при атоме C^{11} в присутствии β-циклодекстрина (β-ЦД). Применение β-ЦД или его производных для увеличения растворимости стероидных субстратов в водной среде детально изучено и применяется в биотехнологических производствах [17, 18]. Известно, что растворимость стероидов в водных растворах в присутствии циклодекстринов (ЦД) может быть увеличена в 2–1200 раз [9]. Следует отметить, что растворимость α-ЦД в воде составляет 14.5% (вес/об.), что значительно превышает таковую β-ЦД (1.85%, вес/об.) [19]. Однако в отличие от β-ЦД в качестве солюбилизирующего агента в процессах микробиологического 1,2-дегидрирования стероидов рядов андростана и прегнана α-ЦД применяется намного реже. Описано применение α-ЦД в микробиологическом синтезе преднизолона (ПЛ) из ГК (содержание 2 г/л) культурой *Arthrobacter simplex* [20].

Цель настоящей работы – изучение 1,2-дегидрирования 11β-трифторацетилокси-17α,21-дигидрокси-6α-метилпрегн-4-ен-3,20-диона (11-ТФА МГК, 1) бактериями *Arthrobacter globiformis* ВКПМ Ас-1528 (193) (син. *Nocardioideis simplex* ВКМ Ас-2033Д) [21, 22] при различных значениях pH, а также в присутствии в среде α-ЦД.

МЕТОДИКА

Реактивы. В работе были использованы следующие реактивы: α-ЦД (≥98.0% (HPLC), CAS № 10016-20-3, “Sigma-Aldrich”, США), 21-ацетат

кортизона ($\geq 99.0\%$, CAS № 50-04-4, “Sigma-Aldrich”, США), 6α -метилпреднизолон ($\geq 98\%$, CAS № 83-43-2, “Sigma-Aldrich”, США); 6α -метилгидрокортизон (98.92%, CAS № 1625-39-4, “Syn-Zeal Research Pvt”, Индия).

11-ТФА МГК (1) был получен из 21-ацетата ГК, как описано в патенте [23]. 11-ТФА МПЛ (2) был получен 1,2-дегидрированием 11-ТФА МГК (1) клетками *Nocardioideis simplex* VKM Ac-1118 в присутствии β -ЦД, как описано в патенте [16]. $11\beta, 17\alpha, 20\beta, 21$ -Тетрагидрокси- 6α -метилпрегна-1,4-диен-3-он (20 β -ОН-МПЛ, 5) был получен известным методом стереоспецифического восстановления 20-кетогруппы МПЛ до гидроксильной группы действием NaBH_4 [24].

Другие материалы и растворители квалификации “х. ч.” и “ч. д. а.” были приобретены у российских поставщиков ООО “АО Реахим” и ООО “Компонент-Реактив”.

Микроорганизм и условия культивирования. В работе использовали актинобактерии *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ “Курчатовский институт” Национального Биоресурсного Центра (Россия). Штамм поддерживали на скошенной агаризованной кукурузно-глюкозной среде следующего состава (г/л): глюкоза — 10, кукурузный экстракт — 10, вода водопроводная, pH 7.0–7.2. Выращивание проводили в течение 5 сут при температуре 30°C.

Выращивание инокулята. Клетки, выросшие на агаризованной среде, смывали стерильной дистиллированной водой, суспензию клеток вносили по 1–2 мл в колбы Эрленмейера (750 мл) со 100 мл кукурузно-глюкозной среды того же состава (pH 7.0–7.2) и инкубировали на качалке (200–220 об./мин) при температуре 29°C в течение 16–20 ч.

Выращивание трансформирующей культуры. Полученный инокулят использовали для выращивания трансформирующей культуры. В колбы Эрленмейера (750 мл), содержащие по 100 мл кукурузно-глюкозной среды того же состава (pH 7.0–7.2), стерильно вносили по 1–2 мл полученной суспензии клеток и инкубировали на качалке (220 об./мин) при температуре 29°C в течение 16 ч. В качестве индуктора 3-КСД использовали 21-ацетат кортизона, который добавляли в виде раствора в этаноле (150 мг/л) за 5 ч до окончания процесса роста клеток.

Клетки отделяли от среды центрифугированием при 5000 g в течение 15 мин, дважды промывали 0.01 М Na-фосфатным буфером (pH 7.2) и затем ресуспендировали в том же буфере. При этом концентрация клеток составляла 50 мг/мл (сухой вес). Суспензию использовали в дальнейшей работе для проведения процесса 1,2-дегидрирования.

Трансформация 11-ТФА МГК (1). Трансформацию 11-ТФА МГК (1) проводили отмытыми клетками в колбах Эрленмейера (250 мл), содержащих по 25 мл 0.01 М Na-фосфатного буфера (pH 6.5 или 7.5) в качестве реакционной среды на качалке (200–220 об./мин) при температуре 29°C. Концентрация клеток составляла 1 г/л (по сухой биомассе). α -ЦД вносили в виде порошка в концентрации 1.0 или 3.0 г/л до внесения субстрата.

Субстрат (1) вносили в виде раствора в метаноле (MeOH) в концентрации 80 мг/мл. Конечная концентрация субстрата в среде составляла 0.5 г/л, а концентрация MeOH не превышала 5%.

Мониторинг процесса трансформации проводили, отбирая пробы из реакционной среды. Пробы экстрагировали этилацетатом (ЭА) в соотношении ЭА : проба — 4 : 1, об./об. Экстракт обрабатывали активированным углем и упаривали досуха. В сухом остатке определяли состав и содержание продуктов трансформации, используя методы ТСХ и ВЭЖХ. Хроматографический анализ соединений 1–5 (рис. 1) проводили на пластинках ПТСХ-АФ-В-УФ “Sorbfil UV-254” (Россия) в системе бензол : ацетон (3 : 1, об./об.). После просмотра в УФ-свете хроматограммы опрыскивали 1%-ным раствором ванилина в 10%-ном растворе хлорной кислоты, проявляли при температуре 100–110°C. В качестве контрольных образцов использовали соединения известной структуры, а именно, 11-ТФА МГК (1), 11-ТФА МПЛ (2), МПЛ (3), МГК (4) и 20 β -ОН-МПЛ (5).

Для разделения смесей стероидов использовали хроматографическую колонку с 50-кратным количеством силикагеля “Merck” (0.040–0.063 мм, Германия) по отношению к массе сухого остатка. Продукты трансформации элюировали смесью дихлорметана (ДХМ) и метилэтилкетона (МЭК) с содержанием МЭК от 0 до 20%, растворитель упаривали.

Спектры ^1H -ЯМР соединений снимали на спектрометре “Bruker Avance 400” (США) с рабочей частотой 400 МГц в растворе дейтерохлороформа (CDCl_3). В качестве внутреннего стандарта использовали гексаметилдисилоксан.

11-ТФА МГК (1):

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 5.75 (д, $J = 1.5$ Гц, 1H, 4-H), 5.67 (м, 1H, 11 α -H), 4.63 (дд, $J = 20.0$, 4.7 Гц, 1H, 21- CH_2), 4.25 (дд, $J = 20.0$, 4.3 Гц, 1H, 21- CH_2), 1.24 (с, 3H, 19- CH_3), 1.08 (д, $J = 6.4$ Гц, 3H, 6 α - CH_3), 0.81 (с, 3H, 18- CH_3).

11-ТФА МПЛ (2):

^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ : 6.85 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-H), 6.29 (дд, $J = 10.1$, 1.5 Гц, 1H, 2-H), 6.03 (уш.с, 1H, 4-H), 5.70 (м, 1H, 11 α -H), 4.63 (дд, $J = 20.1$, 3.9 Гц, 1H, 21- CH_2), 4.24 (дд, $J = 20.0$, 3.8 Гц,

1H, 21-CH₂), 1.25 (с, 3H, 19-CH₃), 1.13 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.81 (с, 3H, 18-CH₃).

МПЛ (3):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 7.24 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-H), 6.28 (дд, $J = 10.1, 1.5$ Гц, 1H, 2-H), 6.02 (уш.с., 1H, 4-H), 4.63 (дд, $J = 19.1, 5.9$ Гц, 1H, 21-CH₂), 4.49 (м, 1H, 11 α -H), 4.28 (дд, $J = 19.1, 5.8$ Гц, 1H, 21-CH₂), 1.44 (с, 3H, 19-CH₃), 1.12 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.96 (с, 3H, 18-CH₃).

МГК (4):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 5.71 (уш.с, 1H, 4-H), 4.64 (д, $J = 19.8$, Гц, 1H, 21-CH₂), 4.47 (м, 1H, 11 α -H), 4.29 (д, $J = 19.8$, 1H, 21-CH₂), 1.41 (с, 3H, 19-CH₃), 1.05 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 0.94 (с, 3H, 18-CH₃).

20 β -ОН-МПЛ (5):

¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ : 7.27 (д, $J = 10.1$ Гц, 1H, 1-H), 6.26 (дд, $J = 10.1, 1.5$ Гц, 1H, 2-H), 6.02 (уш.с., 1H, 4-H), 4.43 (м, 1H, 11 α -H), 3.84–3.75 (м, 3H, 20 α -H, 21-CH₂), 1.45 (с, 3H, 19-CH₃), 1.11 (д, $J = 6.3$ Гц, 3H, 6 α -CH₃), 1.09 (с, 3H, 18-CH₃).

Использовали систему ВЭЖХ “Knauer Smart-line” (Германия), снабженную инжектором, УФ-детектором с переменной длиной волны, блоком термостатирования колонки, компьютером, и колонку “Kromasil® 100-5C18” 4.6 $\times$ 250 мм, размер частиц 5 мкм (“Eka Chemicals AB”, Швеция). Подвижная фаза: ацетонитрил–H₂O в соотношении 40 : 60 об./об. Скорость потока: 1 мл/мин. Детектирование: УФ, длина волны 254 нм.

Времена удерживания: 11-ТФА МГК (1) – 18.3 мин, 11-ТФА МПЛ (2) – 17.2 мин, МПЛ (3) – 6.1 мин, МГК (4) – 6.7 мин, 20 β -ОН-МПЛ (5) – 2.8 мин.

Изучение влияния pH трансформационной среды без трансформирующей культуры как в присутствии в среде α -ЦД, так и без α -ЦД (контроль) проводили в колбах Эрленмейера (250 мл), содержащих по 25 мл 0.01 М Na-фосфатного буфера (pH 6.5 или 7.5). α -ЦД вносили в виде порошка в концентрации 3.0 г/л. Субстрат (1) вносили в виде метанольного раствора в конечной концентрации 0.5 г/л. Реакционные смеси инкубировали на качалке (220 об./мин) в течение 4 сут при температуре 29°C, после чего оценивали содержание стероидов. Для этого содержимое колб экстрагировали ЭА, используя соотношение ЭА : проба (4 : 1, об./об.). Растворитель упаривали до прекращения погона, остаток растворяли в 1 мл смеси ДХМ : MeOH (3 : 1, об./об.). Содержание стероидных соединений оценивали методом количественной ТСХ с применением денситометрического анализа в программе Sorbfil TLC View.

Все эксперименты проводили в 3 биологических повторностях. Статистическая обработка данных проводилась с использованием метода дисперсионного анализа. При обнаружении до-

стоверного значения ($p < 0.05$) F-статистики, различия между индивидуальными средними были оценены с использованием теста множественного сравнения Тьюки ($p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что молекулярное инкапсулирование субстрата в полости ЦД существенно зависит не только от структуры гостевой молекулы, но и размера полости циклического олигомера глюкозы. Стероидные соединения могут образовывать комплексы (1 : 1) с β -ЦД и γ -ЦД [25]. Описано образование комплексов включения терпеноидов с β -ЦД в эквимолярном соотношении гость-хозяин (1 : 1) [26]. Однако было обнаружено, что в отличие, например, от прогестерона (ПГ) полному погружению молекулы ГК, отличающейся от ПГ наличием гидроксильных групп при атомах C¹¹ и C²¹, в полость β -ЦД, содержащего 7 глюкопиранозных звеньев, препятствовали полярные гидроксильные группы на его поверхности [25]. Тхи и соавт. [27] показали, что возможно образование комплекса включения МПЛ с γ -ЦД (8 звеньев глюкопиранозы) и гидроксипропил γ -ЦД за счет включения колец А и В в полость этих ЦД, так как они обладают полостями большего размера. В литературных источниках имеется скудная информация по применению α -ЦД, содержащего 6 глюкопиранозных звеньев, для интенсификации процессов биотрансформации стероидных соединений, в частности 1,2-дегидрирования кортикостероидов. Описано образование комплекса включения α -ЦД с β -ситостерином, при этом максимальная эффективность инкапсулирования достигала 87% при использовании α -ЦД и β -ситостерина в мольном соотношении 2 : 1 [28]. В патенте [20] описано получение преднизолона из ГК с высоким выходом с использованием культуры *Arthrobacter simplex* (АТСС 6946) с концентрацией субстрата 2 г/л в присутствии α -ЦД при соотношении α -ЦД: ГК, равном 10 : 1 (вес/вес) или ~3.5 : 1 (моль/моль). При этом авторы отмечали, что в присутствии α -ЦД имело место ингибирование осаждения субстрата в водной среде, что приводило к увеличению скорости реакции.

В настоящей работе было проведено изучение микробиологического 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК культурой *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 при концентрации субстрата 0.5 г/л и значениях pH 6.5 и 7.5. Изучено влияние α -ЦД в мольном соотношении к исходному субстрату 1 : 1 и 3 : 1 при pH 6.5.

Схема микробиологического превращения 11-ТФА МГК (1) бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 представлена на рис. 1.

Динамика накопления продуктов микробиологического превращения 11-ТФА МГК (1) представлена на рис. 2 и 3.

Биотрансформация 11-ТФА МГК (1) при pH 7.5 и мольном соотношении α -ЦД : субстрат (1) – 3 : 1. При значении pH среды для трансформации 7.5 происходило накопление в среде МГК (4) – продукта деэтерификации гидроксильной группы при атоме C^{11} , МПЛ (3) и продукта его последующего 1,2-дегидрирования – МПЛ (3). Так, в указанных условиях (при pH 7.5 в присутствии α -ЦД) за 4 сут клетки бактерий превращали исходный субстрат (1) на ~74%, при этом накопление МПЛ (3) составляло ~47%, МГК (4) – 34%, а продукта восстановления 20-кетогруппы (5) – 11.5% (табл. 1, рис. 2). Биотрансформации 11-ТФА МГК (1) с меньшим количеством α -ЦД (1 : 1, моль/моль субстрату) или без добавления α -ЦД в трансформационную среду также протекали через первичное образование МГК (4) с последующим его превращением в МПЛ (3) и далее в 20 β -ОН-МПЛ (5). Аналогичная последовательность превращений была отмечена ранее [31] при проведении микробиологического 1,2-дегидрирования ГК клетками *A. globiformis* с образованием ПЛ и его 20 β -ОН- производного. Контрольный эксперимент (без применения клеток в качестве биокатализатора) показал, что при pH 7.5 происходил гидролиз трифторацетатной группы субстрата (1) с образованием соединения (4). В отсутствие α -ЦД в тех же условиях наблюдалось образование гораздо меньшего количества МГК (4), чем в присутствии α -ЦД (5 и 7.5% соответственно). То есть при pH > 7 первичным процессом является неэнзиматический гидролиз трифторацетилоксигруппы при C^{11} , который

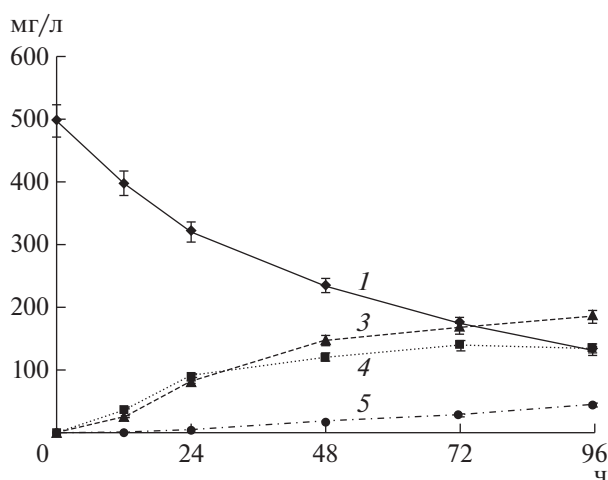


Рис. 2. Динамика накопления продуктов трансформации 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 при pH 7.5 в присутствии α -ЦД (11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 3): 1 – 11-ТФА МГК; 3 – МПЛ; 4 – МГК; 5 – 20 β -ОН-МПЛ.

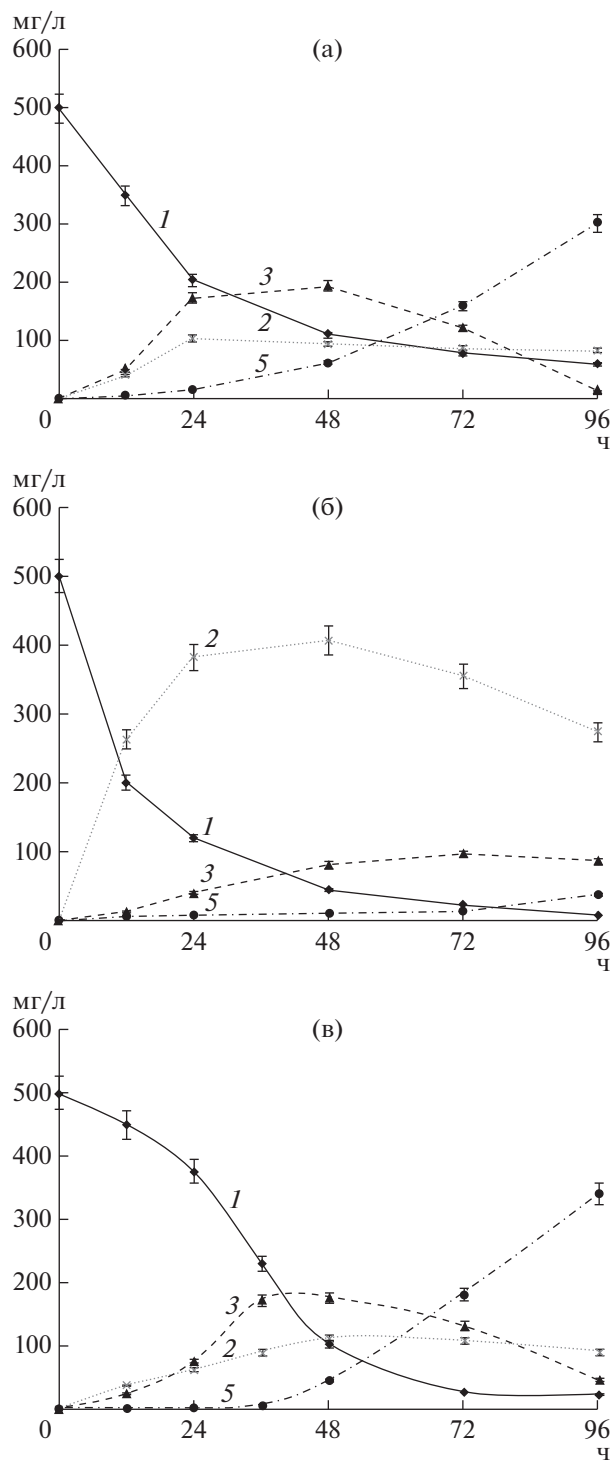


Рис. 3. Динамика накопления продуктов трансформации 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528 при pH 6.5: 1 – 11-ТФА МГК; 2 – 11-ТФА МПЛ; 3 – МПЛ; 5 – 20 β -ОН-МПЛ. а – без α -ЦД; б – 11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 3; в – 11-ТФА МГК: α -ЦД = 1 : 1.

Таблица 1. Степень превращения ТФА МГК (1) и выходы продуктов трансформации (2–5) в разных условиях, (% моль)

Соединение	pH 7.5		pH 6.5					
	α -ЦД : субстрат 3 : 1		без α -ЦД		α -ЦД : субстрат			
					1 : 1		3 : 1	
	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч	48 ч	96 ч
1	52.94	73.64	77.78	87.88	79.44	95.75	91.2	98.69
2	*	*	22.32	18.26	19.07	16.74	81.77	55.03
3	37.12	47.04	44.31	11.47	49.08	3.82	20.44	21.95
4	29.62	34.23	*	*	*	*	*	*
5	4.92	11.41	11.16	85.58	15.34	76.08	2.65	9.29

* — не обнаружено.

ускоряется в присутствии α -ЦД. Эти данные согласуются с литературными данными, согласно которым циклодекстрины способны ускорять гидролиз сложных эфиров в щелочных средах [29].

Следует отметить, что в результате гидролиза, спровоцированного основным характером среды и ЦД, образуется МГК (4), который в нашем случае выступает в роли вторичного субстрата 1,2-дегидрирования. Кроме того, для этого соединения показано ингибирование активности 3-КСД [4, 30], что также является фактором, контролирующим процесс трансформации в целом.

Биотрансформация 11-ТФА МГК (1) при pH 6.5 в присутствии и отсутствии α -ЦД. При значении pH 6.5 1,2-дегидрирование субстрата (1) протекало без образования продукта гидролиза 11 β -трифторацетатной группы — МГК (4) — как при использовании α -ЦД, так и без него. Контрольный эксперимент без применения биокатализатора при pH 6.5 в условиях биотрансформации показал, что трифторацетатная защита 11 β -гидроксильной группы как у 11-ТФА МГК, так и у 11-ТФА МПЛ, стабильна и продуктов их деэтерификации обнаружено не было.

Максимальное накопление целевого 11-ТФА МПЛ (2) — 81.77% — при степени превращения исходного субстрата (1) 91.2% наблюдалось через 48 ч трансформации в присутствии α -ЦД (табл. 1, рис. 3б), взятого в мольном соотношении α -ЦД: субстрат 3 : 1, при этом содержание в среде побочного соединения (5) было незначительным — 2.65%.

В отсутствие α -ЦД максимальное накопление соединения (2) и его 11 β -гидрокси-аналога МПЛ (3) также наблюдалось через 48 ч трансформации, однако их содержание составляло всего 22% и 44% соответственно. При этом степень превращения субстрата (1) через 48 ч была 77.8% (табл. 1, рис. 3а). В то же время после 24 ч трансформации

имело место существенное увеличение скорости образования нежелательного продукта восстановления 20-кетогруппы (5). Если на 24 ч его содержание составляло ~1%, то через 48 ч было более 11%, а к концу трансформации (96 ч) — более 85% при степени превращения субстрата ~88%. Таким образом, основным продуктом трансформации 11-ТФА МГК (1) в отсутствие α -ЦД был 20 β -ОН-МПЛ (5). Следует отметить, что если процесс конверсии субстрата (1) в присутствии α -ЦД (3 : 1) завершался через 96 ч, то без α -ЦД биоконверсия субстрата (1) прекращалась к 72 ч и далее содержание исходного соединения (1) практически не изменялось, однако происходила интенсивная конверсия образованного МПЛ (3) в 20 β -ОН-МПЛ (5).

Уменьшение соотношения α -ЦД: субстрат (1) до эквимолярного (весовое — 2 : 1) приводило к снижению скорости трансформации. Так, если конверсия исходного соединения (1) в присутствии α -ЦД (3 : 1) на 24 ч трансформации составляла 76%, то при использовании эквимолярного количества α -ЦД (1 : 1) — 59.1%, а без α -ЦД — 25% (рис. 3). Кроме того, было отмечено, что, как и в эксперименте без α -ЦД, по мере образования 11-ТФА МПЛ (2) происходил гидролиз сложноэфирной группы при C¹¹ и последующая конвертация МПЛ (3) в 20 β -ОН-МПЛ (5). При этом через 96 ч трансформации накопление продукта (5) было значительным (более 76%) при степени превращения исходного субстрата (1) до 96%. На основании анализа и сопоставления полученных результатов стало очевидным, что в изученных условиях трансформации эквимолярное соотношение субстрат: α -ЦД недостаточно.

Следует отметить, что ни в одном из вариантов биотрансформации не было обнаружено образования 11-трифторацетилированного аналога 20 β -ОН-МПЛ. Этот факт свидетельствует о том, что восстановлению 20-кетогруппы подвергался только гидролизированный МПЛ (3).

Известно, что комплексы циклодекстринов и стероидных субстратов диссоциируют в водной среде и в биоконверсионной среде находятся в состоянии динамического равновесия со свободным стероидом и молекулами ЦД [19]. Учитывая, что характер связывания субстрата (1), продукта (2) и неэтерифицированных продуктов с α -ЦД может быть различным, можно предположить, что при недостатке α -ЦД возможна конкуренция за образование комплекса между субстратом (1) и продуктами с изменением равновесного состояния в неблагоприятном для продукта (2) направлении. Кроме того, при недостаточном количестве α -ЦД предположительно меняется характер комплексообразования α -ЦД и стероида, что может стать причиной переноса 11-трифторацетильной группы из 11-ТФА МПЛ (2) на молекулу α -ЦД при участии ферментов. Следует отметить, что существенный гидролиз 11-трифторацетатной группы продукта (2) с образованием МПЛ (3), который наблюдался в среде с pH 6.5 в отсутствие α -ЦД, а также при использовании эквимольного соотношения α -ЦД к субстрату (1), проходил практически с момента образования (2) (рис. 3а, 3в). Учитывая, что 11-трифторацетатная группа обладает стабильностью в кислых средах и наличие гидролиза под действием среды исключено, что было подтверждено в контрольном эксперименте, а также исключено предполагаемое каталитическое влияние на процесс деэтерификации α -ЦД, который в среде с pH 6.5 отсутствует, то можно сделать вывод о том, что имел место ферментативный гидролиз трифторацетатной группы.

Известно, что липазы бактерий обладают способностью катализировать реакции гидролиза и трансэтерификации [32]. Бактерии рода *Arthrobacter* (позднее название *Nocardioide*s) являются природными продуцентами липолитических ферментов, способных также к гидролизу сложноэфирных связей субстратов и трансэтерификации [33]. Можно предположить, что в условиях биотрансформации субстрата (1) имела место трансэтерификация под действием фермента липазы, которая осуществлялась в 2 этапа: 1 — ацильный перенос трифторацетильной группы с молекулы донора — 11-ТФА МПЛ (2) или 11-ТФА МГК (1) — на липазу культуры *A. globiformis* ВКПМ Ас-1528, которая является акцептором трифторацетил-иона, с промежуточным образованием ацил-ферментного эфира; 2 — последующее расщепление трифторацетил-ферментного соединения в результате атаки второго нуклеофила. При этом вторым нуклеофилом могла быть молекула воды (гидролиз) или молекула гидроксилсодержащего соединения (переацилирование) [34], в качестве которого и может выступать α -ЦД. Способность циклодекстринов участвовать в процессе переноса ацильного радикала в качестве акцептора с образованием структуры с ацилированной вторичной гидроксильной

группой ЦД известна. Так, ацильная миграция была детектирована с помощью ЯМР в процессе изучения катализируемого циклодекстрином деацилирования спиронолактона и установлена зависимость ее скорости от структуры ЦД [35]. Было также найдено, что β -ЦД катализирует деградацию спиронолактона путем ковалентного катализа и скорость деацилирования уменьшается с уменьшением значения pH. Ранее также была показана возможность удаления 11-трифторацетатной группы соединения (2) с помощью клеток бактерий *Agromyces mediolanus* ВКМ Ас-1388 [16].

Образованный в результате переацилирования трифторацетилокси- α -ЦД имеет, скорее всего, более низкую способность к комплексообразованию с 11-ТФА МПЛ (2), тем самым не препятствуя процессу его деэтерификации с образованием МПЛ (3) и последующему превращению соединения (3) в соединение (5) при применении в процессе трансформации эквимольного количества α -ЦД.

Ингибирование активности 3-КСД трифторацетатным ионом в настоящей работе не было выявлено, возможно, из-за эффекта катализируемой ферментом трансэтерификации с участием α -ЦД в качестве акцептора трифторацетил-иона.

Значительное ускорение процесса 1,2-дегидрирования при pH 6.5 в присутствии α -ЦД (3 : 1) может быть объяснено, во-первых, устранением возможного ингибирования 3-КСД субстратом (1) и отсутствующим соединением (4), а также отсутствием эффекта ингибирования продуктами (2) и (3). Продукты 1,2-дегидрирования стероидных субстратов, как известно, способны ингибировать активность фермента [20]. Кроме того, можно предположить, что снятие эффекта ингибирования происходило за счет образования комплексов включения α -ЦД с субстратом (1) и продуктами (2) и (3) избыточным количеством α -ЦД.

Способность циклодекстринов стабилизировать структуры лабильных соединений, что предотвращает деградацию, гидролиз и другие модификации, была отмечена ранее [36]. Также известно [35, 37], что способность ЦД ускорять гидролитическую деструкцию соединения или, наоборот, защищать от этого процесса, зависит от того, локализована ли лабильная часть молекулы в непосредственной близости от каталитически активной гидроксильной группы ЦД, или имеет место проникновение лабильной части в глубь полости ЦД [35]. Учитывая тот факт, что α -ЦД имеет значительно меньший внутренний диаметр полости по сравнению с β -ЦД и тем более в сравнении с γ -ЦД, можно предположить, что исходный субстрат (1) и продукты его биотрансформации погружены не полностью в полость этого циклического олигомера глюкозы.

Отсутствие в обоих случаях, как с использованием α -ЦД, так и без него, в реакционной среде при pH 6.5 продукта гидролиза исходного субстрата (1) МГК (4) может свидетельствовать также о субстратной специфичности липолитического фермента культуры *A. globiformis* VKPM Ac-1528 в этих условиях. Известно, что липазы обладают чрезвычайно широкой субстратной специфичностью и показывают высокий уровень энантио- и регио-селективности при конверсии различных неприродных соединений [32].

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что в процессе 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК (1) при pH 6.5 α -ЦД, присутствующий в мольном соотношении 3 : 1 к субстрату, защищает как структуру субстрата (1), так и структуру продукта (2), от ферментативного гидролиза 11-трифторацетатной группы.

Таким образом, впервые установлена возможность 1,2-дегидрирования 11-ТФА МГК бактериями *A. globiformis* ВКПМ Ac-1528 с сохранением сложноэфирной защиты при C^{11} . Обязательными условиями сохранения защиты является наличие в среде α -ЦД в мольном соотношении 3 : 1 к субстрату и проведение процесса при pH < 7. При этом оптимальная продолжительность процесса, при которой достигается максимальный выход 11-ТФА МПЛ (2) до 82% с минимальным образованием побочного продукта (5), составляет 48 ч. Кроме того, основным продуктом трансформации 11-ТФА МГК (1) в отсутствие α -ЦД является 20 β -ОН-МПЛ (5). Добавление α -ЦД приводит к изменению направленности трансформации.

Исследование проведено в рамках Госзадания кафедры органической химии химического факультета МГУ по теме: “Синтез и исследование физических, химических и биологических свойств органических и элементоорганических соединений” – Номер ЦИТИС – АААА-А21-121012290046-4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Annen K., Petzoldt K., Laurent H., Wiechert R., Hofmeister H. // Патент США. 1990. № 4912098.
- Kominek L.A., Wolf H.J. // Патент США. 1987. № 4704358.
- Аринбасарова А.Ю., Кощеченко К.А., Андриюшина В.А., Гриненко Г.С., Скрябин Г.К. // Патент РФ. 1995. № 1830949.
- Arinbasarova A.Yu., Karpov A.V., Fokina V.V., Medentsev A.G., Koshcheyenko K.A. // Enzym. Microb. Tech. 1996. V. 19. № 7. P. 501–506.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(96\)80001-C](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80001-C)
- Pinheiro H.M., Cabral J.M.S. // Biotech. Bioeng. 1991. V. 37. № 2. P. 97–102.
<https://doi.org/10.1002/bit.260370202>
- Santos R.A., Caldeira J.C.G., Pinheiro H.M. and Cabral J.M.S. // Biotech. Lett. 1991. V. 13. № 5. P. 349–354.
<https://doi.org/10.1007/BF01027681>
- Fokina V.V., Sukhodolskaya G.V., Baskunov B.P., Turchin K.F., Grinenko G.S., Donova M.V. // Steroids. 2003. V. 68. № 5. P. 415–421.
[https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(03\)00043-6](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(03)00043-6)
- Фокина В.В., Суходольская Г.В., Шутов А.А., Николаева В.М., Донов М.В., Савинова Т.С., Лукашев Н.В., Суровцев В.В. // Патент РФ. 2013. № 2480475.
- Донов М.В. // Биоконверсия стероидных соединений актинобактериями. Пушкино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. 196 с. ISBN 978-5-904385-12-5.
- Kominek L.A., Wolf H.J. // Патент США. 1985. № 4524134.
- Fokina V.V., Donova M.V. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2003. V. 87. № 4–5. P. 319–325.
<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2003.10.002>
- Annen K., Petzoldt K., Laurent H., Wiechert R., Hofmeister H., Wendt H. // Патент Чехословакии. 1986. № 244147.
- Annen K., Laurent H., Hofmeister H., Petzoldt K., Wiechert R. // Патент США. 1982. № 4330541.
- Annen K., Laurent H., Hofmeister H., Topert M. // Патент США. 1986. № 4619922.
- Андриюшина В.А., Стыценко Т.С., Савинова Т.С., Скрябин Г.Г., Гриненко Г.С. // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. № 3. С. 32–39.
<https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-3-32-39>
- Савинова Т.С., Казанцев А.В., Лукашев Н.В., Аринбасарова А.Ю., Степанов А.И., Скрябин Г.А. // Патент РФ. 2008. № 2337918.
- Wang M., Zhang L., Shen Y., Ma Y., Zheng Y., Luo J.J. // Mol. Cat. B: Enzymatic. 2009. V. 59. № 1–3. P. 58–63.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.12.017>
- Zhang L., Wang M., Shen Y., Ma Y., Luo J. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2009. V. 159. № 3. P. 642–654.
<https://doi.org/10.1007/s12010-008-8499-2>
- Hesselink P.G.M., van Vliet S., de Vries H., Hesselink B.W. // Enz. Microb. Technol. 1989. V. 11. № 7. P. 398–404.
[https://doi.org/10.1016/0141-0229\(89\)90133-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(89)90133-6)
- Udvardy N.E., Bartho I., Hantos G., Trinn M., Vida Z., Szejtli J., Stadler A., Habon I., Balazs M. // Патент США. 1985. № 4528271.
- Shtratnikova V.Yu., Schelkunov M.I., Fokina V.V., Bragin E.Y., Shutov A.A., Donova M.V. // BMC Biotechnology, 2021. V. 21. № 7.
<https://doi.org/10.1186/s12896-021-00668-9>
- Rohman A., Dijkstra B.W. // Biotechnol. Adv. 2021. V. 49. 107751.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107751>
- Савинова Т.С., Казанцев А.В., Лукашев Н.В. // Патент РФ. 2018. № 2663484.
- Buhler D.R., Thomas R.C. Jr., Schlagel C.A. // Endocrinology. 1965. V. 76. № 5. P. 852–864.
<https://doi.org/10.1210/endo-76-5-852>
- Fourmentin S., Crini G., Lichtfouse E. // Cyclodextrin-Steroid Interactions and Applications to Pharmaceuticals, Food, Biotechnology and Environment. Springer, 2018. P. 19–57.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-76162-6_2

26. Donze C., Coleman A.W. // Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem. 1993. V. 16. № 1. P. 1–15.
<https://doi.org/10.1007/bf00708758>
27. Thi T.D., Nauwelaerts K., Froeyen M., Baudemprez L., Van Speybroeck M., Augustijns P. et al. // J. Pharm. Sci. 2010. V. 99. P. 3863–3873.
<https://doi.org/10.1002/jps.22227>
28. Rinaldi L., Binello A., Stolle A., Curini M., Cravotto G. // Steroids. 2015. V. 98. P. 58–62.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.02.016>
29. VanEtten R.L., Clowes G.A., Sebastian J.F., Bender M.L. // J. Am. Chem. Soc. 1967. P. 3253–3262.
30. Fokina V.V., Karpov A.V., Sidorov I.A., Andrijushina V.A., Arinbasarova A.Y. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 6. P. 645–649.
<https://doi.org/10.1007/s002530050989>
31. Arinbasarova A.Y., Medentsev A.G., Akimenko V.K., Koshcheenko K.A., Skryabin G.K. // J. Steroid Biochem. 1985. V. 23. № 3. P. 307–312.
[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90409-1](https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90409-1)
32. Безбородов А.М., Загустина Н.А. // Прикл. биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 4. С. 347–373.
<https://doi.org/10.7868/S0555109914040187>
33. Самойлова Ю.В., Сорокина К.Н., Пилигаев А.В., Пармон В.Н. // Катализ в промышленности. 2018. Т. 18. № 6. С. 61–73.
<https://doi.org/10.18412/1816-0387-2018-6-61-73>
34. Röttig A., Steinbüchel A. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2013. V. 77. № 2. P. 277.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-13>
35. Jarho P., Velde D.V., Stella V.J. // J. Pharm. Sci. 2000. V. 89. № 2. P. 241–249.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200002\)89:2<241::AID-JPS11>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200002)89:2<241::AID-JPS11>3.0.CO;2-0)
36. Arun R., Ashok K.C.K., Sravanthi V.V.N.S.S. // Sci Pharm. 2008. V. 76. P. 567–598.
<https://doi.org/10.3797/scipharm.0808-05>
37. Das S.K., Rajabalaya R., David Sh., Gani N., Khanam J., Nanda A. // RJPBCS. 2013. V. 4. № 2. P. 1694–1720.

Microbial 1,2-dehydrogenation of 6 Alpha-Methylhydrocortisone 11-trifluoroacetate

T. S. Savinova^{a,*}, A. Yu. Arinbasarova^b, A. V. Kazantsev^c, O. S. Savinova^d, and N. V. Lukashev^c

^a *Erismas FSCH of Rospotrebnadzor, Mytishchi, 141014 Russia*

^b *Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Federal Research Center “Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Science”, Pushchino, 142290 Russia*

^c *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow, 119991 Russia*

^d *Bach Institute of Biochemistry, Biotechnology Research Center of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

*e-mail: tatiana_savinova@rambler.ru

Transformation of 11-trifluoroacetate 6 α -methylhydrocortisone (11-TFA MHC) by cells of actinobacteria *Arthrobacter* (*Nocardioides*) was carried out in the presence of α -cyclodextrin (α -CD). The composition and dynamics of the transformation products accumulation in the culture medium at various pH values and the ratio of α -CD/substrate were studied. It was shown that the addition of α -CD to the transformation medium at pH less than 7 promotes an increase in the rate of 1,2-dehydrogenation with the formation of 6 α -methylprednisolone 11-trifluoroacetate (11-TFA MPL). At pH over 7, the primary process is the hydrolysis of the 11 β -trifluoroacetyloxy group. In this case, the participation of α -CD in these processes as an acceptor of the trifluoroacetyl ion is not excluded.

Keywords: 6 α -methylhydrocortisone 11-trifluoroacetate, 6 α -methylprednisolone 11-trifluoroacetate, 6 α -methylprednisolone, 1,2-dehydrogenation, *Arthrobacter*, *Nocardioides*, α -cyclodextrin

ПАМЯТИ ЛЕНЫ ИВАНОВНЫ ВОРОБЬЁВОЙ (1.06.1931–22.06.2023)

DOI: 10.31857/S0555109923060235, EDN: YWPBMT



22 июня 2023 года скоропостижно скончалась доктор биологических наук, профессор кафедры микробиологии Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова Лена Ивановна Воробьева.

Воробьева Лена Ивановна — заслуженный профессор Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, ученый с мировым именем, лауреат конкурса “Грант Москвы” в области естественных наук, почетный работник высшего профессионального образования, член Международного комитета “Food Micro” и национальный представитель Международного комитета по пищевой микробиологии и гигиене, награждена международной премией “За вклад в науку” (Цюрих, 2002).

Л.И. Воробьева окончила биолого-почвенный факультет МГУ, аспирантуру в Институте микробиологии АН СССР, защитив в 1958 г. кандидатскую диссертацию. С 1958 по 1963 гг. работала в том же Институте в качестве научного сотрудника. В марте 1963 г. по предложению академика В.Н. Шапошникова приглашена на должность доцента на кафедру микробиологии, где работала в течение 57 лет.

Успешно совмещая преподавательскую работу с научной в 1973 г. защитила докторскую диссертацию и получила звание профессора кафедры. В течение 28 лет читала курс “Общая микробиология” для студентов биологического факультета, спецкурсы “Промышленная микробиология”, “Археи”. Указанные курсы лекций прочитаны профессором Л.И. Воробьевой на Кубе для преподавателей Гаванского университета, в Словакии — студентам Политехнического Института Братиславы, а также в Индии.

Под руководством профессора Л.И. Воробьевой создана научная школа микробиологов-физиологов, главным объектом исследования которых стала уникальная группа микроорганизмов, которую представляют пропионовокислые бактерии — оригинальный объект фундаментальных исследований, широко используемый в народном хозяйстве. Эту школу прошли более 70 дипломников и 33 аспиранта, защитившие кандидатские диссертации. Два ее сотрудника стали докторами наук. Бывшие ученики профессора Л.И. Воробьевой работают как в России, так и в Канаде, Египте, Иране, Вьетнаме, США и Индии.

Л.И. Воробьева — автор 8 книг, в том числе 4 учебных пособий и 4 монографий, 235 научных статей, опубликованных в отечественных и зару-

бежных журналах. Монография “*Propionibacteria*” (290 с.) издана в Нидерландах.

Лена Ивановна Воробьёва — блестящий исследователь, прекрасный преподаватель, всегда пользовалась большим уважением студентов, аспирантов и коллег по работе. Коллег всегда удивляла ее жизненная энергия, талант, который проявлялся во многих других областях, будь то научные изыскания, литература, художественное творчество,

дизайн. Ею написана и издана трилогия мемуаров, достойная руки профессионального журналиста. Она всегда останется в нашей памяти и будет примером служения науке, образцом трудолюбия, милосердия и мудрости.

Редколлегия журнала

Кафедра микробиологии биофака МГУ

ФИЦ “Биотехнологии” РАН