

ISSN 0233-4755

Том 40, Номер 1

Январь - Февраль 2023



БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

*Журнал мембранной
и клеточной биологии*



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 1, 2023

ОБЗОРЫ

Роль липидных доменов и физических свойств мембран в развитии возрастных нейродегенеративных заболеваний

В. Д. Краснобаев, О. В. Батищев

3

Механочувствительные каналы: история, многообразие, механизмы

С. Сухарев, А. Анишкин

19

Клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора

*Е. Е. Копылова, Е. А. Воронова, Н. В. Кабанова, О. А. Рогачевская,
М. Ф. Быстрова, С. С. Колесников*

43

Два типа клеточных биосенсоров серотонина

О. А. Рогачевская, А. П. Черкашин, Е. Е. Копылова, М. Ф. Быстрова

55

Выработка активных форм кислорода генетически кодируемыми фотосенсибилизаторами 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG внутри живых клеток

Г. М. Прошкина, Е. И. Шрамова, С. М. Деев

61

Таргетные липосомы, нагруженные ДНК-миметиками, для направленной элиминации опухолевых клеток

Е. И. Шрамова, Г. М. Прошкина, С. М. Деев

66

Влияние ауксина на жирнокислотный состав и активность АЦИЛ-липидных десатураз в проростках яровой пшеницы *Triticum aestivum* L.

Н. П. Ковалевская

71

Contents

Vol. 40, No. 1, 2023

REVIEWS

The Role of Lipid Domains and Physical Properties of Membranes in the Development of Age-Related Neurodegenerative Diseases <i>V. D. Krasnobaev, O. V. Batishchev</i>	3
Mechanosensitive Channels: History, Diversity, and Emerging Mechanisms <i>S. Sukharev, A. Anishkin</i>	19

Cell Lines with a Single Functional Isoform of the IP ₃ Receptor <i>E. E. Kopylova, E. A. Voronova, N. V. Kabanova, O. A. Rogachevskaja, M. F. Bystrova, S. S. Kolesnikov</i>	43
Two Types of Cellular Serotonin Biosensors <i>O. A. Rogachevskaja, A. P. Cherkashin, E. E. Kopylova, M. F. Bystrova</i>	55
Production of Reactive Oxygen Species by Genetically Encoded Photosensitizers 4D5scFv-miniSOG and DARPin-miniSOG in Living Cells <i>G. M. Proshkina, E. I. Shramova, S. M. Deyev</i>	61
Targeting Liposomes Loaded with DNA Mimetics for the Directional Elimination of Tumor Cells <i>E. I. Shramova, G. M. Proshkina, S. M. Deyev</i>	66
Effect of Auxin on Fatty Acid Composition and Activity of Acyl-Lipid Desaturases in Sprouts of Spring Wheat <i>Triticum aestivum</i> L. <i>N. P. Kovalevskaya</i>	71

УДК 577.352.26

РОЛЬ ЛИПИДНЫХ ДОМЕНОВ И ФИЗИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАН В РАЗВИТИИ ВОЗРАСТНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2023 г. В. Д. Краснобаев^{a, b}, О. В. Батищев^{a, *}

^aИнститут физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН,
Москва, 119071 Россия

^bМосковский физико-технический институт (НИУ),
г. Долгопрудный, 141701 Россия

*e-mail: olegbati@gmail.com

Поступила в редакцию 03.08.2022 г.

После доработки 31.08.2022 г.

Принята к публикации 01.09.2022 г.

Растущее количество исследований указывает на взаимосвязь развития нейродегенеративных заболеваний со структурой и липидным составом мембран нейронов. Одними из элементов структуры клеточных мембран, которым в этой связи уделяется особое внимание, являются жидко-упорядоченные липидные домены, или рафты. Изучение рафтов и возрастных изменений липидного состава нейрональных клеток становится все более актуальным и постоянно пополняется новыми исследованиями. В данном обзоре мы постарались осветить возможную роль липидной компоненты клеточных мембран, их структуры и физико-химических характеристик в развитии заболеваний, связанных со старением. Рассматриваются свидетельства, подтверждающие возможную роль рафтов при заболеваниях, приводящих к долговременным нарушениям функционирования нейронов. Есть основания предполагать, что терапевтические эффекты различных молекул, таких как лизолипиды и ганглиозиды, обусловлены их физико-химическими свойствами и реализуются опосредованно, через влияние на организацию липидных доменов в мембранах. По мере более полного определения роли липидных доменов и вообще механизмов взаимодействия и взаимного влияния липидного состава и развития заболеваний, эти знания можно будет использовать для разработки новых терапевтических или профилактических методов борьбы с заболеваниями, связанными со старением.

Ключевые слова: нейродегенеративные заболевания, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, липидные мембраны, рафты, лизолипиды, ганглиозиды, холестерин, белок-предшественник бета-амилоида, A β -пептид

DOI: 10.31857/S023347552301005X, EDN: NTTUMF

ВВЕДЕНИЕ

Значительное увеличение средней продолжительности жизни в мире, произошедшее за последние 100 лет, вывело на передний план проблему возрастных нейродегенеративных заболеваний. По данным Всемирной организации здравоохранения, в настоящее время около 8% населения Земли старше 60 лет страдает теми или иными формами деменции, и этот показатель может удвоиться к 2030 году. При этом наше понимание причин развития нейродегенеративных заболеваний все еще недостаточно. Так, например, болезнь Альцгеймера в настоящее время является самым распространенным нейродегенеративным заболеванием в мире (каждые три секунды обнаруживается новый пациент с этим диагнозом), что приводит к колоссальному ущербу для экономи-

ки. На сегодняшний день не существует ни способа лечения этой болезни, ни возможности ее диагностирования на ранних стадиях, а используемые для борьбы с ней терапевтические стратегии могут лишь незначительно замедлить скорость ее развития. Последние исследования ставят под сомнение распространенные в течение последних 16 лет представления о ключевой роли олигомерной формы бета-амилоидного пептида в механизмах возникновения болезни Альцгеймера. В июле 2022 года в журнале Science была опубликована статья, согласно которой наличие особых форм амилоидных олигомеров, являющееся подтверждением основной гипотезы развития болезни Альцгеймера, с большой вероятностью является результатом недобросовестности авторов [1]. Поэтому становится ясна причина неэффективно-

сти клинических испытаний, пытавшихся через таргетное воздействие на бета-амилоид (монотерапию) вылечить заболевание [2].

Одновременно с этим растущее количество свидетельств указывает на связь развития различных нейродегенеративных заболеваний со структурой и липидным составом мембран нейрональных клеток. В связи с этим особое внимание уделяется жидко-упорядоченным липидным доменам, или рафтам [3, 4]. Поэтому изучение рафтов и возрастных изменений липидного состава нейрональных клеток становится все более актуальным и постоянно пополняется новыми исследованиями различного характера, результаты которых часто противоречат друг другу [5–9]. Тем не менее эти работы действительно показывают взаимосвязь развития возрастных нейродегенеративных заболеваний с процессами, влияющими и на липидный состав мембраны, и на ее физико-химические свойства. В данном обзоре мы постарались осветить возможную роль липидной компоненты клеточных мембран, их структуры и физико-химических характеристик в развитии заболеваний, связанных со старением.

ЖИДКО-УПОРЯДОЧЕННЫЕ ЛИПИДНЫЕ ДОМЕНЫ (РАФТЫ)

Гетерогенность липидного состава клеточных мембран приводит к тому, что даже при физиологических значениях температуры в них могут формироваться более упорядоченные липидные домены (рафты), отличающиеся по структуре и свойствам от остальной части мембраны [10–12]. Эти домены влияют на функционирование различных клеточных белков [13–16], участвуют в передаче сигналов в клетке [17, 18], процессах эндоцитоза [19] и экзоцитоза при синаптической передаче [20–22]. Было показано, что ассоциация ряда нейрональных мембранных белков с липидными рафтами необходима для активации сигнальных каскадов [23–25]. По этой причине рафты могут играть важную роль в передаче сигнала в нервных клетках и значительно влиять на нейрональные функции [26].

Впервые липид-белковые домены в мембранах клеток были обнаружены в 1973 году в печени кролика с помощью метода спиновых меток [27]. В 1982 году Клаузнер и Карновский выпустили статью, в которой проанализировали данные экспериментов, свидетельствующих о наличии в мембране липидных доменов с использованием различных методов: рентгеновской дифракции, электронной микроскопии, диффузионных и калориметрических измерений [28]. Обнаруженные домены различались по составу; один из типов доменов характеризовался повышенным (по сравнению с окружающей мембраной) содержанием холестерина и сфинголипидов. Такие домены

формируются из-за того, что данные липиды собираются в отдельную фазу, что было продемонстрировано с помощью калориметрических измерений на модельных мембранах [29]. Следующим шагом было обнаружение таких доменов с помощью рентгеновской дифракции и нескольких методов флуоресцентной микроскопии [30].

Позже Кай Симмонс и Геррит ван Меер исследовали домены клеточных мембран, обогащенные холестерином, гликолипидами и сфинголипидами [11]. Они заинтересовались такими доменами, чтобы объяснить механизм переноса холестерина в эпителиальной клетке из комплекса Гольджи внутри клетки в наружную мембрану клетки. Впоследствии они назвали эти домены липидными “рафтами” (от английского raft — плот). Идея была разработана в 1997 году Симмонсом и Элиной Иконен [13]. В своей статье, ставшей одной из фундаментальных для дальнейшего изучения рафтов, они подробно обсудили специфическую растворимость рафтов, а также основания для следующих предполагаемых функций рафтов в клетке:

1. Мембранный транспорт

о биосинтетический — перенос различных липидных и белковых молекул внутри клетки (главным образом изнутри на клеточную мембрану);

о эндоцитозный — захват наружной мембраны клетки различными специфическими веществами.

2. *Транспортная селективность.* В процессе биосинтетического транспорта из комплекса Гольджи на мембрану идут два принципиально разных пути с разными промежуточными этапами, которые, по-видимому, определяются благодаря различию между рафтовыми и нерафтовыми везикулами.

3. *Передача сигнала* — накопление различных сигнальных молекул в силу особенностей состава и структуры рафта.

На симпозиуме 2006 года по липидным рафтам и их клеточным функциям сами рафты были формально определены как малые (10–200 нм), гетерогенные, высокодинамичные, обогащенные стеринами и сфинголипидами домены, которые опосредуют клеточные процессы. Небольшие рафты иногда взаимодействуют с образованием более крупных платформ посредством белок-белковых и белок-липидных взаимодействий [15].

В последние годы исследования липидных рафтов, в частности размер и время жизни рафтов, остаются предметом дискуссий [5]. Экспериментальные наблюдения макроскопических доменов в модельных мембранах с составом, подобным липидному составу внешнего монослоя плазматических мембран, свидетельствуют в пользу идеи липидных доменов [31–33]. Однако в модельных системах липидные домены находились в жидком, но более упорядоченном состоянии,

чем окружающая мембрана. Это состояние часто называется в литературе жидко-упорядоченной фазой (L_o , liquid-ordered). Попытки оптически визуализировать липидные домены в клетке не привели к успеху [34]. Авторы отмечают, что при оптическом наблюдении разрешение определяется пределом дифракции света, и неоднородности размером менее сотен нанометров обнаружить невозможно. Другим важным фактором для существования рафтов и фазового разделения является температура. Отмечено, что характерная критическая температура мембраны составляет около 20°C [33], т.е. при более высоких температурах, например температуре человеческого тела, фазовое разделение невозможно. Однако, даже если физиологическая температура слишком высока для полного фазового разделения липидной подсистемы, домены упорядоченной фазы все еще могут образовываться локально, например, вокруг мембранных белков благодаря эффекту “смачивания” [35, 36]. Другой моделью формирования рафтов является флуктуационная модель, предполагающая, что рафты представляют собой локальные флуктуации состава мембран, в результате которых на короткие промежутки времени собираются упорядоченные липидные домены [33].

Несмотря на вышеупомянутые трудности, исследования показывают, что липидные домены играют важную роль во многих клеточных процессах, таких как эндо- и экзоцитоз, апоптоз и т.д., а также при вирусном инфицировании клетки [37–42]. Роль липидных доменов отмечается в функционировании множества рецепторных систем [43]. Например, в работе рецептора иммуноглобулина E [44], белка инсулиноподобного фактора роста (IGF – insulin-like growth factor), роль липидных доменов заключается не только в расположении самого рецептора IGF-IR внутри упорядоченной фазы, но и в накоплении его сигнальных молекул [45]. Также известно о связывании с рафтами сигнальных молекул и самого комплекса Т-клеточного рецептора [46, 47] и В-клеточного рецептора [48]. О роли рафтов в различных процессах, непосредственно связанных с развитием нейродегенеративных заболеваний, речь пойдет в следующих разделах обзора.

Отметим, что жидко-упорядоченные липидные домены, или рафты, – не единственный фактор неоднородности биомембран. Например, плазматическая мембрана эукариот соединена с цитоскелетом посредством множества опорных белков, создающих таким образом более плотные участки мембраны [49]. Одним из наиболее изученных подобных мембранных каркасов является плазматическая мембрана эритроцитов, белковый каркас которой организован в виде правильной гексагональной решетки [50]. Известно также об относительно стабильных доменах,

сформированных белками, связанными с гликозилфосфатидилинозитолом [51], и множестве других структур и моделей функциональных неоднородностей мембран [52]. В данном обзоре рассматриваются физико-химические свойства жидко-упорядоченных липидных доменов, обогащенных сфинголипидами и холестерином, и их взаимодействия с различными молекулами. Мы будем использовать термины “рафты” и “липидные домены” как синонимы.

РОЛЬ СТРУКТУРЫ И СОСТАВА ЛИПИДНОГО МАТРИКСА КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН В РАЗВИТИИ ВОЗРАСТНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Болезнь Альцгеймера (БА) является самым распространенным нейродегенеративным заболеванием в мире. Хотя прошло более 100 лет с тех пор, как впервые были описаны симптомы этой болезни [53], все еще мало известно о последовательности явлений, которые приводят к ее развитию. В настоящее время установлено, что амилонный пептид (бета-амилоид, или A β), который агрегирует с образованием амилоидных бляшек в головном мозге, является продуктом последовательного расщепления мембранного гликопротеина, белка-предшественника бета-амилоида (PBA или APP, amyloid-precursor protein) β - и γ -секретазами в плазматической мембране нейронов [54]. Трансмембранный гликопротеин APP экспрессируется почти во всех изученных в настоящее время клетках животных. Хотя существуют тысячи исследований, посвященных изучению APP, его клеточные функции еще не выяснены до конца. Недавно было сделано несколько предположений, а именно, что APP является рецептором холестерина в рафтах мембран нейронов [55, 56], регулирует метаболизм железа в нейронах [57, 58], а также в некотором смысле является одним из компонентов врожденной иммунной системы в нервной системе человека [59, 60].

При БА изменяется соотношение A β -пептидов разной длины, и их количество сильно увеличивается, что впоследствии приводит к формированию амилоидных бляшек, образование которых основано на структурном изменении бета-амилоида [61]. Именно с образованием бляшек обычно связывают изменения в тканях при БА. Однако в настоящее время также имеются экспериментальные данные о том, что некоторые формы A β оказывают слабое токсическое действие еще до образования фибрилл и бляшек [62, 63]. Согласно ряду исследований, нейротоксическое действие зависит от степени агрегирования молекул A β [64]. При этом во множестве работ не было найдено свидетельств того, что сами по себе амилоидные бляшки являются патогенными: во-первых, они могут присутствовать и в тканях людей, не

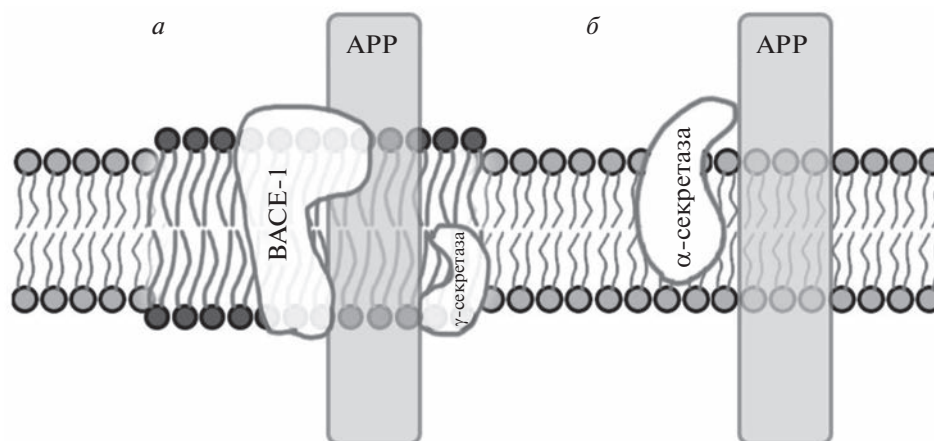


Рис. 1. Взаимодействие APP с ферментами в зависимости от положения в мембране: *а* — APP в рафте, *б* — APP вне рафта.

страдающих БА, во-вторых, клинические исследования показали, что воздействия, направленные на устранение амилоидных бляшек, не приносят удовлетворительных терапевтических результатов [65–67]. В связи с этим в настоящее время существует две точки зрения: болезнь Альцгеймера либо никак не связана с Аβ, либо связана, но не на этапе формирования бляшек.

Несмотря на определенные успехи в структурных и динамических исследованиях Аβ пептидов, подробный молекулярный механизм инициирования их образования из APP еще не предложен, а результаты и выводы различных исследовательских групп не всегда согласуются друг с другом. Вопрос о структуре, динамике и характере димеризации фрагментов APP в норме и патологии остается открытым. Нет определенности и в понимании конформационных перестроек мембранных фрагментов APP после их расщепления в мембране даже в мономерном состоянии: например, разворачивается ли С-концевая часть спирали, или сегмент с околосмембранной областью в виде амфифильной спирали последовательно погружается в мембрану. APP имеет, по всей видимости, два типа процессинга: неамилоидогенный (участвует в регуляции нейронных функций: регулирует возбудимость, синаптическую пластичность, рост и выживание клеток) и собственно амилоидогенный, в котором образуются свободные пептиды Аβ, состоящие, как правило, из 38–43 аминокислот. Примечательным в данном случае является то, что процессинг APP зависит от его локализации в рафтовой или нерафтовой части мембраны. Трансмембранный участок APP может быть расщеплен двумя основными путями: α-секретазой или ансамблем β- и γ-секретазы. При этом α-секретаза расщепляет APP, находящийся в нерафтовой фазе мембраны, а β-секретаза BACE-1 и γ-секретаза — в рафтовой (рис. 1) [68]. Отщепленные участки Аβ относятся

к белкам с природной (внутренней) неупорядоченностью (intrinsically disordered proteins, IDP [69]), и во внеклеточной водной среде они формируют структуры с большим количеством бета-листов, которые составляют большую часть тех самых амилоидных бляшек [70]. Примечательно, что более половины мутаций семейства APP, которые связывают с предрасположенностью к болезни Альцгеймера, происходят именно в его трансмембранном домене, приблизительно соответствующем остаткам 700–723 белка APP (например, мутации A713V, T714I/A, V717F/I/L/G), а также часть на мембранной области 688–694, которая располагается в виде амфифильной альфа-спирали сразу после металл-связывающего домена (например, мутации A692G, E693Q/K/G, D694N) [71–73]. Таким образом, выяснение пространственной структуры трансмембранных фрагментов APP, мутации в которых коррелируют с развитием БА, все еще является актуальной темой исследований, необходимых для выявления молекулярных механизмов начальных стадий патогенеза данной болезни.

Помимо образования амилоидных бляшек, другие аспекты нейротоксичности продуктов последовательного протеолиза белка APP остаются нераскрытыми, в частности неизвестен молекулярный механизм образования ион-проводящих пор бета-амилоидом [74, 75], хотя существуют молекулярные модели, основанные на экспериментальных структурных данных [76]. Формирование сквозных пор в мембранах нейронов считается одним из возможных механизмов нейротоксичности бета-амилоидов. По результатам различных исследований фибриллам приписываются как нейротоксичные свойства (участие в гибели нейронов по не вполне понятному механизму), так и протекторные: они рассматриваются в качестве резервуара, связывающего свободные бета-амилоиды, либо как защитная реакция организма

в попытке закрыть образующиеся под действием бета-амилоидов поры в нейрональных мембранах [74, 75].

Известно, что цепочки Аβ имеют свойство связываться с гликофинголипидами [77]. Жидко-упорядоченные липидные домены являются теми мембранными структурами, в которых содержание таких липидов выше по сравнению с остальной (жидко-неупорядоченной) мембраной. Таким образом, находящимся в межклеточном пространстве Аβ-пептидам должно быть выгодно связываться с липидными доменами в мембранах нейронов. В этом случае из-за локального повышения концентрации Аβ-пептидов по сравнению с внеклеточной средой данные пептиды, по-видимому, могут приобретать вторичную структуру амилоидной природы [78]. Кроме того, есть основания полагать, что “нормальный” процессинг APP происходит тогда, когда его трансмембранная часть располагается в жидко-неупорядоченной области мембраны, а амилоидогенный — если трансмембранная часть APP оказывается в жидко-упорядоченном домене мембраны [79, 80]. В некоторых исследованиях это объясняют относительно высоким содержанием в рафтах холестерина, уменьшение доли которого в мембране может уменьшать и количество получаемого амилоида [79]. Примечательно, что в качестве генетического фактора риска для БА была предложена дисфункция аполипопротеина E4 (apoE4) [81], роль которого заключается в перераспределении липидов между клетками и регуляции уровня холестерина в мембране.

Биофизическим исследованиям болезни Альцгеймера и, в частности, амилоидной агрегации и взаимодействию бета-амилоидов с мембранами посвящено большое количество научных работ [82–87]. Основные результаты получены в модельных системах различной степени сложности: от мицелл детергента до клеточных культур. На мицеллах, сформированных их различных детергентов, было показано, что бета-амилоиды Аβ-40 и Аβ-42, хотя и отличаются лишь двумя гидрофобными аминокислотными остатками, ведут себя совершенно различно [88]. При одних и тех же соотношениях концентраций пептида и детергента Аβ-40 формирует протяженные агрегаты — фибриллы, хорошо видимые на электронных микрофотографиях, в то время как Аβ-42 образует относительно небольшие олигомеры. При встраивании мицелл с такими олигомерами в плоскую липидную мембрану образуются сквозные поры. В большинстве случаев мембрана с реконструированными мицеллами имеет дискретные уровни проводимости, что соответствует фиксированной стехиометрии пор и олигомеров. Характерно, что при аналогичном встраивании Аβ-40 поры никогда не образовывались [88]. В этой же работе было установлено, что формирующий пору олигомер

имеет структуру бета-листа. Однако при наличии в мембране холестерина адсорбированный пептид, по-видимому, может принимать альфа-спиральную конформацию [89, 90]. Поры имеют диаметр приблизительно 1.5 нм [91] и обладают селективной проницаемостью для ионов кальция [92].

Рассмотрим возможные нарушения в работе сигнальных систем, связанных с липидными рафтами и развитием БА, но не связанных напрямую с процессами расщепления APP.

Примером липидов, которым посвящено множество работ в связи с нейродегенеративными и онкологическими заболеваниями, являются церамиды, также участвующие в формировании и регуляции работы липидных доменов [93]. Исследования указывают на повышенные уровни церамидов на самой ранней клинической стадии БА [94], некоторых случаях бокового амиотрофического склероза [95] и в общем случае с возрастом [96]. Подчеркнем, что церамид и церамид-1-фосфат, накапливающиеся в головном мозге при БА, являются производными сфинголипидов. Их накопление может активировать цитозольную фосфолипазу А₂ (сPLA₂), что приводит к изменениям текучести и проницаемости мембран, а продукты работы сPLA₂ могут стимулировать воспалительные процессы [97]. Воспалительные процессы такого рода являются характерными для БА [98], и таким образом подтверждается, что компоненты липидных рафтов, в данном случае сфинголипиды, влияют на БА в том числе и не зависимо от APP образом.

Другим примером изменений в функционировании рафтов, связанных с развитием БА, является холинергическая система (холинергический путь передачи сигнала). Холинергическая система играет важную роль в нейроиммунной коммуникации: участвует в регуляции иммунного ответа. Она включает в себя нейромедиаторы, ацетилхолин, его рецепторы (AChR) и различные ферменты [99]. Известно, что холестерин, являясь одним из основных компонентов липидных рафтов, влияет на структурные и функциональные свойства AChR [100]. Более того, липидные рафты участвуют в кластеризации AChR, необходимой для передачи сигнала, и изменения размеров и характера взаимодействия рафтов уменьшают кластеризацию и функционирование рецепторов [101]. Наконец, согласно многим исследованиям, именно гипофункция холинергической системы является одним из главных признаков БА [102–104].

Болезнь Хантингтона (БХ), характеризующаяся нейродегенерацией полосатого тела и коры головного мозга [105], обусловлена экспрессией тринуклеотида CAG в экзоне 1 гена БХ, что приводит к включению удлиненной последовательности остатков глутамина в N-концевую часть белка хантингтина (htt) [106]. Исследования

постсинаптических мембран, выделенных из мышей с моделью БХ, показали, что данный белок до появления симптомов накапливался в мембранах клеток и, как было показано впоследствии, связывался с липидными доменами [107]. Те же исследователи затем обнаружили, что мутантный htt от мышей с бессимптомной БХ более явно связывался с рафтами, чем htt дикого типа.

Болезнь Паркинсона (БП) характеризуется прогрессирующей потерей дофаминергических нейронов. Примерно у трети больных на завершающей стадии развивается деменция [108]. В то время как большинство случаев перечислены как спорадические, 10–15% имеют определенную генетическую причину, согласно исследованию В. Бонифати [109]. Всего им было определено шесть генов, мутации в которых вызывают БП. Согласно предположению автора, взаимодействие мутантного белка с липидными рафтами влияет на передачу сигнала и со временем способствует разрушению нейронов в черной субстанции (*substantia nigra*). Эта идея поддерживается наблюдениями, что по крайней мере четыре белка, мутации в которых связаны с БП, ассоциированы с рафтами. В частности, было установлено, что причиной аутосомно-доминантной БП, одной из наиболее распространенных форм наследуемой БП, являются мутации в гене LRRK2 [110]. Преобладающая мутантная форма LRRK2 (G2019S) обладает повышенной киназной активностью, вызывающей нейротоксичность [111]. Белок (мутантный и дикого типа) преимущественно локализуется в рафтах, где, согласно предположению, мутант нарушает нормальную передачу сигнала, что приводит к дегенерации нейронов *substantia nigra* [110]. Причиной редкого аутосомно-доминантного типа БП могут также являться мутации в α -синуклеине [112], а также сверхэкспрессия α -синуклеина дикого типа [113]. В то время как α -синуклеин связывается с молекулами липидов в рафтах, в частности фосфатидилсерин, имеющим остаток олеиновой кислоты и остаток полиненасыщенной жирной кислоты, мутант A30P α -синуклеин нарушает эту связь [114], что приводит к потере функции. Исследования 2007 года показали, что когда α -синуклеин связывается с ганглиозидом GM1, он способствует сворачиванию белка в α -спираль и уменьшает образование α -фибрилл синуклеина [115]. Согласно этому исследованию, GM1 оказывает подобное действие на мутант A53T α -синуклеина, однако его влияние на мутант A30P минимально. Можно предположить, что изменения в связи взаимодействий GM1–рафт могут вызывать изменения в α -синуклеине, которые способствуют симптомам БП. Это также может объяснить положительное действие GM1 на некоторых больных БП в клинических испытаниях [116].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей потерей функции двигательных нейронов в головном и спинном мозге, что приводит к параличу мышц, ответственных за произвольные движения. Известно, что только около 10% случаев обусловлены генетическими нарушениями [117]. На возможную роль липидных рафтов в БАС указывают наблюдения, что активация TrkB и экспрессия нейротрофина в мышцах крыс дифференцированно регулируется сигналами, получаемыми от моторных нейронов [118]. После разрушения рафтов с использованием метил-бета-циклодекстрина (m β CD) культура исследуемых двигательных нейронов стала нечувствительной к эксайтотоксичности BDNF. Эти наблюдения в сочетании с рядом ранних исследований, указывающих на то, что люди с двигательными невропатиями могут экспрессировать антитела к ганглиозидам [119–121], поддерживают идею о том, что нормальное функционирование липидных доменов необходимо для деятельности двигательных нейронов. Чрезмерная экспрессия BDNF, малое количество GM1 или другие изменения могут способствовать медленному снижению функциональности нейронов, что в конечном итоге приводит к гибели клеток.

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЛИПИДНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ВОЗРАСТНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Различные реакции, происходящие снаружи и внутри клетки, могут изменять липидный состав ее мембраны, например, в случае перекисного окисления липидов при воспалении и окислительном стрессе, нарушении функции белков и нарушении липидного обмена. Установлено, что эти изменения для нескольких видов липидов коррелируют с уже упомянутыми заболеваниями. Например, показано, что фосфолипиды модифицируются в мозге, пораженном БА [122]. В частности, изменения состава липидов коры головного мозга происходят на ранней стадии спорадической БА [123]. Липидный состав также изменяется в лобной и зрительной коре при БП [124–127], а в спинном мозге — при БАС [128, 129]. Существует несколько исследований, в которых сообщается об использовании изменения уровня фосфолипидов, циркулирующих в плазме крови, в качестве возможного биомаркера БА [130–132]. В частности, большое внимание привлекают лизолипиды [133].

Изменение уровня лизолипидов в клетках и в плазме крови может быть результатом окислительного стресса и воспалений, связанных с развитием нейродегенеративных заболеваний [134, 135]. Более того, хорошо известно, что высокий уровень лизолипидов способствует образованию пор в ли-

пидном матриксе клеточных мембран [136]. Однако до сих пор неясно, каким может быть действие небольшого количества лизолипидов в клетках, которые с помощью разных механизмов поддерживают целостность своих мембран за счет динамического изменения липидного состава, например, за счет изменения содержания холестерина [137]. Мембраны нейронов содержат относительно большое количество разнообразных гликолипидов, и в первую очередь, ганглиозидов [138]. В структуре Аβ-42 имеется участок 5–16, обеспечивающий связывание пептида с ганглиозидом GM1 [139]. Сам по себе короткий пептид Аβ-5–16 поры не формирует. Однако он эффективно связывает ганглиозид GM1, и при последующей добавке полноразмерного пептида Аβ-42 к клеточной культуре эффективность образования пор оказывается значительно снижена, по-видимому, за счет слабой адсорбции Аβ-42 на мембрану, не имеющей свободного ганглиозидов. Схожий эффект достигается при подавлении синтеза ганглиозидов в клетках [140].

Состав ганглиозидов в тканях головного мозга также подвержен возрастным изменениям [141–143]. В целом, содержание ганглиозидов постепенно снижается с возрастом, с некоторой дифференциацией по разделам головного мозга. Интересно, что в масштабном исследовании испытуемых в возрастном диапазоне от 20 до 100 лет общее содержание ганглиозидов оказалось примерно постоянным в период от 20 до 70 лет, однако менялось соотношение различных молекул ганглиозидов, а именно — наблюдалось уменьшение доли GM1 и GD1a [138]. GM1 является важным регуляторным липидом, и изменение его уровня связано с нейродегенеративными расстройствами, особенно с БА [145–147], и индуцированным опухолью апоптозом Т-клеток [148]. Кроме того, GM1 может быть фактором, способствующим агрегации Аβ на плазматической мембране [149–151].

В работах [91, 152] было показано, что в структуре Аβ-42 имеется участок 22–35, ответственный за связывание с холестерином за счет образования водородной связи с его ОН-группой. Более эффективное связывание Аβ-42 с мембраной, содержащей холестерин, было также продемонстрировано методами молекулярной динамики [153]. Было показано, что короткий пептид Аβ-22–35 способен самостоятельно формировать поры в мембранах клеток SH-SY5Y [90]. Если из мембран предварительно частично удалить холестерин, то поры под действием как Аβ-22–35, так и Аβ-42 образуются значительно реже [140]. В работе [91] показано, что структурно схожий с холестерином бексаротен (bexarotene) может конкурентно связываться с участком 22–35. При инкубации клеток с бексаротеном в концентрации 220 нМ эффективность порации мембран коротким пептидом Аβ-22–35 снижалась приблизи-

тельно в 10 раз, а эффективность порации полноразмерным пептидом Аβ-42 снижалась в 2 раза.

На основании данных о структуре Аβ-42 в работе [140] была предложена так называемая двойная терапевтическая стратегия, направленная на подавление связывания Аβ-42 как с ганглиозидом GM1, так и с холестерином. Для этого предлагалось применять химерный пептид Аβ-5–16, связывающий практически весь свободный ганглиозид на мембране, а также бексаротен, конкурирующий с холестерином за связывание с Аβ-42. Было показано, что инкубация клеток SH-SY5Y с химерным пептидом Аβ-5–16 снижает эффективность образования пор полноразмерным Аβ-42 приблизительно в 3 раза, инкубация с бексаротеном — в 2 раза [90], а “двойная инкубация” как с химерным пептидом, так и с бексаротеном — в 10 раз. Однако, хотя предложенная стратегия оказалась эффективна в культуре клеток SH-SY5Y, ее применение для профилактики и лечения БА, по-видимому, практически не осуществимо. Ганглиозид GM1 является линейно-активным веществом: даже в малых концентрациях (доли мольных процентов) он способен существенно (на порядок) изменять граничную энергию мембранных доменов, участвующих в передаче клеточных сигналов [154, 155], что, в свою очередь, приводит к значительному изменению распределения доменов по размерам. Кроме того, установлено, что вызываемые ганглиозидами изменения физико-химических свойств мембранных доменов могут приводить к запуску апоптоза клеток [138, 156, 157]. Связывание ганглиозидов химерными пептидами в рамках применения терапевтической стратегии, вероятнее всего, приведет к хаотической потере нейронами их функций или гибели вследствие глобальной перестройки сложного равновесия мембранных доменов. Поскольку бексаротен в относительно высокой концентрации (220 нМ) снижает эффективность образования пор Аβ-42 всего в 2 раза, для эффективной защиты нейронов необходимо использование более высоких концентраций бексаротена. Согласно результатам работ [158, 159], замена холестерина его ближайшим аналогом и метаболическим предшественником 7-дегидрохолестерином, отличающимся от холестерина лишь одной двойной связью, приводит к значительным изменениям динамики мембранных доменов. Если домены, образованные в мембране, содержащей холестерин, сливаются практически при каждом столкновении, то после замены холестерина на 7-дегидрохолестерин домены при столкновениях не сливаются и не расходятся, образуя протяженные цепные агрегаты круглых доменов. Накопление 7-дегидрохолестерина у человека происходит при синдроме Смита–Лемли–Опица, проявление которого варьирует от мягких нарушений поведения и проблем с обучением до летального исхода.

Таким образом, эффективность интенсивной терапии нейронов высокими концентрациями бексаротена, структурно схожего с холестерином, сомнительна.

Липидные рафты представляют собой динамические структуры, обогащенные липидами с насыщенными углеводородными цепями (в основном, сфингомиелином) в комплексе с холестерином [13, 31, 160, 161]. Они толще остальной части мембраны [160, 162, 163], и потому на их границе возникают деформации мембраны, призванные минимизировать контакт гидрофобной части липидного бислоя с водой. Кроме того, различия в плотности упаковки и составе рафта и окружающей мембраны приводят к различию химических потенциалов липидов внутри домена и вне его. Сумма этих вкладов в свободную энергию системы, отнесенная к длине границы липидного домена, называется линейным натяжением [31, 32]. Линейное натяжение регулирует равновесные размеры и форму рафтов и зависит от химической структуры липидов и состава мембраны [159, 164]. По сути, этот энергетический параметр представляет собой двумерный аналог поверхностного натяжения, и существуют липидные компоненты, аккумулирующиеся на границе рафтов и действующие как двумерные поверхностно-активные вещества. Такие молекулы были названы линейно-активными компонентами [165, 166], и они, в зависимости от концентрации, могут значительно изменять размеры рафтов в мембране. Ранее было показано, что вблизи границы липидного домена существует переходная зона размером несколько нанометров, в пределах которой монослой рафта смещены друг относительно друга [167]. Амфифильным молекулам с определенной геометрией, а именно большей полярной частью по сравнению с гидрофобной, энергетически выгодно накапливаться в этих зонах, за счет чего они способны значительно изменять линейное натяжение и размеры рафтов, присутствуя в мембране в достаточно малых количествах [155, 168]. Характерным примером таких молекул является моносиалганглиозид GM1, широко встречающийся в нервных клетках [169], и, как было показано, способный вызывать агрегацию бета-амилоидов [170]. Этот гликолипид может значительно изменять характерные размеры рафтов, причем в концентрациях порядка десятых долей мольного процента [154, 155]. Этот процесс зависит от соотношения между количеством основных рафтовых липидов, сфингомиелина и холестерина. При низком относительном содержании холестерина линейное натяжение границы рафтов и, соответственно, их размер снижаются с ростом концентрации ганглиозида [154]. При более высоком относительном содержании холестерина линейное натяжение снижается при увеличении концентрации GM1 до 0.5 мол. %, а затем повышается, превосходя зна-

чения для системы без ганглиозида [155]. Такое поведение системы может объяснить наблюдаемые противоречия в функциях ганглиозида при развитии БА: с одной стороны, кластеры GM1 могут вызывать формирование амилоидных фибрилл [170], с другой — ганглиозид GM1 в малых концентрациях может выполнять и нейропротекторную функцию [171, 172]. Если в мембране наблюдается избыток сфингомиелина, равно как и других липидов с насыщенными углеводородными хвостами, по отношению к холестерину, то присутствие ганглиозида, имеющего высокое сродство к липидным доменам, приведет к практически полному исчезновению рафтов [154] и, как следствие, формированию кластеров ганглиозида, вызывающих амилоидную агрегацию, даже при физиологических концентрациях [151, 173]. С другой стороны, при равных долях сфингомиелина и холестерина в мембране рафты в присутствии GM1 должны укрупняться [155], что будет препятствовать образованию кластеров ганглиозида и мешать формированию амилоидных фибрилл. Таким образом, возрастные и патологические изменения содержания холестерина, сфингомиелина и насыщенных липидов в мембранах нейрональных клеток [26] могут изменять роль GM1 с нейропротекторной на амилоидогенную по рафтозависимому механизму.

Как уже было сказано выше, влияние GM1 на морфологию рафтов определяется в основном его молекулярной геометрией, а именно соотношением размеров полярной и гидрофобной частей молекулы, за счет которых данный гликолипид, располагаясь в переходной зоне вблизи границы рафта, может заметно влиять на его размеры. Аналогичным образом любые амфипатические пептиды должны собираться вблизи границы липидных доменов в мембране, причем такое сродство будет регулироваться соотношением числа гидрофобных и полярных аминокислот в структуре пептида. Если на границе рафтов происходит аккумуляция бета-амилоидов, то этот процесс будет способствовать росту амилоидных фибрилл в этих зонах, причем, как и в случае с ганглиозидами, этот процесс будет зависеть от липидного состава мембраны.

Лизолипиды имеют только один углеводородный хвост в каждой молекуле вместо двух, как у обычных липидов. Следовательно, аналогично ганглиозидам, монослой лизолипидов будут характеризоваться более высокой положительной спонтанной кривизной, чем таковые из обычных липидов и, согласно предложенному механизму, также должны влиять на линейное натяжение границы липидных доменов. Таким образом, с физической точки зрения их влияние на распределение размеров липидных доменов должно быть сходно с влиянием GM1. Эта гипотеза согласуется с имеющимися экспериментальными сви-

детельствами влияния лизофосфолипидов непосредственно на образование жидко-упорядоченных доменов в липидных мембранах [174, 175].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в настоящем обзоре исследования указывают на возможную роль рафтов и состава липидного матрикса клеточных мембран при заболеваниях, которые приводят к нарушению функционирования нейронов. Из этих работ следует, что изменения структуры липидных рафтов могут привести к нарушениям в передаче сигнала и, как следствие, к гибели клеток. В этом контексте мы находимся в начале пути к пониманию возможной связи некоторых мутаций и болезней, обусловленных ими. Можно видеть, что изменения содержания холестерина и гликолипидов в мембранах могут существенно влиять на функционирование клеток. Так, изменения концентрации холестерина в клетках коррелируют с повреждением нейронов [176, 177]; ганглиозиды, присутствующие в высокой концентрации в сером веществе мозга, участвуют в развитии нейродегенеративных заболеваний [178–180]. Хотя причинно-следственная связь возрастных изменений липидного состава мембран нейрональных клеток и развития нейродегенеративных заболеваний пока не установлена, есть основания предполагать, что различные молекулы, такие как обсужденные выше лизолипиды и ганглиозиды могут оказывать терапевтическое действие, обусловленное их физическими свойствами (в данном случае, например, выраженной положительной спонтанной кривизной монослоя их молекул), и их влияние на развитие заболеваний опосредовано организацией липидных доменов в мембранах клеток.

По мере более полного определения роли липидных доменов и вообще механизмов взаимодействия и взаимного влияния липидного состава и развития заболеваний, эти знания можно будет использовать для разработки новых терапевтических или профилактических методов борьбы с заболеваниями, связанными со старением.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pillar C. 2022. Blots on a field? *Science*. **377**, 358–363.
2. Lobello K., Ryan J.M., Liu E., Rippon G., Black R. 2012. Targeting beta amyloid: A clinical review of immunotherapeutic approaches in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2012**, e628070.
3. Schengrund C.-L. 2010. Lipid rafts: Keys to neurodegeneration. *Brain Res. Bull.* **82**, 7–17.
4. Mollinedo F., Gajate C. 2015. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 130–146.
5. Munro S. 2003. Lipid rafts: Elusive or illusive? *Cell*. **115**, 377–388.
6. Levental I., Levental K.R., Heberle F.A. 2020. Lipid rafts: Controversies resolved, mysteries remain. *Trends Cell Biol.* **30**, 341–353.
7. Ferrara A., Barrett-Connor E., Shan J. 1997. Total, LDL, and HDL cholesterol decrease with age in older men and women. The Rancho Bernardo Study 1984–1994. *Circulation*. **96**, 37–43.
8. Berns M.A., de Vries J.H., Katan M.B. 1988. Determinants of the increase of serum cholesterol with age: A longitudinal study. *Int. J. Epidemiol.* **17**, 789–796.
9. Shiomi M., Ito T., Fujioka T., Tsujita Y. 2000. Age-associated decrease in plasma cholesterol and changes in cholesterol metabolism in homozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Metabolism*. **49**, 552–556.
10. van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. 2008. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 112–124.
11. Simons K., van Meer G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*. **27**, 6197–6202.
12. Lagerholm B.C., Weinreb G.E., Jacobson K., Thompson N.L. 2005. Detecting microdomains in intact cell membranes. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **56**, 309–336.
13. Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature*. **387**, 569–572.
14. Anderson R.G.W., Jacobson K. 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science*. **296**, 1821–1825.
15. Pike L.J. 2006. Rafts defined: A report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *J. Lipid Res.* **47**, 1597–1598.
16. Epand R.M. 2008. Proteins and cholesterol-rich domains. *Biochim. Biophys. Acta*. **1778**, 1576–1582.
17. Mañes S., Mira E., Gómez-Moutón C., Lacalle R.A., Keller P., Labrador J.P., Martínez-A C. 1999. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J.* **18**, 6211–6220.
18. Aman M.J., Ravichandran K.S. 2000. A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca^{2+} flux. *Curr. Biol.* **10**, 393–396.
[https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00415-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00415-2)
19. Lamaze C., Dujancourt A., Baba T., Lo C.G., Benmerah A., Dautry-Varsat A. 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains de-

- fine a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol. Cell*. **7**, 661–671.
20. Jahn R., Scheller R.H. 2006. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 631–643.
 21. Salaün C., Gould G.W., Chamberlain L.H. 2005. Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 19449–19453.
 22. Suzuki T., Zhang J., Miyazawa S., Liu Q., Farzan M.R., Yao W.-D. 2011. Association of membrane rafts and postsynaptic density: Proteomics, biochemical, and ultrastructural analyses. *J. Neurochem.* **119**, 64–77.
 23. Suzuki S., Numakawa T., Shimazu K., Koshimizu H., Hara T., Hatanaka H., Mei L., Lu B., Kojima M. 2004. BDNF-induced recruitment of TrkB receptor into neuronal lipid rafts: Roles in synaptic modulation. *J. Cell Biol.* **167**, 1205–1215.
 24. Pereira D.B., Chao M.V. 2007. The tyrosine kinase Fyn determines the localization of TrkB receptors in lipid rafts. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **27**, 4859–4869.
 25. Pryor S., McCaffrey G., Young L.R., Grimes M.L. 2012. NGF causes TrkA to specifically attract microtubules to lipid rafts. *PLoS One*. **7**, e35163.
 26. Colin J., Gregory-Pauron L., Lanhers M.-C., Claudepierre T., Corbier C., Yen F.T., Malaplate-Armand C., Oster T. 2016. Membrane raft domains and remodeling in aging brain. *Biochimie*. **130**, 178–187.
 27. Stier A., Sackmann E. 1973. Spin labels as enzyme substrates heterogeneous lipid distribution in liver microsomal membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Biomembr.* **311**, 400–408.
 28. Karnovsky M.J., Kleinfeld A.M., Hoover R.L., Dawidowicz E.A., McIntyre D.E., Salzman E.A., Klausner R.D. 1982. Lipid domains in membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **401**, 61–74.
<https://doi.org/10.1083/jcb.94.1.1>
 29. Estep T.N., Mountcastle D.B., Barenholz Y., Biltonen R.L., Thompson T.E. 1979. Thermal behavior of synthetic sphingomyelin-cholesterol dispersions. *Biochemistry*. **18**, 2112–2117.
 30. Goodsaid-Zalduondo F., Rintoul D., Carlson J., Hansel W. 1982. Luteolysis-induced changes in phase composition and fluidity of bovine luteal cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **79** (14), 4332–4336.
<https://doi.org/10.1073/pnas.79.14.4332>
 31. Samsonov A.V., Mihalyov I., Cohen F.S. 2001. Characterization of cholesterol-sphingomyelin domains and their dynamics in bilayer membranes. *Biophys. J.* **81**, 1486–1500.
 32. Baumgart T., Hess S.T., Webb W.W. 2003. Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*. **425**, 821–824.
 33. Veatch S.L., Cicuta P., Sengupta P., Honerkamp-Smith A., Holowka D., Baird B. 2008. Critical fluctuations in plasma membrane vesicles. *ACS Chem. Biol.* **3**, 287–293.
 34. Veatch S.L., Keller S.L. 2005. Seeing spots: Complex phase behavior in simple membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. **1746**, 172–185.
 35. Gil T., Sabra M.C., Ipsen J.H., Mouritsen O.G. 1997. Wetting and capillary condensation as means of protein organization in membranes. *Biophys. J.* **73**, 1728–1741.
 36. Akimov S.A., Frolov V.A.J., Kuzmin P.I., Zimmerberg J., Chizmadzhev Y.A., Cohen F.S. 2008. Domain formation in membranes caused by lipid wetting of protein. *Phys. Rev. E*. **77**, 051901.
 37. Nichols B. 2003. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 4707–4714.
 38. Allen J.A., Halverson-Tamboli R.A., Rasenick M.M. 2007. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 128–140.
 39. Scheiffele P., Rietveld A., Wilk T., Simons K. 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 2038–2044.
 40. Gniadecki R., Poumay Y. 2009. Lipid rafts and keratinocyte apoptosis: Regulation death receptors and Akt. *Open Dermatol. J.* **3**, 163–165.
 41. Campbell S.M., Crowe S.M., Mak J. 2001. Lipid rafts and HIV-1: From viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* **22**, 217–227.
 42. Suomalainen M. 2002. Lipid rafts and assembly of enveloped viruses. *Traffic*. **3**, 705–709.
 43. Simons K., Toomre D. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–39.
 44. Baird B., Sheets E.D., Holowka D. 1999. How does the plasma membrane participate in cellular signaling by receptors for immunoglobulin E? *Biophys. Chem.* **82**, 109–119.
 45. Hong S., Huo H., Xu J., Liao K. 2004. Insulin-like growth factor-1 receptor signaling in 3T3-L1 adipocyte differentiation requires lipid rafts but not caveolae. *Cell Death Differ.* **11**, 714–723.
 46. Janes P.W., Ley S.C., Magee A.I., Kabouridis P.S. 2000. The role of lipid rafts in T cell antigen receptor (TCR) signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 23–34.
 47. Langlet C., Bernard A.M., Drevot P., He H.T. 2000. Membrane rafts and signaling by the multichain immune recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 250–255.
 48. Cheng P.C., Dykstra M.L., Mitchell R.N., Pierce S.K. 1999. A role for lipid rafts in B cell antigen receptor signaling and antigen targeting. *J. Exp. Med.* **190**, 1549–1560.
 49. Kapus A., Janmey P. 2013. Plasma membrane—cortical cytoskeleton interactions: A cell biology approach with biophysical considerations. *Compr. Physiol.* **3** (3), 1231–1281.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c120015>
 50. Fowler V.M. 2013. The human erythrocyte plasma membrane: A Rosetta Stone for decoding membrane—cytoskeleton structure. *Curr. Top. Membr.* **72**, 39–88.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417027-8.00002-7>

51. Varma R., Mayor S. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature*. **394**, 798–801.
52. Sezgin E., Levental I., Mayor S., Eggeling C. 2017. The mystery of membrane organization: Composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 361–374.
53. Berchtold N.C., Cotman C.W. 1998. Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiol. Aging*. **19**, 173–189.
54. Tiraboschi P., Hansen L.A., Thal L.J., Corey-Bloom J. 2004. The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*. **62**, 1984–1989.
55. Liu Q., Zerbini C.V., Zhang J., Hoe H.-S., Wang B., Cole S.L., Herz J., Muglia L., Bu G. 2007. Amyloid precursor protein regulates brain apolipoprotein E and cholesterol metabolism through lipoprotein receptor LRP1. *Neuron*. **56**, 66–78.
56. Beel A.J., Mobley C.K., Kim H.J., Tian F., Hadziselimovic A., Jap B., Prestegard J.H., Sanders C.R. 2008. Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): Does APP function as a cholesterol sensor? *Biochemistry*. **47**, 9428–9446.
57. Masaldan S., Bush A.I., Devos D., Rolland A.S., Moreau C. 2019. Striking while the iron is hot: Iron metabolism and ferroptosis in neurodegeneration. *Free Radic. Biol. Med.* **133**, 221–233.
58. Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A., James S.A., Robb E., Wikke K., Leong S.L., Perez K., Johansson T., Greenough M.A., Cho H., Galatis D., Moir R.D., Masters C.L., McLean C., Tanzi R.E., Cappai R., Barnham K.J., Cicotosto G.D., Rogers J.T., Bush A.I. 2010. Iron-export ferroxidase activity of β -amyloid precursor protein is inhibited by zinc in Alzheimer's disease. *Cell*. **142**, 857–867.
59. Webers A., Heneka M.T., Gleeson P.A. 2020. The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease. *Immunol. Cell Biol.* **98**, 28–41.
60. Soscia S.J., Kirby J.E., Washicosky K.J., Tucker S.M., Ingelsson M., Hyman B., Burton M.A., Goldstein L.E., Duong S., Tanzi R.E., Moir R.D. 2010. The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS One*. **5**, e9505.
61. Gouras G.K., Olsson T.T., Hansson O. 2015. β -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. **12** (1), 3–11. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>
62. Koh J.Y., Yang L.L., Cotman C.W. 1990. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* **533**, 315–320.
63. Miranda S., Opazo C., Larrondo L.F., Muñoz F.J., Ruiz F., Leighton F., Inestrosa N.C. 2000. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* **62**, 633–648.
64. Pike C.J., Burdick D., Walencewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. 1993. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: The role of peptide assembly state. *J. Neurosci.* **13** (4), 1676–1687. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-04-01676.1993>
65. Morris G.P., Clark I.A., Vissel B. 2014. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, 135.
66. Jang H., Connelly L., Arce F.T., Ramachandran S., Lal R., Kagan B.L., Nussinov R. 2013. Alzheimer's disease: Which type of amyloid-preventing drug agents to employ? *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15** (23), 8868–8877. <https://doi.org/10.1039/c3cp00017f>
67. Rosenblum W.I. 2014. Why Alzheimer trials fail: Removing soluble oligomeric beta amyloid is essential, inconsistent, and difficult. *Neurobiol. Aging*. **35**, 969–974.
68. Cole S.L., Vassar R. 2007. The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2**, 22. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22>
69. Uversky V.N. 2009. Intrinsic disorder in proteins associated with neurodegenerative diseases. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. **14** (14), 5188–5238. <https://doi.org/10.2741/3594>
70. Lührs T., Ritter C., Adrian M., Riek-Loher D., Bohrmann B., Döbeli H., Schubert D., Riek R. 2005. 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1–42) fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 17342–17347.
71. Kumar-Singh S., Dewachter I., Moechars D., Lübke U., Jonghe C.D., Ceuterick C., Checler F., Naidu A., Cordell B., Cras P., Broeckhoven C.V., Leuven F.V. 2000. Behavioral disturbances without amyloid deposits in mice overexpressing human amyloid precursor protein with Flemish (A692G) or Dutch (E693Q) mutation. *Neurobiol. Dis.* **7**, 9–22.
72. Murrell J.R., Hake A.M., Quaid K.A., Farlow M.R., Ghetti B. 2000. Early-onset Alzheimer disease caused by a new Mutation (V717L) in the amyloid precursor protein gene. *Arch. Neurol.* **57**, 885.
73. Dimitrov M., Alattia J.-R., Lemmin T., Lehal R., Flieger A., Houacine J., Hussain I., Radtke F., Dal Peraro M., Behr D., Fraering P.C. 2013. Alzheimer's disease mutations in APP but not γ -secretase modulators affect epsilon-cleavage-dependent AICD production. *Nat. Commun.* **4**, 2246.
74. Peters C., Bascañán D., Opazo C., Aguayo L.G. 2016. Differential membrane toxicity of amyloid- β fragments by pore forming mechanisms. *J. Alzheimers Dis. JAD*. **51**, 689–699.
75. Wärmländer S.K.T.S., Österlund N., Wallin C., Wu J., Luo J., Tiiman A., Jarvet J., Gräslund A. 2019. Metal binding to the amyloid- β peptides in the presence of biomembranes: Potential mechanisms of cell toxicity.

- J. Biol. Inorg. Chem.* **24** (8), 1189–1196.
<https://doi.org/10.1007/s00775-019-01723-9>
76. Ngo S.T., Derreumaux P., Vu V.V. 2019. Probable transmembrane amyloid α -helix bundles capable of conducting Ca^{2+} ions. *J. Phys. Chem. B.* **123**, 2645–2653.
 77. Ariga T., Kobayashi K., Hasegawa A., Kiso M., Ishida H., Miyatake T. 2001. Characterization of high-affinity binding between gangliosides and amyloid beta-protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **388**, 225–230.
 78. Fantini J., Yahi N. 2010. Molecular insights into amyloid regulation by membrane cholesterol and sphingolipids: Common mechanisms in neurodegenerative diseases. *Expert Rev. Mol. Med.* **12**, e27.
 79. Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer β -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J. Cell Biol.* **160**, 113–123.
 80. Rushworth J.V., Hooper N.M. 2010. Lipid rafts: Linking Alzheimer's amyloid- β production, aggregation, and toxicity at neuronal membranes. *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011, **603052**.
<https://doi.org/10.4061/2011/603052>
 81. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., Roses A.D. 1993. Apolipoprotein E: High-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 1977–1981.
 82. Qiang W., Yau W.-M., Lu J.-X., Collinge J., Tycko R. 2017. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature.* **541**, 217–221.
 83. Takahashi R.H., Nagao T., Gouras G.K. 2017. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol. Int.* **67**, 185–193.
 84. Srivastava A.K., Pittman J.M., Zerweck J., Venkata B.S., Moore P.C., Sachleben J.R., Meredith S.C. 2019. β -Amyloid aggregation and heterogeneous nucleation. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **28**, 1567–1581.
 85. Ivanova M.I., Lin Y., Lee Y.-H., Zheng J., Ramamoorthy A. 2021. Biophysical processes underlying cross-seeding in amyloid aggregation and implications in amyloid pathology. *Biophys. Chem.* **269**, 106507.
 86. Reiss A.B., Arain H.A., Stecker M.M., Siegert N.M., Kasselmann L.J. 2018. Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **29**, 613–627.
 87. Tiwari S., Atluri V., Kaushik A., Yndart A., Nair M. 2019. Alzheimer's disease: Pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int. J. Nanomedicine.* **14**, 5541–5554.
 88. Serra-Batiste M., Ninot-Pedrosa M., Bayoumi M., Gairi M., Maglia G., Carulla N. 2016. A β 42 assembles into specific β -barrel pore-forming oligomers in membrane-mimicking environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **113**, 10866–10871.
 89. Ji S.-R., Wu Y., Sui S. 2002. Cholesterol is an important factor affecting the membrane insertion of β -amyloid peptide (A β 1–40), which may potentially inhibit the fibril formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 6273–6279.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M104146200>
 90. Di Scala C., Chahinian H., Yahi N., Garmy N., Fantini J. 2014. Interaction of Alzheimer's β -amyloid peptides with cholesterol: Mechanistic insights into amyloid pore formation. *Biochemistry.* **53**, 4489–4502.
 91. Fantini J., Di Scala C., Yahi N., Troadec J.-D., Sadelli K., Chahinian H., Garmy N. 2014. Bexarotene blocks calcium-permeable ion channels formed by neurotoxic Alzheimer's β -amyloid peptides. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 216–224.
 92. Shafir Y., Durell S., Arispe N., Guy H.R. 2010. Models of membrane-bound Alzheimer's A β peptide assemblies. *Proteins.* **78**, 3473–3487.
 93. van Blitterswijk W.J., van der Luit A.H., Veldman R.J., Verheij M., Borst J. 2003. Ceramide: Second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J.* **369**, 199–211.
 94. Han X., M Holtzman D., McKeel D.W., Kelley J., Morris J.C. 2002. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: Potential role in disease pathogenesis. *J. Neurochem.* **82**, 809–818.
 95. Takahashi K., Ginis I., Nishioka R., Klimanis D., Barone F.C., White R.F., Chen Y., Hallenbeck J.M. 2004. Glucosylceramide synthase activity and ceramide levels are modulated during cerebral ischemia after ischemic preconditioning. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **24** (6), 623–627.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000119990.06999.A9>
 96. Cutler R.G., Kelly J., Storie K., Pedersen W.A., Tammaru A., Hatanpaa K., Troncoso J.C., Mattson M.P. 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 2070–2075.
 97. Frisardi V., Panza F., Seripa D., Farooqui T., Farooqui A.A. 2011. Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: A complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog. Lipid Res.* **50**, 313–330.
 98. Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., Finch C.E., Frautschy S., Griffin W.S., Hampel H., Hull M., Landreth G., Lue L., Mrak R., Mackenzie I.R., McGeer P.L., O'Banion M.K., Pachter J., Pasinetti G., Plata-Salaman C., Rogers J., Rydel R., Shen Y., Streit W., Strohmeyer R., Tooyoma I., Van Muiswinkel F.L., Veerhuis R., Walker D., Webster S., Wegrzyniak B., Wenk G., Wyss-Coray T. 2000. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.* **21**, 383–421.
 99. Halder N., Lal G. 2021. Cholinergic system and its therapeutic importance in inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* **12**, 660342.
 100. Barrantes F.J., Borroni V., Vallés S. 2010. Neuronal nicotinic acetylcholine receptor-cholesterol crosstalk in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.* **584**, 1856–1863.

101. Zhu D., Xiong W.C., Mei L. 2006. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* **26** (18), 4841–4851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2807-05.2006>
102. Coyle J.T., Price D.L., DeLong M.R. 1983. Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science.* **219**, 1184–1190.
103. Auld D.S., Kornecook T.J., Bastianetto S., Quirion R. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: Relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog. Neurobiol.* **68**, 209–245.
104. Schliebs R., Arendt T. 2006. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. (Vienna).* **113** (11), 1625–1644. <https://doi.org/10.1007/s00702-006-0579-2>
105. Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., Ferrante R.J., Bird E.D., Richardson E.P. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **44**, 559–577.
106. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell.* **72**, 971–983.
107. Valencia A., Reeves P.B., Sapp E., Li X., Alexander J., Kegel K.B., Chase K., Aronin N., DiFiglia M. 2010. Mutant huntingtin and glycogen synthase kinase 3-beta accumulate in neuronal lipid rafts of a presymptomatic knock-in mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci. Res.* **88**, 179–190.
108. Hanagasi H.A., Tufekcioglu Z., Emre M. 2017. Dementia in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **374**, 26–31.
109. Bonifati V. 2006. Parkinson's disease: The LRRK2-G2019S mutation: Opening a novel era in Parkinson's disease genetics. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG.* **14** (10), 1061–1062. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201695>
110. Hatano T., Kubo S.-I., Imai S., Maeda M., Ishikawa K., Mizuno Y., Hattori N. 2007. Leucine-rich repeat kinase 2 associates with lipid rafts. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 678–690.
111. West A.B., Moore D.J., Biskup S., Bugayenko A., Smith W.W., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. 2005. Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 16842–16847.
112. Krüger R., Kuhn W., Müller T., Voitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schöls L., Riess O. 1998. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet.* **18**, 106–108.
113. Singleton A.B., Farrer M., Johnson J., Singleton A., Hague S., Kachergus J., Hulihan M., Peuralinna T., Dutra A., Nussbaum R., Lincoln S., Crawley A., Hanson M., Maraganore D., Adler C., Cookson M.R., Muenter M., Baptista M., Miller D., Blacato J., Hardy J., Gwinn-Hardy K. 2003. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science.* **302**, 841. <https://doi.org/10.1126/science.1090278>
114. Fortin D.L., Troyer M.D., Nakamura K., Kubo S., Anthony M.D., Edwards R.H. 2004. Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* **24**, 6715–6723. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1594-04.2004>
115. Martinez Z., Zhu M., Han S., Fink A.L. 2007. GM1 specifically interacts with alpha-synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemistry.* **46**, 1868–1877.
116. Schneider J.S. 1998. GM1 ganglioside in the treatment of Parkinson's disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **845**, 363–373.
117. Pasinelli P., Brown R.H. 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: Insights from genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 710–723.
118. Küst B.M., Copray J.C.V.M., Brouwer N., Troost D., Boddeke H.W. 2002. Elevated levels of neurotrophins in human biceps brachii tissue of amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* **177**, 419–427. <https://doi.org/10.1006/exnr.2002.8011>
119. Annunziata P., Maimone D., Guazzi G.C. 1995. Association of polyclonal anti-GM1 IgM and anti-neurofilament antibodies with CSF oligoclonal bands in a young with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* **92**, 387–393.
120. Pestronk A., Choksi R. 1997. Multifocal motor neuropathy. Serum IgM anti-GM1 ganglioside antibodies in most patients detected using covalent linkage of GM1 to ELISA plates. *Neurology.* **49**, 1289–1292.
121. Stevens A., Weller M., Wiethölter H. 1993. A characteristic ganglioside antibody pattern in the CSF of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* **56**, 361–364.
122. Söderberg M., Edlund C., Alafuzoff I., Kristensson K., Dallner G. 1992. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *J. Neurochem.* **59**, 1646–1653.
123. Fabelo N., Martín V., Marín R., Moreno D., Ferrer I., Díaz M. 2014. Altered lipid composition in cortical lipid rafts occurs at early stages of sporadic Alzheimer's disease and facilitates APP/BACE1 interactions. *Neurobiol. Aging.* **35**, 1801–1812.
124. Wood P.L., Tippireddy S., Feriante J., Woltjer R.L. 2018. Augmented frontal cortex diacylglycerol levels in Parkinson's disease and Lewy Body Disease. *PLoS One.* **13** (3), e0191815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191815>
125. Cheng D., Jenner A.M., Shui G., Cheong W.F., Mitchell T.W., Nealon J.R., Kim W.S., McCann H., Wenk M.R., Halliday G.M., Garner B. 2011. Lipid pathway alterations in Parkinson's disease primary visual cortex. *PLoS One.* **6** (2), e17299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017299>
126. Fanning S., Selkoe D., Dettmer U. 2020. Parkinson's disease: Proteinopathy or lipidopathy? *NPJ Park. Dis.* **6**, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41531-019-0103-7>

127. Stok R., Ashkenazi A. 2020. Lipids as the key to understanding α -synuclein behaviour in Parkinson disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 357–358.
128. Chaves-Filho A.B., Pinto I.F.D., Dantas L.S., Xavier A.M., Inague A., Faria R.L., Medeiros M.H.G., Glezer I., Yoshinaga M.Y., Miyamoto S. 2019. Alterations in lipid metabolism of spinal cord linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Rep.* **9**, 11642.
129. Dodge J.C., Jensen E.H., Yu J., Sardi S.P., Bialas A.R., Taksir T.V., Bangari D.S., Shihabuddin L.S. 2020. Neutral lipid cacostasis contributes to disease pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci.* **40**, 9137–9147.
130. Mapstone M., Cheema A.K., Fiandaca M.S., Zhong X., Mhyre T.R., MacArthur L.H., Hall W.J., Fisher S.G., Peterson D.R., Haley J.M., Nazar M.D., Rich S.A., Berlau D.J., Peltz C.B., Tan M.T., Kawas C.H., Federoff H.J. 2014. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **20**, 415–418.
131. Goodenowe D.B., Cook L.L., Liu J., Lu Y., Jayasinghe D.A., Ahiahonu P.W.K., Heath D., Yamazaki Y., Flax J., Krenitsky K.F., Sparks D.L., Lerner A., Friedland R.P., Kudo T., Kamino K., Morihara T., Takeda M., Wood P.L. 2007. Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: A logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia. *J. Lipid Res.* **48**, 2485–2498.
132. González-Domínguez R., García-Barrera T., Gómez-Ariza J.L. 2014. Combination of metabolomic and phospholipid-profiling approaches for the study of Alzheimer's disease. *J. Proteomics.* **104**, 37–47.
133. Dorninger F., Moser A.B., Kou J., Wiesinger C., Forss-Petter S., Gleiss A., Hinterberger M., Jungwirth S., Fischer P., Berger J. 2018. Alterations in the plasma levels of specific choline phospholipids in Alzheimer's disease mimic accelerated aging. *J. Alzheimers Dis.* **62**, 841–854.
<https://doi.org/10.3233/JAD-171036>
134. Girotti A.W., Kriska T. 2004. Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 301–310.
135. Scholte B.J., Horati H., Veltman M., Vreeken R.J., Garratt L.W., Tiddens H.A.W.M., Janssens H.M., Stick S.M. 2019. Oxidative stress and abnormal bioactive lipids in early cystic fibrosis lung disease. *J. Cyst. Fibros.* **18**, 781–789.
136. Chernomordik L., Chanturiya A., Green J., Zimmerberg J. 1995. The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: Regulation by membrane composition. *Biophys. J.* **69**, 922–929.
137. Khandelia H., Loubet B., Olżyńska A., Jurkiewicz P., Hof M. 2014. Pairing of cholesterol with oxidized phospholipid species in lipid bilayers. *Soft Matter.* **10**, 639–647.
138. Aureli M., Grassi S., Prioni S., Sonnino S., Prinetti A. 2015. Lipid membrane domains in the brain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1851**, 1006–1016.
139. Fantini J., Yahi N. 2011. Molecular basis for the glycosphingolipid-binding specificity of α -synuclein: Key role of tyrosine 39 in membrane insertion. *J. Mol. Biol.* **408**, 654–669.
140. Di Scala C., Yahi N., Boutemour S., Flores A., Rodriguez L., Chahinian H., Fantini J. 2016. Common molecular mechanism of amyloid pore formation by Alzheimer's β -amyloid peptide and α -synuclein. *Sci. Rep.* **6**, 28781.
141. Yu R.K., Nakatani Y., Yanagisawa M. 2009. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J. Lipid Res.* **50** Suppl, S440–S445.
142. Segler-Stahl K., Webster J.C., Brunngraber E.G. 1983. Changes in the concentration and composition of human brain gangliosides with aging. *Gerontology.* **29**, 161–168.
143. Svennerholm L., Boström K., Helander C.G., Jungbjer B. 1991. Membrane lipids in the aging human brain. *J. Neurochem.* **56**, 2051–2059.
144. Svennerholm L., Boström K., Jungbjer B., Olsson L. 1994. Membrane lipids of adult human brain: Lipid composition of frontal and temporal lobe in subjects of age 20 to 100 years. *J. Neurochem.* **63**, 1802–1811.
145. Chapman J., Sela B.A., Wertman E., Michaelson D.M. 1988. Antibodies to ganglioside GM1 in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **86**, 235–240.
146. Brooksbank B.W., McGovern J. 1989. Gangliosides in the brain in adult Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Mol. Chem. Neuropathol.* **11**, 143–156.
147. Crino P.B., Ullman M.D., Vogt B.A., Bird E.D., Vollicer L. 1989. Brain gangliosides in dementia of the Alzheimer type. *Arch. Neurol.* **46**, 398–401.
148. Das T., Sa G., Hilston C., Kudo D., Rayman P., Biswas K., Molto L., Bukowski R., Rini B., Finke J.H., Tannenbaum C. 2008. GM1 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in renal cell carcinoma, synergize to induce T-cell apoptosis. *Cancer Res.* **68**, 2014–2023.
149. Hayashi H., Kimura N., Yamaguchi H., Hasegawa K., Yokoseki T., Shibata M., Yamamoto N., Michikawa M., Yoshikawa Y., Terao K., Matsuzaki K., Lemere C.A., Selkoe D.J., Naiki H., Yanagisawa K. 2004. A seed for Alzheimer amyloid in the brain. *J. Neurosci.* **24**, 4894–4902.
150. Ariga T., McDonald M.P., Yu R.K. 2008. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease—a review. *J. Lipid Res.* **49**, 1157–1175.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R800007-JLR200>
151. Yamamoto N., Matsubara T., Sato T., Yanagisawa K. 2008. Age-dependent high-density clustering of GM1 ganglioside at presynaptic neuritic terminals promotes amyloid β -protein fibrillogenesis. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **1778**, 2717–2726.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.07.028>
152. Di Scala C., Yahi N., Lelièvre C., Garmy N., Chahinian H., Fantini J. 2013. Biochemical identification of a linear cholesterol-binding domain within Alzheimer's β amyloid peptide. *ACS Chem. Neurosci.* **4**, 509–517.

153. Yu X., Zheng J. 2012. Cholesterol promotes the interaction of Alzheimer β -amyloid monomer with lipid bilayer. *J. Mol. Biol.* **421**, 561–571.
154. Bao R., Li L., Qiu F., Yang Y. 2011. Atomic force microscopy study of ganglioside GM1 concentration effect on lateral phase separation of sphingomyelin/dioleoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *J. Phys. Chem. B.* **115**, 5923–5929.
155. Galimzyanov T.R., Lyushnyak A.S., Aleksandrova V.V., Shilova L.A., Mikhalyov I.I., Molotkovskaya I.M., Akimov S.A., Batishchev O.V. 2017. Line activity of ganglioside GM1 regulates the raft size distribution in a cholesterol-dependent manner. *Langmuir*. **33**, 3517–3524.
156. Ladisch S., Kitada S., Hays E.F. 1987. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J. Clin. Invest.* **79**, 1879–1882.
157. Heitger A., Ladisch S. 1996. Gangliosides block antigen presentation by human monocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1303**, 161–168.
158. Staneva G., Chachaty C., Wolf C., Quinn P.J. 2010. Comparison of the liquid-ordered bilayer phases containing cholesterol or 7-dehydrocholesterol in modeling Smith–Lemli–Opitz syndrome. *J. Lipid Res.* **51**, 1810–1822.
<https://doi.org/10.1194/jlr.M003467>
159. Staneva G., Osipenko D.S., Galimzyanov T.R., Pavlov K.V., Akimov S.A. 2016. Metabolic precursor of cholesterol causes formation of chained aggregates of liquid-ordered domains. *Langmuir*. **32**, 1591–1600.
160. Heftberger P., Kollmitzer B., Rieder A.A., Amenitsch H., Pabst G. 2015. In situ determination of structure and fluctuations of coexisting fluid membrane domains. *Biophys. J.* **108**, 854–862.
161. Marsh D. 2009. Cholesterol-induced fluid membrane domains: A compendium of lipid-raft ternary phase diagrams. *Biochim. Biophys. Acta.* **1788**, 2114–2123.
162. Rinia H.A., Snel M.M.E., van der Eerden J.P.J.M., de Kruijff B. 2001. Visualizing detergent resistant domains in model membranes with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **501**, 92–96.
163. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. 2007. Effect of line tension on the lateral organization of lipid membranes. *J. Biol. Chem.* **282**, 33537–33544.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M706162200>
164. Khadka N.K., Ho C.S., Pan J. 2015. Macroscopic and nanoscopic heterogeneous structures in a three-component lipid bilayer mixtures determined by atomic force microscopy. *Langmuir*. **31**, 12417–12425.
165. Trabelsi S., Zhang S., Lee T.R., Schwartz D.K. 2008. Linactants: Surfactant analogues in two dimensions. *Phys. Rev. Lett.* **100**, 037802.
166. Brewster R., Safran S.A. 2010. Line active hybrid lipids determine domain size in phase separation of saturated and unsaturated lipids. *Biophys. J.* **98**, L21–L23.
167. Galimzyanov T.R., Molotkovsky R.J., Bozdaganyan M.E., Cohen F.S., Pohl P., Akimov S.A. 2015. Elastic membrane deformations govern inter-leaflet coupling of lipid-ordered domains. *Phys. Rev. Lett.* **115**, 088101.
168. Pinigin K.V., Kondrashov O.V., Jiménez-Munguía I., Alexandrova V.V., Batishchev O.V., Galimzyanov T.R., Akimov S.A. 2020. Elastic deformations mediate interaction of the raft boundary with membrane inclusions leading to their effective lateral sorting. *Sci. Rep.* **10**, 4087.
169. O'Brien J.S., Sampson E.L. 1965. Lipid composition of the normal human brain: Gray matter, white matter, and myelin. *J. Lipid Res.* **6**, 537–544.
170. Yanagisawa K., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y. 1995. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A β): A possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* **1**, 1062–1066.
171. Amaro M., Šachl R., Aydogan G., Mikhalyov I.I., Vácha R., Hof M. 2016. GM1 Ganglioside inhibits β -amyloid oligomerization induced by sphingomyelin. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55** (32), 9411–9415.
<https://doi.org/10.1002/anie.201603178>
172. Cebecauer M., Hof M., Amaro M. 2017. Impact of GM1 on membrane-mediated aggregation/oligomerization of β -amyloid: Unifying view. *Biophys. J.* **113**, 1194–1199.
173. Šachl R., Amaro M., Aydogan G., Koukalová A., Mikhalyov I.I., Boldyrev I.A., Humpolíčková J., Hof M. 2015. On multivalent receptor activity of GM1 in cholesterol containing membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1853**, 850–857.
174. Knuplez E., Curcic S., Theiler A., Bärnthaler T., Trakaki A., Trieb M., Holzer M., Heinemann A., Zimmermann R., Sturm E.M., Marsche G. 2020. Lysophosphatidylcholines inhibit human eosinophil activation and suppress eosinophil migration in vivo. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.* **1865**, 158686.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158686>
175. Ma M.-T., Yeo J.-F., Farooqui A.A., Zhang J., Chen P., Ong W.-Y. 2010. Differential effects of lysophospholipids on exocytosis in rat PC12 cells. *J. Neural. Transm.* **117**, 301–308.
176. Wang D., Zheng W. 2015. Dietary cholesterol concentration affects synaptic plasticity and dendrite spine morphology of rabbit hippocampal neurons. *Brain Res.* **1622**, 350–360.
177. Jose M., Sivanand A., Channakeshava C. 2021. Membrane cholesterol is a critical determinant for hippocampal neuronal polarity. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 746211.
178. Furukawa K., Ohmi Y., Tajima O., Ohkawa Y., Kondo Y., Shuting J., Hashimoto N., Furukawa K. 2018. Gangliosides in inflammation and neurodegeneration. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **156**, 265–287.
179. Sandhoff K., Harzer K. 2013. Gangliosides and gangliosidoses: Principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J. Neurosci.* **33**, 10195–101208.
180. Fusco M., Vantini G., Schiavo N., Zanotti A., Zanoni R., Facci L., Skaper S.D. 1993. Gangliosides and neurotrophic factors in neurodegenerative diseases: From experimental findings to clinical perspectives. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **695**, 314–317.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb23074.x>

The Role of Lipid Domains and Physical Properties of Membranes in the Development of Age-Related Neurodegenerative Diseases

V. D. Krasnobaev^{1, 2}, O. V. Batishchev^{1, *}

¹*Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

²*Moscow Institute of Physics and Technology (NRU), Dolgoprudny, 141701 Russia*

**e-mail: olegbati@gmail.com*

A growing number of studies indicate the relationship between the development of neurodegenerative diseases and the structure and lipid composition of neuronal membranes. One of the structural elements of cell membranes, which in this regard attracts special attention, are liquid-ordered lipid domains, or rafts. The study of rafts and age-related changes in the lipid composition of neuronal cells is becoming increasingly relevant and is constantly being updated. In this review, we tried to highlight the possible role of the lipid component of cell membranes, their structure, and physicochemical characteristics in the development of diseases associated with aging. The reviewed evidence supports the possible role of rafts in diseases, which lead to disruption of the functioning of neurons over a long period of time. There is reason to believe that the therapeutic effects of various molecules, such as lysolipids and gangliosides, are due to their physicochemical properties and are realized indirectly, through their influence on the organization of lipid domains in membranes. As the role of lipid domains and, in general, the mechanisms of interaction and mutual influence of lipid composition and disease development are more fully understood, this knowledge can be used to develop new therapeutic or preventive methods to combat diseases associated with aging.

Keywords: neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, lipid membranes, rafts, lysolipids, gangliosides, cholesterol, amyloid precursor protein, A β -peptide

*Нашему учителю и вдохновителю
Юрию Александровичу Чизмаджеву
посвящается*

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ КАНАЛЫ: ИСТОРИЯ, МНОГООБРАЗИЕ, МЕХАНИЗМЫ

© 2023 г. С. Сухарев^{a, b, *}, А. Анишкин^{a, **}

^aКафедра биологии, Университет Мэрилэнда,
Колледж Парк, Мэрилэнд, 20742 США

^bИнститут физических наук и технологий, Университет Мэрилэнда,
Колледж Парк, Мэрилэнд, 20742 США

*e-mail: sukharev@umd.edu

**e-mail: anisan@umd.edu

Поступила в редакцию 02.09.2022 г.

После доработки 10.09.2022 г.

Принята к публикации 12.09.2022 г.

Многие клеточные процессы порождают механические напряжения. Деление клеток, их сократительная активность, а также адгезия создают внутренние напряжения в клетках, в то время как изменения во окружающей среде, такие как осмотический стресс, прямое механическое давление, сдвиговые деформации или звук, представляют собой внешние возмущения, силу которых клетки оценивают и на которые реагируют. Механочувствительные (МЧ) ионные каналы являются самыми быстрыми механоэлектрическими преобразователями (сенсорами) и представляют собой полифилетическую группу, характеризующуюся многообразием белковых структур. В этом обзоре мы кратко проследим историю этой области, стараясь придерживаться хронологии в представлении основных результатов, опишем структурные особенности различных групп МЧ-каналов и проиллюстрируем некоторые общие физические принципы механизмов их функционирования.

Ключевые слова: механочувствительный канал, ионный канал, сила, натяжение мембраны, давление, цитоскелет, внеклеточный матрикс, воротный процесс, адаптация, инактивация

DOI: 10.31857/S0233475523010103, **EDN:** NUDIVL

ВВЕДЕНИЕ

Клетки сами генерируют напряжения и испытывают внешние механические воздействия разных масштабов. Они неизбежно генерируют силы по мере продвижения по клеточному циклу в результате сократительной активности, миграции в ходе дифференцировки и эмбрионального роста, а также в результате метаболической активности, которая создает осмотический дисбаланс. Клетки также воспринимают внешние силы, характерные для их конкретной среды, их локализации и функции в ткани. В то время как обычные соматические клетки, например, клетки хрящей или сосудистых стенок, испытывают значительное давление или растяжение, что является частью их нормальной среды, высокоспециализированные сенсорные клетки, такие как волосковые клетки

внутреннего уха, настроены на гораздо меньшие механические стимулы.

Механочувствительные (МЧ) ионные каналы — не единственные клеточные сенсоры, реагирующие на механические напряжения. Другими такими структурами являются молекулы, которые соединяют цитоскелет с фокальными контактами (талины), а также связанные с фокальными контактами киназы. Они чувствительны к напряжениям в цитоскелете и способны запускать перестройку и дифференцировку клеток [1]. Есть сообщения о рецепторах, связанных с G-белками, которые в отсутствие лигандов реагируют на растяжение мембран, запуская каскады вторичных мессенджеров [2]. В качестве еще одного примера может быть приведена бактериальная осмосенсорная киназа EnvZ, которая меняет активность в ответ на гидратационные стрессы, вызываемые

изменениями ионной силы и концентрации макромолекул в цитоплазме [3].

МЧ-каналы отличаются от других рецепторов, потому что они находятся в мембранах, разделяющих различные компартменты, и непосредственно реагируют либо на силы в окружающем их липидном бислое, либо в ассоциированных элементах цитоскелета или внеклеточного матрикса. Они используют энергию уже существующих градиентов концентраций ионов или других растворенных веществ для преобразования механических напряжений в электрические или химические сигналы. МЧ-каналы открываются непосредственно механическими силами без каких-либо промежуточных химических стадий, поэтому являются самыми быстрыми преобразователями механических стимулов. Например, время отклика слуховых каналов на смещение пучков волосковых клеток, вызванных давлением света, составляет 10 мкс [4]. Это позволяет нам слышать широкий диапазон частот и наслаждаться музыкой. Тактильные рецепторы в коже также характеризуются коротким латентным периодом и демонстрируют спектр адаптивных реакций, включающий кратковременные (фазовые) или продолжительные (тонические) сигналы [5], что позволяет нам детально определять наощупь жесткость и текстуру поверхности. Бактериальные механочувствительные каналы призваны компенсировать летальный эффект клеточного набухания при внезапном осмотическом шоке. Они работают как быстродействующие клапаны, которые снижают градиенты осмотически активных компонентов и гидростатическое давление в бактериях за ~30 мс [6], тем самым предотвращая осмотическое повреждение.

В отличие от каналов, управляемых электрическим потенциалом, МЧ-каналы не являются монофилетическим семейством с характерной мембранной топологией и консервативными последовательностями, неизменно наблюдаемыми в сенсорах напряжения. МЧ-каналы, обнаруженные во всех доменах филогенетического древа организмов, принадлежат к нескольким структурно неродственным семействам и объединены только функционально. Говоря об общем физическом принципе функционирования МЧ-каналов, их процесс открытия под действием внешней силы базируется на том, что они имеют домены и сегменты, способные двигаться в направлении приложенной силы. С термодинамической точки зрения вклад работы внешней силы смещает вероятность нахождения в проводящем (открытом) по сравнению с покоящемся (закрытом) состоянием.

РАЗНООБРАЗИЕ МЧ-КАНАЛОВ И КРАТКИЙ ИСТОРИЧЕСКИЙ ОБЗОР

Возможность существования ионных каналов, управляемых механическими напряжениями, была высказана в конце 1970-х годов, когда Кори и Хадспет зарегистрировали быстрые токи в волосковых клетках лягушки-быка, появляющиеся в ответ на смещение пучка сенсорных волосков [7]. С тех пор эта область расширилась и включила другие объекты. Функциональные и структурные данные были получены на различных организмах, таких как *Escherichia coli*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens* и некоторых других. Многие МЧ-каналы оказались белковыми комплексами, собранными из одинаковых субъединиц (гомомультимерами), которые при гетерологичной экспрессии в удобных клеточных системах часто сохраняют ключевые электрофизиологические свойства. Некоторые стабильные каналы также могут быть выделены в чистом виде и функционально реконструированы в липосомные мембраны из раствора в детергенте. Такие системы иллюстрируют минимальный набор компонентов, необходимых для работы канала, а также позволяют исследовать роль специфических липидов в функционировании системы [8]. Некоторые механосенсорные комплексы, такие как слуховой канал, включают несколько различных белков, что практически исключает наблюдение функциональных каналов в системах, экспрессирующих отдельные компоненты.

Большое количество структурной информации, накопленное за последние несколько лет с помощью метода криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), в настоящее время позволяет проводить точные структурные эксперименты и значительно повысило предсказательную силу моделирования методами молекулярной динамики. В последнее время были открыты несколько новых классов МЧ-каналов (Piezo, OSCA/TMEM, MSA, SWELL) в дополнение к недавно идентифицированным представителям уже существующих семейств (Flycatcher из семейства MscS). Эти новые структуры вызывают массу вопросов об их фундаментальных механизмах. Не менее важную часть этой научной области составляет исследование функциональной роли МЧ-каналов в нормальных физиологических и патологических процессах, дифференцировке клеток, развитии тканей и органов и даже в процессах канцерогенеза [9].

Механорецепторный (преобразующий) слуховой канал. Изучение механизмов слуха сосредоточено на волосковых слуховых клетках внутреннего уха

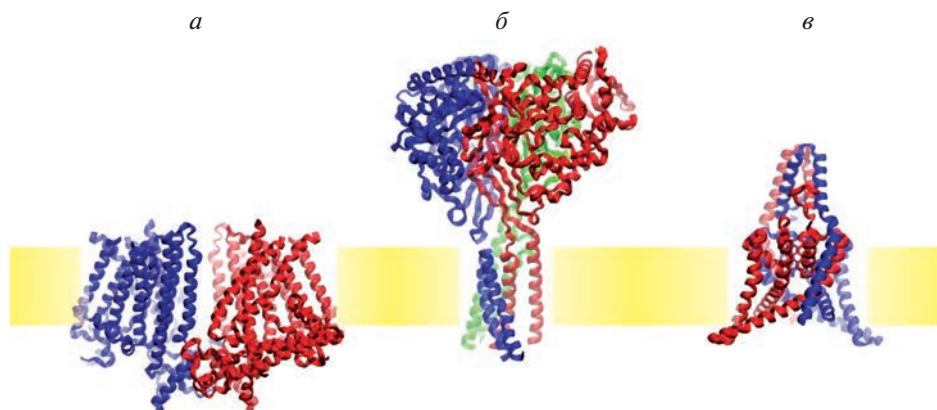


Рис. 1. Структуры представителей трех семейств механочувствительных каналов. *a* — механочувствительный канал OSCA1.2 (идентификатор PDB 6MGW), представляющий семейство TMEM16/OSCA/TMC; *б* — кислоточувствительный ASIC-канал (PDB ID 6AVE), член семейства DEG/MEC/ENaC; *в* — механочувствительный канал TRAAK (PDB ID 4WFE), представляющий семейство двухпортовых калиевых (K2P) каналов.

(улитки), характерно оснащенных апикальными пучками отростков (стереоцилий), кончики которых связаны между собой. О ионном характере рецепторного потенциала волосковых клеток, индуцируемого отклонением волосков, впервые сообщили Кори и Хадспет (1979) [10], установив, что первичным слуховым преобразователем должен быть ионный канал. Канал располагается на кончиках стереоцилий вблизи мест прикрепления концевых связок (tip link — концевая связывающая нить) [11]. Его катионная проводимость варьирует между 100 и 200 пСм в зависимости от положения в улитке. Кинетика адаптации в этих каналах также меняется в зависимости от положения в улитке в соответствии с частотой, на которую они настроены [12]. Молекулярная идентификация механорецепторных каналов долго оставалась нерешенной проблемой, но прорыв был сделан в результате генетического анализа групп населения, где распространены семейные мутации, вызывающие глухоту. В результате, были клонированы белок TMHS, (четырежды пронизывающий мембрану стереоцилий волосковых клеток) и трансмембранные каналоподобные белки TMC1 и TMC2 [13, 14]. Были приведены убедительные данные, что TMC1 образует пору слуховых каналов, собираясь в комплекс с несколькими другими белками на кончиках стереоцилий [15]. Также было предсказано, что небольшой белок TMIE, ассоциированный с TMC, является частью поры [16]. Белки TMC1 и TMC2 гомологичны белкам семейства TMEM16/OSCA, которые формируют хлорные каналы, в то время как некоторые представители этого семейства также работают как скрамблазы, т.е. переносят фосфолипиды между монослоями мембраны [17]. Подобно TMC, в функциональном состоянии эти

белки представляют собой димеры субъединиц с десятью трансмембранными спиралями каждая (рис. 1а). Интересно, что в активном состоянии слуховой канал пропускает краситель FM1-43 (611 Да) в кончик стереоцилума, что может являться проявлением рудиментарной функции транспорта липидов. Недавнее исследование с помощью крио-ЭМ позволило визуализировать комплекс TMC1 *C. elegans* и идентифицировать два тесно связанных ним белка: TMIE, белок с одной трансмембранной спиралью, и связывающий Ca^{2+} и интегрин белок CALM-1, присоединенный к цитоплазматической стороне комплекса [18]. Считается, что ионы проходят в TMC1 по щели между спиралями 6, 7 и 8. Эта щель покрыта TMIE, но в нее частично проникают липиды. Концевые связывающие нити являются важными внеклеточными элементами; они соединяют соседние стереоцилии и передают механические усилия на канал. Нити образованы димерами протокадгерина 15 и кадгерина 23, соединенными между собой кальциевыми мостиками [19]. Смещение пучка создает напряжение в концевых связывающих нитях, что приводит к открытию каналов. Встраивание протокадгерина 15 в мембрану, по-видимому, опосредуется трансмембранным белком LHFPL5 [20]. Подробнее о функции механорецепторного слухового канала будет сказано ниже.

Феноменологические исследования МЧ-каналов в несенсорных клетках. Первоначальное обнаружение катионных каналов, активируемых давлением, было сделано в куриных миобластих группой Сакса [21], после чего активность МЧ-каналов была обнаружена в бактериях [22], дрожжах [23], амфибиях [24] и высших растениях [25]. Последующие попытки применить фармакологию для характеристики механоактивируемых токов по-

казали, что ионы гадолиния (Gd^{3+}), амилорид, аминогликозидные антибиотики, рутениевый красный и пептид из яда паука Граммостола GsMTx4 блокируют различные типы МЧ-каналов [26, 27]. Не оправдались надежды найти универсальный блокирующий агент, который, подобно тетродотоксину, прочно связывающемуся с нейронными натриевыми каналами, мог бы послужить биохимической меткой для выделения загадочных МЧ-каналов. Молекулярная природа механочувствительных каналов в разных типах клеток долго осталась неизвестной.

Семейство DEG/ENaC/MEC. Первые молекулы — кандидаты на роль МЧ-каналов были выявлены в результате циклов мутагенеза и генетического скрининга нематод *C. elegans* [28]. Критерием отбора была неспособность мутантов реагировать на легкое прикосновение волоском к боковой части тела, где проходят механосенсорные нейроны. Комплементарное скрещивание выявило 18 генов *tes* (механосенсорные аномалии), необходимых для осязания, опосредованного шестью специализированными механосенсорными нейронами червя. Двенадцать генов *tes* кодируют компоненты, ответственные именно за механоперообразование, в том числе тубулины (*tes-7*, *tes-12*), элементы внеклеточного матрикса (*tes-5*, *tes-9*), параоксоназоподобные (*tes-6*), связывающие холестерин стоматиноподобные белки (*tes-2*), и *tes-4* и *tes-10*, что по структуре напоминают каналы из семейства DEG/ENaC [29]. Белковые субъединицы *tes-4* и *tes-10* дважды пронизывают мембрану с цитоплазматическими N- и C-концами и большим внеклеточным доменом, который обеспечивает сборку субъединиц в тримеры (рис. 1б). Электрофизиологические измерения на миниатюрных нейронах червей были сложными, но они показали, что из этих двух генов *tes-4* строго необходим для сенсорной функции [30]. Предполагается, что у *C. elegans* и *Drosophila* механопреобразующие каналы связаны со структурами микротрубочек внутри клетки и с кутикулой снаружи, по-видимому, для фокусировки напряжений собранных с целого “рецепторного поля”. Другие члены семейства, чувствительные к кислоте ионные каналы (ASIC-1) (рис. 1б) и, в частности, DEG-1, необходимы для механорецепции в других механочувствительных нейронах у *C. elegans* [31]. В *Drosophila* рецепторы щетинок и мультидендритные сенсорные нейроны используют ENaC-подобные каналы Pickpocket (Ppk) [32].

Бактериальные каналы. Разработка метода получения гигантских бактериальных сферопластов [33] сделало возможным прямое исследование бактерий с помощью электрофизиологического

метода пэтч-кламп. Приложение отрицательного (всасывающего) давления к микропипетке, которое растягивает закрепленную на кончике мембрану, позволило обнаружить присутствие МЧ-каналов в бактериях [22]. Исследования цитоплазматической мембраны *E. coli* и реконструированных протеолипосом этим методом [34, 35] выявили три основных фенотипических класса МЧ-каналов, различающихся по проводимости и активирующему давлению: большие (MscL, 3 нСм), малые (MscS, 1 нСм) и мини (MscM, 100–300 пСм). Механочувствительный канал большой проводимости MscL был идентифицирован и клонирован путем биохимического фракционирования мембранных белков *E. coli*, реконструирования в липидных мембранах и определения методом пэтч-кламп [36]. Механочувствительный канал малой проводимости MscS был клонирован по гомологии с белком KefA, обеспечивающим выход калия из *E. coli* [37]. Позже было обнаружено, что сам KefA является К-зависимым МЧ-каналом; а затем переименован в MscK [38]. Последующий анализ генома *E. coli* выявил еще четыре паралога MscS: YnaI, YbdG, YbiO и YjeP. Активность мини-каналов была приписана продуктам экспрессии генов *ynaI*, *yjeP* и *ybdG* [39]. Вместе эти бактериальные каналы составляют адаптивную систему, которая регулирует тургорное давление в клетке, высвобождая небольшие метаболиты из цитоплазмы. MscS и MscL, два структурно неродственных канала из разных семейств, являются основными клапанами, спасающими бактерии от лизиса, и, таким образом, только делеция обоих генов приводит к “хрупкому” фенотипу *E. coli*, сильно восприимчивому к осмотическому стрессу [37].

MscL и MscS были очищены, функционально реконструированы в липидных мембранах, и было показано, что они открываются непосредственно натяжением липидного бислоя [8, 40]. Структуры гомологов MscL из *M. tuberculosis* и MscS из *E. coli* были получены кристаллографически [41]. В то время как семейство каналов MscL распространено в первую очередь в прокариотах (бактерии и археи), многие гомологи MscS были обнаружены у эукариот в клетках с клеточными стенками, включая делящиеся дрожжи, водоросли, жгутиконосцы и высшие растения [42]. Каналы, схожие с MscS, присутствуют не только в плазматических мембранах грибов, протистов и растений, но и во внутренних мембранах и мембранах органелл, где они стабилизируют пластиды, митохондрии и сократительные вакуоли [43]. Структуры и механизмы функционирования MscL и MscS будут описаны ниже.

Механочувствительные каналы растений. Первые исследования протопластов растений с помощью методики пэтч-кламп позволили зарегистрировать различные ионные токи, переносимые Cl^- , K^+ и Ca^{2+} , возникающие при приложении давления [25, 44]. Каналы в клетках листового эпидермиса, проводящие Ca^{2+} и Mg^{2+} , блокировались ионами Gd^{3+} в микромолярных концентрациях, что приводило к прекращению реакций на гравитацию в корнях растений [45]. Геномные данные показывают, что высшие растения *Arabidopsis thaliana* обладают десятью гомологами бактериального MscS (MSL1–10) [43]. Из них MSL9 и MSL10 расположены в плазматической мембране клеток корней, тогда как MSL8 специфически экспрессируется в пыльце, где он способствует нормальному прорастанию и росту пыльцевых трубок [43]. Каналы MSL2 и MSL3 специфически локализованы в пластидах, и делеция обоих этих генов приводит к морфологическим изменениям и набуханию пластид, которые, как предполагается, постоянно испытывают гиперосмотический стресс вследствие накопления сахаров. MscS, гомолог MscS у одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* [46], сходным образом регулирует форму и деление хлоропластов, подтверждая роль каналов из семейства MscS в поддержании эндосимбиотических органелл. Недавно в плотоядном растении венериной мухоловке был идентифицирован МЧ-канал Flycatcher (FLYC1) — близкий гомолог MscS. Каналы локализируются в специфических истонченных участках сенсорных волосков, вблизи их оснований. Волоски реагируют на шевелящуюся добычу и запускают потенциал действия, приводящий к закрытию ловушки [47].

Калиевые каналы, характеризующиеся наличием двух порообразующих сегментов (K_2P) были также обнаружены в растениях. *A. thaliana* обладает пятью двухпоровыми K^+ каналами (TPK1–5), из которых механочувствительный канал TPK1 был локализован в устьичных клетках, реагирующих на осмотический стресс [48]. В геномах высших растений обнаружен единственный ген Piezo (PZO1). Кроме того, были идентифицированы два МСА канала, (MCA1 и MCA2) проводящие Ca^{2+} . МСА каналы пока не обнаружены в других организмах и характерны для высших растений. Генетически было показано, что каналы Piezo и МСА помогают корням реагировать на твердость почвы и способствуют более глубокому проникновению [43]. Семейство новых механочувствительных каналов OSCA (рис. 1а) также характерно для растений. Эти каналы участвуют в обеспечении притока Ca^{2+} при гиперосмотическом стрессе [49]. Интересно, что в геномах *A. thaliana*

и других наземных растений полностью отсутствуют TRP-подобные каналы. Однако, в отличие от наземных растений, зеленая одноклеточная водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* обладает несколькими TRP-каналами; один из них, МЧ канал TRP11, расположен в основании жгутиков и обеспечивает обратное вращение жгутиков при столкновении клетки с твердым объектом [46].

Калиевые каналы с двумя порообразующими доменами (K_2P , TPK). Первые завершённые геномные базы данных для эукариотических организмов привели к открытию нового класса калиевых каналов, в аминокислотной последовательности которых присутствуют два порообразующих сегмента (K_2P). Эти сегменты не формируют отдельных ионных пор, они встречаются в димерном комплексе канала и формируют единую пору. K_2P встречаются повсеместно и играют роль каналов утечки, регулирующих потенциал покоя во многих возбудимых и невозбудимых клетках. Среди них каналы TREK 1, TREK 2 и TRAAK активируются растяжением мембраны и в ответ на ступеньку натяжения отвечают кратковременным током с быстрой адаптацией [50]. Мультимодалный TREK1 уникален тем, что он реагирует на множество различных типов стимулов, включая pH, температуру, полиненасыщенные жирные кислоты, фосфоинозитидные липиды и общие анестетики [51].

Реконструкция TRAAK человека и TREK-1 рыб *Danio rerio* [52] показала, что открытие этих каналов управляется непосредственно натяжением липидного бислоя. Полученные кристаллические структуры TRAAK (рис. 1б) показали необычную связь внутренней части пор с алифатическим ядром мембраны через открытые “боковые отверстия” в стенке канала. Предполагается, что липиды, попадающие во внутреннюю полость через эти отверстия, действуют как механически активируемые “ворота”, они уходят в бислой при натяжении и закрывают пору в отсутствие натяжения [53].

K_2P -каналы высокоселективно проводят K^+ и, следовательно, являются гиперполяризующими и ингибирующими. Являясь частью популяции каналов “утечки”, K_2P выполняет регуляцию возбудимости путем настройки потенциала покоя, установку порогов возбуждения и предоставляют защиту, подавляя гипервозбудимость в случаях ишемии и сотрясения мозга [51]. Неудивительно, что ингибирующие каналы TREK являются фармакологическими мишенями для нескольких общих анестетиков и антидепрессантов.

TRP-каналы. Исключительное разнообразное каналов из семейства TRP (transient receptor potential), изначально идентифицированного в пло-

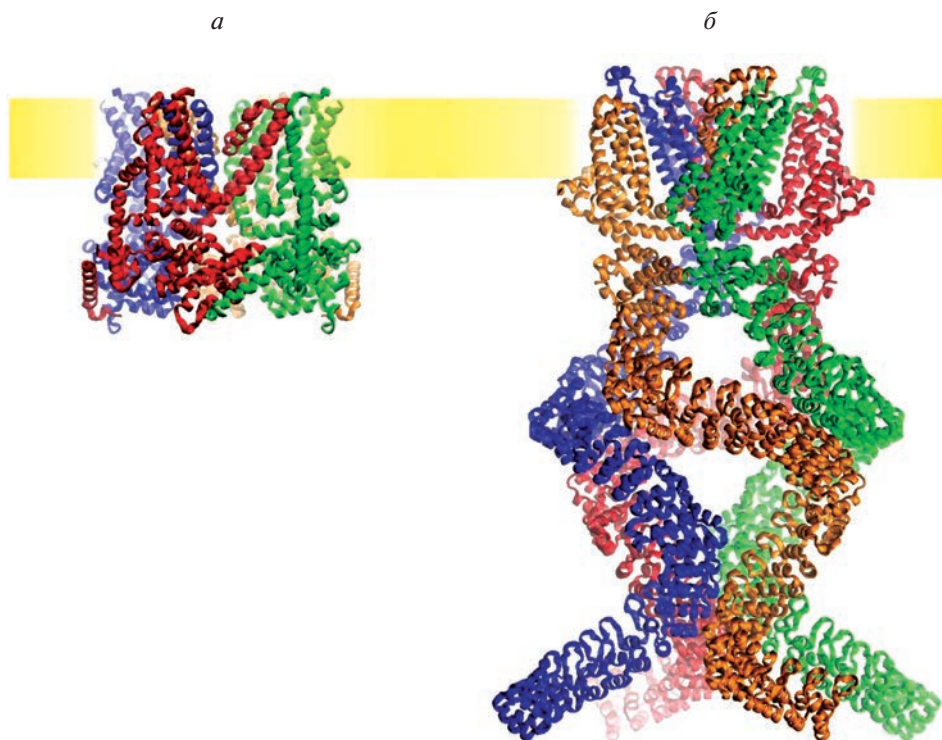


Рис. 2. Структуры представителей семейства механочувствительных каналов TRP. Дрожжевой канал TRPY1 (*a*), который считается родоначальным представителем семейства каналов TRP (PDB ID 6WHG), и механочувствительный канал NompC дрозофилы (*б*) (PDB ID 5VKQ), открывающийся посредством ассоциации с микротрубочками через удлиненные цитоплазматические анкириновые домены.

довой мушке *Drosophila*, выполняет множество функций, таких как прямое восприятие температуры, ноцицепция и боль, вкус и обоняние. TRP-каналы также участвуют в регуляции внутриклеточного Ca^{2+} , определении редокс-статуса клетки, осмо- и механочувствительности [54]. Дрожжевой вакуолярный канал TRPY1, признанный предковым представителем всего семейства TRP (рис. 2*a*), открывается непосредственно натяжением мембраны и вдобавок регулируется фосфоинозитидными липидами и Ca^{2+} [55, 56]. Осмочувствительный канал TRPV4, активируемый набуханием клеток, также активируется в участках с приложенным натяжением [57]. Многие TRPV-каналы активируются набором различных стимулов, что делает их “интеграторами” механических стимулов с температурой, осмолярностью и присутствием таких внешних компонентов, как анионные липиды, полиненасыщенные жирные кислоты или Ca^{2+} .

TRPN1 (NompC), первоначально идентифицированный в *Drosophila*, участвует в восприятии движения и вибраций щетинок. В его крио-ЭМ структуре выявлен протяженный N-концевой цитоплазматический домен, состоящий из анкириновых повторов [58] (рис. 2*б*). Эти анкирино-

вые повторы в TRPN1 напрямую связаны со специальными микротрубочками в механочувствительных органах мушки [59]. Изначально предполагалось, что тянущая сила, приложенная к концу цитоплазматического домена, активирует канал, однако, согласно данным молекулярно-динамического моделирования, не тянущая сила, а сила, толкающая анкириновый пучок в мембранный домен, приводит к активации канала [60]. Было показано, что TRP-4, гомолог TRPN1 у нематоды *C. elegans*, является преобразующим каналом, генерирующим быстрые электрические ответы в реснитчатых механосенсорных нейронах [31].

В млекопитающих каналы TRPP1, проницаемые по Ca^{2+} (также известные как PC2, Pkd2 или polycystin 2), собираются с другим мембранным белком Pkd1 с образованием канала, чувствительного к потоку жидкости вдоль мембраны; канал располагается у основания первичной реснички на апикальной стороне почечного эпителия [61]. Канал отвечает на отклонение ресничек и таким образом вызывает приток Ca^{2+} в клетку. Интересно что Pkd2 также играет роль на ранних стадиях развития позвоночных, устанавливая лево-правую симметрию тела [62].

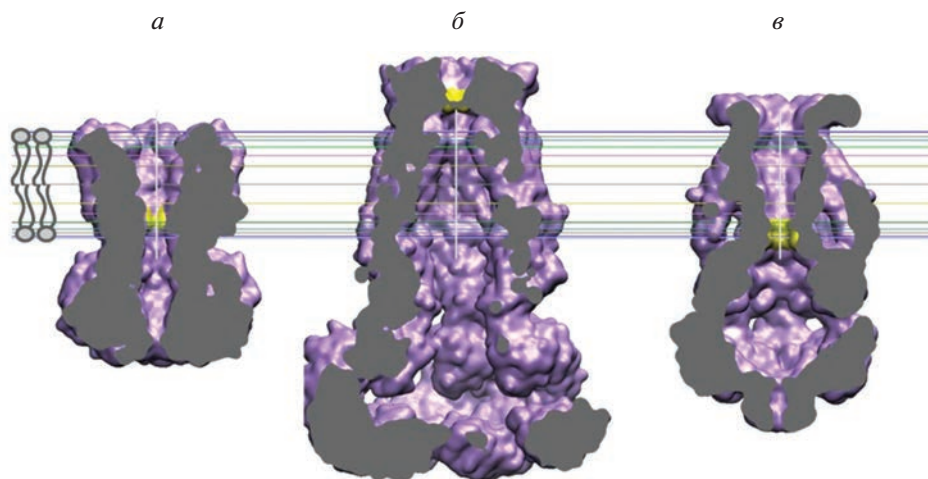


Рис. 3. Каналы, активируемые осмотическим набуханием клетки, характеризуются полыми цитоплазматическими вестибюлями с относительно узкими порталами, непроницаемыми для крупных цитоплазматических компонентов. Все три структуры показаны в виде вертикальных сечений моделей с заполненным пространством, чтобы проиллюстрировать внутренние объемы цитоплазматических доменов. *а* – Бестрофин-1 (PDB ID 6N24); *б* – SWELL1 (PDB ID 6DJB); *в* – бактериальный MscS (PDB ID 6PWP). Желтые области обозначают гидрофобные ворота, горизонтальные линии очерчивают положение липидной мембраны.

Анионные каналы, регулируемые объемом клетки.

Бестрофин-1 (BEST1) был идентифицирован у людей как локус мутации, связанный с вителлиформной макулярной дистрофией Беста. Функционально BEST1 оказался хлорным (Cl^-) каналом, активируемым как повышенным внутриклеточным Ca^{2+} , так и осмотическим набуханием клетки [63]. Структурные данные показали, что BEST1 является пентамером субъединиц, каждая из которых имеет 4 трансмембранных и 5 цитоплазматических спиралей. Последние образуют полый цитоплазматический вестибюль (рис. 3а). Гомологи BEST1 обнаружены во многих организмах и, предположительно, являются сенсорами, опосредующими изменение объема клетки в ответ на изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} .

Примером другого семейства анионных каналов, регулируемых объемом клетки (VRAC), являются белки LRRC8 (LRRC8A-E). У человека функциональные VRAC представляют собой гетерогенное семейство комплексов, образованных совместной сборкой пяти гомологичных субъединиц (LRRC8B-E) с главной субъединицей LRRC8A (SWELL1) [64]. Эти каналы опосредуют регуляторное уменьшение объема за счет выхода неорганических анионов и небольших органических осмолитов из клеток в случае гипоосмотического набухания. Структура SWELL1 была определена с помощью крио-ЭМ [65]. При ее анализе было обнаружено, что гексамерная сборка на самом деле представляет собой тример димеров. Трансмембранный домен SWELL1 образован ше-

стью субъединицами с четырьмя трансмембранными спиральями, С-концевая часть каждой субъединицы несет 16 повторов, обогащенных лейцином (LRR), которые складываются в полую структуру (вестибюль) в цитоплазме (рис. 3б). SWELL1 активируется при снижении ионной силы в цитоплазме. Набухание клетки, с очевидностью, сопровождается снижением концентрации всех внутриклеточных компонентов и макромолекул. Для сравнения с BEST1 и LRRC8A на рис. 3в показан бактериальный MscS с его цитоплазматическим доменом. Все три белка имеют сходство в том, что все они имеют полые цитоплазматические вестибюли, структурно связанные с воротами. Представляется возможным, что снижение общей концентрации веществ и, как следствие, исключенного объема, занимаемого макромолекулами (crowding pressure), в цитоплазме является решающим активирующим фактором, тогда как увеличение концентрации должно вызывать дезактивацию вследствие дегидратации и увеличения давления.

Пьезоканалы. Семейство Piezo было открыто в 2010 г. группой Патапутьяна (Patapoutian) [66] с помощью технологии SiRNA нокдауна в сочетании с электрофизиологией. Они обнаружили прямую корреляцию между наличием быстро адаптируемых механоактивируемых токов в клетках нейробластомы с продуктом гена *Fam 38A* (теперь называемого *Piezo1*). Было обнаружено, что белок экспрессируется в мочевом пузыре, толстой кишке, почках, легких и коже. Гомологи *Piezo1* обнаружены у большинства эукариот,

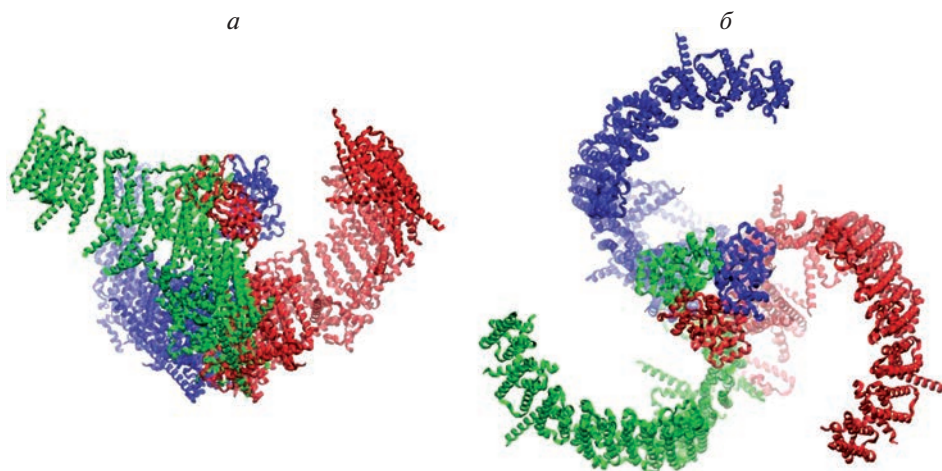


Рис. 4. Структура канала Piezo1, (идентификатор PDB 6B3R), вид сбоку (*а*) и сверху (*б*). Тримерный канал (окрашена каждая субъединица) образует структуру в форме пропеллера с изогнутыми лопастями. Согласно сегодняшним представлениям, молекула придает кривизну мембране, формируя куполообразную структуру. Натяжение уплощает изогнутый белково-мембранный комплекс и временно открывает пору.

включая простейших, растения и всех многоклеточных животных, но не найдены в дрожжах. В то время как большинство геномов содержат один гомолог Piezo1, у позвоночных есть второй, Piezo 2, который активно экспрессирован в нейронах сенсорного ганглия задних корешков спинного мозга (DRG). Piezo 1 и 2 представляют собой неселективные и проницаемые для кальция катионные каналы с проводимостью 20–45 пСм, которые генерируют устойчивые затухающие токи в ответ на надавливание на поверхность клетки закругленным стеклянным зондом. Такие же по характеру токи популяция каналов генерирует в ответ на ступенчатое давление, приложенное к участку мембраны на отверстиях стеклянной пипетки (patch-clamp). В патч-кламп экспериментах показано, что натяжение мембраны, является основным физическим фактором, вызывающим открытие каналов. Для Piezo 1 средняя точка открывающего натяжения оценивалась между 2 и 6 мН/м [67, 68]. В дополнение к натяжению, Piezo 1 активируется сдвиговым напряжением, создаваемым потоком жидкости, параллельным поверхности клетки [69].

Гигантские белки Piezo1 и Piezo2 очень похожи, оба имеют длину ~2500 аминокислот, в зависимости от варианта сплайсинга. Структуры Piezo1 и Piezo2 были получены несколькими группами [65, 70, 71], которые обнаружили сходную тримерную архитектуру, напоминающую пропеллер. Предполагается, что каждый мономер имеет 38 трансмембранных спиралей, организованных в виде повторов по четыре спирали. Центральная пора образована С-концевыми областями каждой субъединицы, которая покрыта

внеклеточным “колпачком” с одной стороны и внутриклеточной “пробкой” с ее центральными и латеральными сегментами — с другой. Более крупные N-концевые части каждого мономера образуют встроенные в мембрану “руки”, поэтому тример напоминает изогнутый 3-лопастный пропеллер (рис. 4). Было высказано предположение, что погруженный в мембрану тримерный комплекс придает мембране локальную кривизну, которая образует мембранный купол высотой ~10 нм относительно плоской части и имеет диаметр ~24 нм в плоскости мембраны. Предполагается, что натяжение мембраны уплощает купол и вызывает латеральное расширение изогнутого мембранно-белкового комплекса на площадь до 120 нм² [70]. Если это латеральное расширение напрямую связано с открытием, этот механизм обеспечил бы исключительную чувствительность канала к натяжению (см. следующий раздел).

Несмотря на сильное сходство, Piezo1 и 2 экспрессируются в разных типах клеток. Piezo1 экспрессируются преимущественно в несенсорных тканях, тогда как Piezo2 функционируют в сенсорных нейронах и их окончаниях, в тактильных рецепторах (клетки Меркеля). Piezo 1 и 2 экспрессируются одновременно только в некоторых нейронах DRG, суставных хондроцитах [72] и в барорецепторных окончаниях дуги аорты и каротидных телец [73], где требуется скоординированное действие двух каналов. Тканеспецифические нокауты Piezo1 и 2 вызывают серьезные сенсорные аномалии, а также дефекты развития. Мутации в Piezo связаны по крайней мере с 18 наследственными болезнями, затрагивающими развитие, включая артрогрипоз, стоматоцитоз и

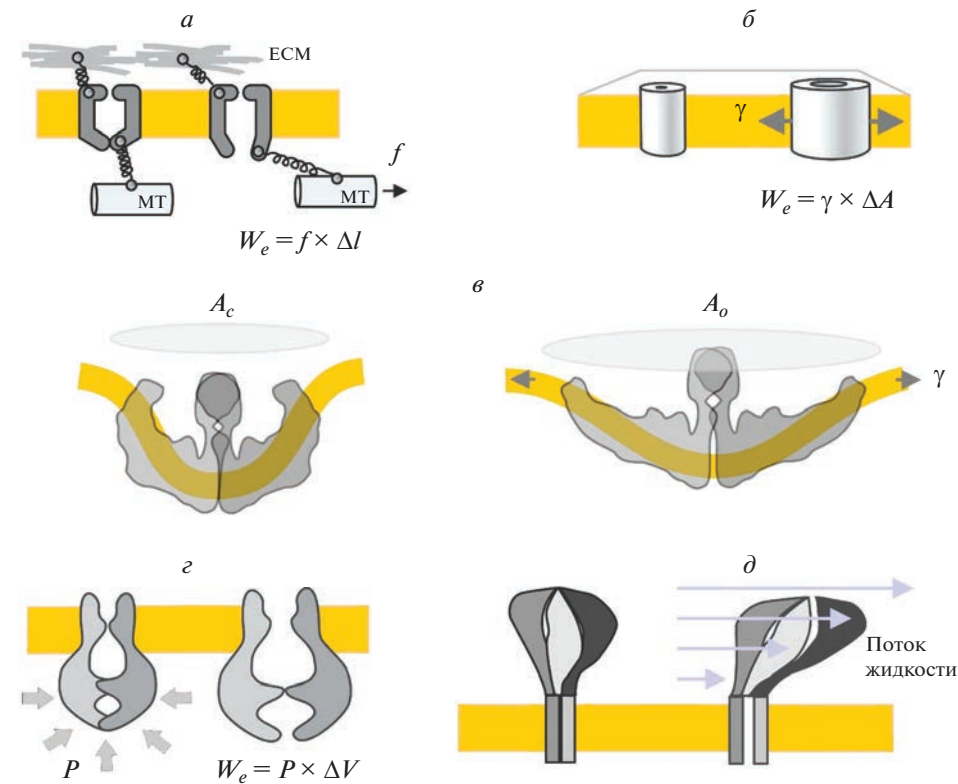


Рис. 5. Пять основных способов, которыми механический стимул может достичь канал, вызывая его открытие. *a* — открытие линейной силой, приложенной к воротам канала за счет движения микротрубочки через воротную пружину; пространственный параметр Δl — линейное перемещение ворот канала в направлении действия силы, W_e — работа, производимая внешней силой (f). *б* — Открывание встроенного в мембрану канала двумерным натяжением (γ). Работа в этом случае равна произведению натяжения и изменения площади комплекса открывающихся каналов в плоскости мембраны (ΔA). *в* — Открывание канала Piezo, генерирующего кривизну. Изогнутые “лопасти” канала изгибают сегмент окружающей мембраны, формируя куполообразную структуру. Считается, что натяжение уплощает купол, открывающий центральные ворота. Латеральное расширение всей белок-мембранной конструкции из-за уплощения оказывается больше, чем можно было бы ожидать при простом растяжении канала, что обеспечивает более высокую чувствительность к натяжению. *г* — Закрытое состояние канала, стабилизированное осмотическим стрессом или высокой цитоплазматической концентрацией макромолекул. В этом случае открытие канала обусловлено увеличением гидратации и “разведением” цитоплазмы. Полая сенсорная область канала имеет отверстия, которые позволяют проходить растворителю и небольшим молекулам, но непроницаемы для больших молекул. Домен изменяет свой объем при открывании, обеспечивая чувствительность к осмотическому (или связанному с исключенным объемом макромолекул) давлению (P) в цитоплазме, которое пропорционально P и ΔV . *д* — Модель “парусного” открывания канала за счет сдвиговых напряжений, создаваемых потоком жидкости, параллельным поверхности мембраны.

лимфатическую дисплазию. По этой причине каналы стали важными объектами фармакологии. Каналы неспецифически блокируются ионами Gd^{3+} и рутениевым красным, тогда как пептид из яда паука *Grammostola* GsMTx4 действует как модулятор открытия, сдвигая направо кривые активации по шкале натяжения [74]. Индуцированные током Piezo1 не подвержены влиянию GsMTx4, но эффективно блокируются амфипатическими пептидами A β , высвобождение которых связано с травмой головного мозга [69]. Фармакологические скрининги идентифицировали два специфических активатора Piezo1 Yoda1 и Jedi 1,2, тогда как Dooku1 действует как специфический блокатор. Сайты связывания этих веществ в

структуре канала были недавно идентифицированы методами крио-ЭМ [75].

СПОСОБЫ ПЕРЕДАЧИ ВНЕШНИХ СИЛ НА ВОРОТА КАНАЛА

Есть три основных механизма того, как сила может достичь канала, встроенного в мембрану, и как она может вызвать открытие (рис. 5). Сила может исходить от фибриллярных элементов, таких как цитоскелет или внеклеточный матрикс. Работа внешней силы в этом случае равна смещению ворот, приводящему к открытию, умноженному на линейную силу ($f \times \Delta l$). Этот вклад “работы внешних сил” должен смещать энергетиче-

ский ландшафт системы в сторону открытого состояния. Такой режим “линейной силы” подразумевает направление конформационного перехода вдоль вектора силы (1D), которая может либо толкать, либо тянуть (рис. 5а).

Внешняя сила также может передаваться через окружающий липидный бислой, подвергающийся двумерному натяжению (рис. 5б). Энергетический вклад “силы от липида” в этом двумерном случае представляет собой натяжение, умноженное на латеральное изменение площади при открытии канала ($\gamma \times \Delta A$). Структурный анализ пьезоканалов, изгибающих мембрану, позволил предложить дополнительный принцип открытия каналов натяжением, заключающийся в уплощении сферического сегмента мембраны, в котором находится канал (открытие, вызываемое кривизной, рис. 5в) [70, 76]. Во многих отношениях этот механизм подобен описанному выше двумерному расширению, но уплощение сегмента мембраны увеличивает эффективное изменение площади комплекса в плоскости (ΔA), тем самым повышая чувствительность перехода. Изогнутые лопасти пьезоканала, по-видимому, действуют как рычаги, передающие усилие от уплощающейся конструкции к центральным воротам.

Примеры трех активируемых объемом каналов с полыми цитоплазматическими доменами (рис. 3) предполагают, что такая конструкция может сделать их чувствительными к объемному давлению в цитоплазме. Внутренняя часть каждого домена связана с цитоплазмой относительно узкими портами, проницаемыми для воды, ионов и, возможно, небольших осмолитов. Энтропийные силы, генерируемые в цитоплазме, могут быть результатом повышенной или пониженной концентрации более крупных (не проницаемых для порталов) цитоплазматических компонентов, действующих снаружи на полый внутриклеточный домен. В случае обезвоживания цитоплазмы осмотические силы в сочетании с уплотнением цитоплазмы будут увеличивать давление (crowding pressure), действующее на полый домен, тесно связанный с воротами (*осмочувствительный воротный механизм*, рис. 5г). Разбавление цитоплазмы снимет это давление. В этих случаях энергетическим фактором, нарушающим равновесие между состояниями, является произведение давления и изменения объема ($P \times \Delta V$), связанного с трехмерным переходом.

Сдвиговое напряжение, создаваемое потоком жидкости, является еще одним механическим фактором, который может воздействовать на закоренный в мембране белковый комплекс. Любой канальный белок с выступающими внеклеточными доменами, прикрепленный к мембране

через трансмембранные домены, будет испытывать воздействие вязкой сдвиговой силы (“парусная модель”, рис. 5д). Этот эффект может быть усилен элементами, связанными с внеклеточными доменами. Активация потоками жидкости была продемонстрирована для эпителиальных натриевых каналов (ENaCs) [77] и для пьезоканалов [69].

Изменение равновесия между функциональными состояниями является результатом податливости молекулы в направлении действия внешней силы. Этот основной механохимический принцип применим независимо от размерности системы [78, 79]. Диаграмма двух состояний (рис. 6а), иллюстрирующая энергию системы в зависимости от пространственного параметра (координаты реакции), показывает, что молекула-сенсор может быть в закрытом или открытом состоянии. Энергии этих двух состояний отличаются на величину G_0 , которая определяет вероятности состояний P_c и P_o согласно уравнению Больцмана (ур. 1).

$$\frac{P_o}{P_c} = e^{-\frac{G_0 - W_e}{kT}}. \quad (1)$$

В отсутствие внешнего стимула (W_e) разница в собственной энергии G_0 удерживает большую часть молекул в закрытом состоянии, в то время как вероятность открытого состояния низка. Приложенная внешняя сила или натяжение делает расширенную открытую конформацию более предпочтительной.

Энергетический профиль с двумя ямами (рис. 6а) схематически представляет энергию как функцию двумерного расширения молекулы (координата реакции), вызываемого внешним натяжением, записанным в виде линейного энергетического вклада $\gamma \times \Delta A$. Натяжение компенсирует разницу энергий состояний и сдвигает распределение в сторону открытого состояния. Натяжение также уменьшает высоту активационного барьера, тем самым увеличивая скорость открытия. Преобразование уравнения (1) с учетом наличия только двух состояний ($P_o = 1 - P_c$) приводит к уравнению (2), которое дает S-образную кривую доза-реакция, показанную на рис. 6б. Наклон зависимости вероятности открытого состояния (P_o) от силы определяется исключительно пространственным параметром перехода (ΔA). Чем больше пространственный параметр, тем круче кривая активации. Средняя точка кривой доза-реакция достигается при натяжении, которое точно компенсирует разницу энергий открытого и закрытого состояний ($G_0 - \gamma \Delta A = 0$). Фактическая форма

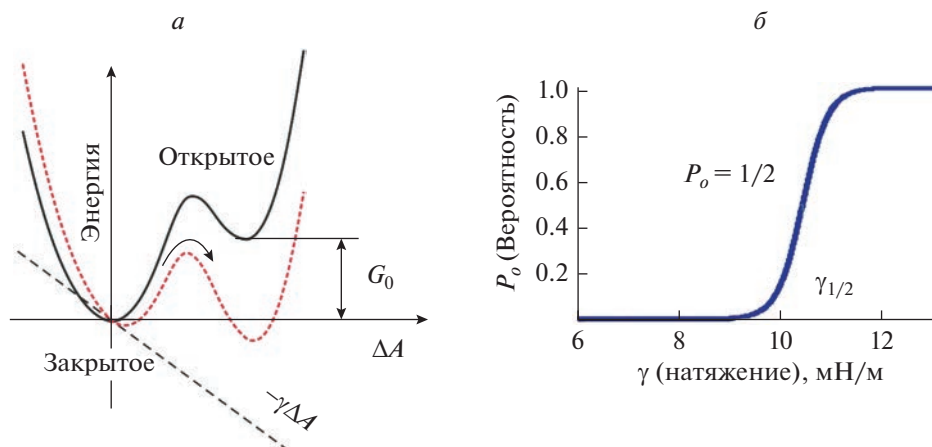


Рис. 6. *а* – Двухъямная энергетическая диаграмма, представляющая энергию канала, управляемого натяжением, с латеральным расширением (ΔA), выбранным в качестве координаты реакции. Разница энергий открытого и закрытого состояний в отсутствие натяжения составляет G_0 . Натяжение дает линейный вклад $-\gamma\Delta A$, который изменяет энергетический профиль и снижает энергию открытого состояния. Подчиняясь распределению Больцмана, популяция каналов в открытом состоянии будет увеличиваться. *б* – Кривая доза–реакция для активируемого натяжением канала, построенная с использованием ур. 2 с экспериментально определенными для MscL параметрами $G_0 = 50 \text{ kT}$, $\Delta A = 20 \text{ nm}^2$.

кривой доза–реакция определяется как G_0 , так и пространственным параметром перехода (ур. 2):

$$P_o = \frac{1}{1 + e^{(G_0 - W_c)/kT}}. \quad (2)$$

Параметр kT представляет собой тепловую энергию окружающей среды. Он определяет порог, выше которого изменение энергии приводит к заметным эффектам. Для изменения отношения вероятностей в e раз (2.72 раза) требуется изменение разницы энергий состояний на $1 \text{ kT} = 4.1 \times 10^{-21} \text{ Дж}$ (k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура). Это равно работе, производимой силой 1 пН (пиконьютон) на расстоянии 4.1 нм ; аналогично работа в 1 kT в двумерных и трехмерных системах эквивалента $4.1 \text{ мН/м} \times 1 \text{ nm}^2$ или $4.1 \text{ атм} \times 10 \text{ nm}^3$ соответственно.

ВРЕМЕННАЯ АКТИВАЦИЯ: АДАПТАЦИЯ, ДЕСЕНСИТИЗАЦИЯ И ИНАКТИВАЦИЯ

Подобно нейронным потенциалозависимым каналам, которые формируют спайки, проходя циклы активации и инактивации [80], большинство МЧ-каналов генерирует переходные токи в ответ на ступенчатую механическую стимуляцию. Проходящий характер активации каналов может быть связан с различными механизмами. Самый простой из них предполагает вязкоупругую релаксацию напряжений в среде, при которой импульс, достигающий канала, затухает со временем из-за пассивной (вязкой) перестройки системы элементов, переносящих напряжение [81]. Это объясняет временную активацию МЧ-каналов в

ооцитах *Xenopus*, где отсоединение подмембранного цитоскелета от участка мембраны устраняет адаптацию и продлевает течение тока до окончания действия стимула [24].

В то время как адаптация выражается в сдвиге кривой активации вправо при длительном воздействии стимула, инактивация обычно приписывается внутреннему процессу, который делает канал одновременно непроводящим и нечувствительным к стимулу. Это может быть следствием отсоединения активационных ворот от стимула с последующим закрытием ворот (что некоторые авторы называют “десенситизацией”, мы бы предпочли “десенситизацией”). Альтернативно, возврат в непроводящее состояние может быть вызван закрытием специальных ворот инактивации. По-видимому, это относится к Piezo1, где предполагалось, что активация расширяет узкий участок поры, образованный боковыми цепями M2493 внутренних спиралей [70], тогда как инактивация приписывается гидрофобному схлопыванию поры на четыре витка спирали выше основных ворот [82].

Вырывание участка мембраны из цитоплазмы (excised patch) или применение агентов, деполимеризующих цитоскелет, не влияют на десенситизацию TREK-1, происходящую приблизительно через 100 мс. Таким образом, по-видимому, десенситизация является внутренним свойством канального комплекса [50]. В согласии с этим наблюдением, очищенные и реконструированные в липосомы каналы TREK-1 и TRAAK также демонстрируют адаптивные токи [52]. Ниже будет обсуждаться механизм отсоединения во-

рот, вызывающего инактивацию бактериального канала MscS под натяжением.

Кинетика токов при адаптации слухового канала в волосковых клетках позвоночных имеет более чем один инактивационный компонент. Показано, что быстрая (~ 1 мс) фаза адаптации зависит как от мембранного потенциала, так и от притока Ca^{2+} на апикальной стороне волосковой клетки. Более медленные компоненты адаптации волоскового пучка соответствуют критическому этапу сброса кривой активации в соответствии с новым положением покоя кончика стереоцилиарного пучка. Их связывают с регулировкой натяжения в концевой связывающей нити за счет проскальзывания и последующего движения миозина, подтягивающего верхний конец нити и восстанавливающего натяжение [83].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ОТКРЫВАНИЯ МЧ КАНАЛОВ

Механорецепторный слуховой канал. Первоначальное описание открывания МЧ ионных каналов, которое рассматривает упругую пружину, тянущую подвижные ворота канала, было получено при измерении кинетики токов рецепторов волосковых клеток, вызванных смещением стереоцилиарного пучка [78] и одновременными изменениями его механической податливости [84]. На рис. 7а представлена конфигурация пучка стереоцилий в покое и при отклонении силой, приложенной к кончику. На рис. 7б показано, каким образом канал на кончике стереоцилии может чувствовать натяжение. Упругий элемент находится внутри клетки и связан непосредственно с каналом; альтернативно (или дополнительно) натяжение может передаваться через липидную мембрану. Когда пучок движется вправо, все стереоцилии поворачиваются вокруг точек, на которых они закреплены (шарниров), что создает напряжение в концевых связках. Отношение сдвига между соседними стереоцилиями к горизонтальному смещению кончика пучка (γ) составляет примерно 0.1–0.2. На рис. 7в представлена эквивалентная механическая схема одной взаимосвязанной пары, состоящей из модельных элементов, включающая затворную пружину (k_g), прикрепленную к воротам канала, вероятность открытого состояния (P_o) которого зависит от натяжения и присутствия Ca^{2+} . Параметр d описывает “размах” ворот при открытии канала, а Δx_g представляет собой индуцированную кальцием релаксацию гипотетического высвобождающего элемента (“спуск”), предложенного в качестве дополнительного фактора увеличения податливости при открытии. Мотор, присутствующий в

системе, поддерживает натяжение в состоянии покоя в концевой связке. Параллельные упругие (k_s) и вязкие (Ξ_s) элементы представляют поворотную жесткость стереоцилии и гидродинамическое сопротивление пучка. Панели z – e (рис. 7) иллюстрируют данные, полученные Cheung [85] с использованием оптического пинцета для одновременного приложения силы и измерения движения пучка. Ток рецептора (панель z) увеличивается при отклонении, достигая средней точки около 50 нм. Соотношение сила–смещение (панель d) является линейным на левом конце графика, где все каналы закрыты, и на правом конце, где они открыты, что указывает на примерно одинаковую жесткость пучка и концевой связывающей нити. Однако в середине кривой, где канал открывается (панель d), имеется уплощение, а жесткость в этой области (панель e) имеет провал. Это указывает на удлинение и ослабление воротной пружины, связанное с открытием, подразумевающее поворот ворот канала в направлении действия силы. В волосковых клетках земноводных (лягушки-быка) эффективная жесткость запорной пружины k_g составляла порядка 700 мкН/м, что описывает все упругие элементы, расположенные последовательно с преобразующим каналом. Чтобы достичь средней точки кривой активации ($P_o = 0.5$), пружину ворот необходимо растянуть примерно на 7 нм под усилием примерно 5 пН. Открытие канала связано с эффективным перемещением ворот на ~ 4 нм [85].

Если ворота канала действительно напрямую прикреплены к актиновым филаментам через эластичный белок пружины ворот (рис. 7б), то “перемещение” ворот можно понимать буквально. Однако пружина ворот не является концевой связкой. Молекулярно-динамическое моделирование кристаллических структур протокадгерина 15 и кадгерина 23, образующих концевую связку, показало, что эти филаментозные белки слишком жесткие, чтобы играть роль воротной пружины [19]. Другие компоненты, присутствующие в стереоцилиях, могут иметь необходимую жесткость и удлинение. В альтернативном варианте каналы могут не прикрепляться впрямую к концевой связке, но могут располагаться в мембране рядом с точкой прикрепления концевой связки и могут испытывать натяжение, передаваемое через липиды, когда усилие, приложенное к концевой связке, вызывает “натягивание” мембраны наподобие шатра (tenting) [86, 87].

Бактериальные МЧ-каналы как модели открытия каналов натяжением мембраны. Механочувствительные каналы малой и большой проводимости, MscS и MscL, находятся в цитоплазматической мембране большинства бактерий. Они

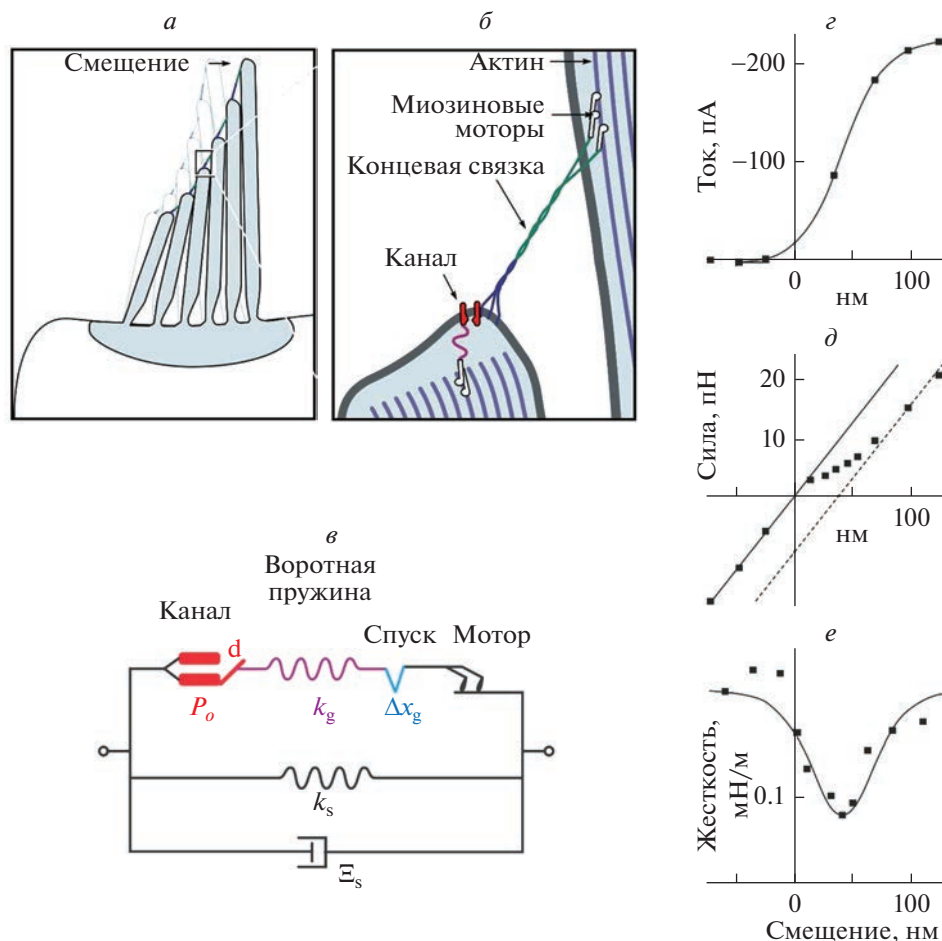


Рис. 7. Открытие сенсорного канала внутреннего уха. *a* — Расположение стереоцилиарного пучка на апикальной стороне волосковой клетки. Пучок соединен между собой кадгеринowymi нитями, называемыми концевыми связками (tip kinks). Отклонение кончика пучка вызывает напряжение концевых связок. *б* — Гипотетическая схема, в которой передающий канал, находящийся на кончике нижней стереоцилии, напрямую соединен с концевой связкой (состоящей из протокадгерина 15 и кадгерина 23), а эластический элемент прикреплен к актину ниже канала. Натяжение в концевой связке и эластичном элементе поддерживается миозиновыми моторами. *в* — Эквивалентная механическая схема, изображающая последовательное соединение канала с его воротами (P_o); воротная пружина (k_g), учитывающая механическую растяжимость концевой связки и всех связанных элементов внутри стереоцилии; и гипотетический элемент высвобождения, или "спуск", который обеспечивает Ca^{2+} -зависимое удлинение системы последовательно связанной с каналом и мотором. Два параллельных элемента k_s и Ξ_s учитывают поворотные жесткость и вязкое сопротивление соответственно. *г* — Кривая отклонения рецепторного тока для волосковой клетки лягушки-быка. *д* — Соотношение сила—прогиб, демонстрирующее линейные режимы на обоих концах и переходный режим в середине. *е* — Кривая жесткость—прогиб с минимумом, соответствующим точке наибольшего нарастания тока, вызванного открытием передающего канала. Панели *в*–*е* адаптированы из Cheung and Corey (2006) [85].

спасают бактерии в случае внезапного осмотического шока [37], действуя как управляемые натяжением спусковые клапаны для осмотически-активных компонентов цитоплазмы (метаболитов). Регулируя скорость высвобождения в соответствии со скоростью осмотического набухания [88], система снижает осмотический градиент и ограничивает натяжение мембраны ниже литического предела. Как определено измерениями светорассеяния в остановленном потоке [6], при сильном гипотоническом шоке бактерии могут

высвобождать до 15% своего неводного внутреннего содержимого в течение 20 мс (рис. 8*a*). Низкопороговый канал MscS (проводимость 1 нСм) становится активным при натяжении 6–7 мН/м, а высокопороговый MscL (3 нСм) активируется при более высоком натяжении 11–14 мН/м. Эти каналы являются двумя основными составляющими системы высвобождения, и присутствие двух популяций легко наблюдается в пэтч-кламп экспериментах с мембранами гигантских сферопластов *E. coli* дикого типа (рис. 8*б*). В отличие от

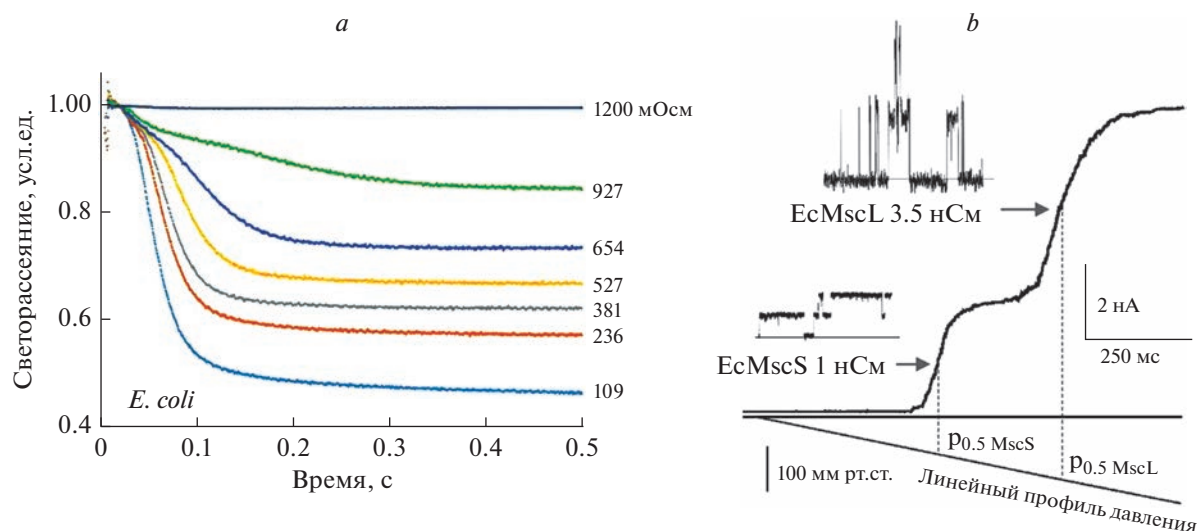


Рис. 8. Макроскопические реализации действия бактериальной системы высвобождения осмолитов, управляемой натяжением. *a* — Кинетика рассеяния света, зарегистрированная в экспериментах с остановленным потоком на суспензии клеток *E. coli*, подвергаемых осмотическому шоку от 1200 мОсм до различных конечных осмолярностей (показаны справа от кривых). Интенсивность рассеяния отражает соотношение показателей преломления внутри и вне клетки, которое падает в результате высвобождения осмолита (адаптировано из Cetiner et al., 2017 [6]). *б* — Записи тока, полученные с участка мембраны, вырезанного из гигантского бактериального сферопласта (штамм Frag1). Стимул представляет собой линейно растущее отрицательное давление (рампу), прикладываемое к пипетке, которая растягивает участок мембраны. Две волны тока принадлежат двум популяциям каналов: низкопороговому MscS, за которым следует активация высокопорогового канала MscL.

MscL, который открывается при почти литическом натяжении, MscS открывается значительно ниже литического предела и демонстрирует характерное адаптивное поведение [89]. Решенные структуры MscL [90] и MscS [41, 91, 92] дали информацию для компьютерного моделирования, симуляций и предсказания основных функциональных состояний для этих каналов на основе экспериментально измеренных параметров конформационных переходов [93–98].

Канал большой проводимости MscL. Канал MscL первоначально был обнаружен в *E. coli* [36], и большинство параметров было определено экспериментально для этого вида [93, 97, 99]. Однако кристаллическая структура была получена для его гомолога из *Mycobacterium tuberculosis* (TbMscL) [90], который на 29% идентичен EcMscL. Недавно опубликованное моделирование кристаллической структуры TbMscL (2OAR) в липидном окружении иллюстрирует его механизм открытия, напоминающий открытие ирисовой диафрагмы. На рис. 9*a* (слева) показана структура канала и этапы открывания, полученные с использованием молекулярной динамики локально-распределенного натяжения (LDT-MD) [98]. Канал представляет собой комплекс из пяти 125-аминокислотных цепей, каждая из которых имеет две трансмембранные спирали (TM1, TM2); взаимное положение TM1 и TM2 указывает на обмен спи-

ралей между соседними субъединицами. В этой конфигурации периплазматические петли физически соединяют все субъединицы, что делает канал чрезвычайно стабильным. И N-, и C-концы находятся в цитоплазме; C-концевые спирали образуют пучок с пятикратной симметрией. Пять внутренних спиралей TM1 образуют плотное сужение (гидрофобные ворота), выстланное алифатическими боковыми цепями I14 и V21. Во всех опубликованных моделях вода вытесняется из всей области сужения, поэтому внутри ворот имеют обезвоженный объем или, как иногда говорят, «заперты паром». Натяжение мембраны, передаваемое в основном через приграничные участки липидного бислоя, вызывает постепенный наклон спаренных TM1-TM2 спиралей с одновременным расширением поры. Проходя через низкопроводящее промежуточное расширенное состояние, канал переходит в полностью открытое состояние, характеризующееся наклоном спирали $\sim 30^\circ$ и латеральным расширением белкового комплекса на $\sim 20 \text{ нм}^2$. В слегка уплощенной открытой конформации имеется полностью сольватированная пора радиусом 1.5 нм с расчетной проводимостью 2.5 нСм (в 200 мМ KCl). C-концевой спиральный пучок со своими линкерами образует фильтр, контролирующий цитоплазматический вход в пору. Моделирование процесса открытия методом LDT-MD в сочетании с методом метадинамики

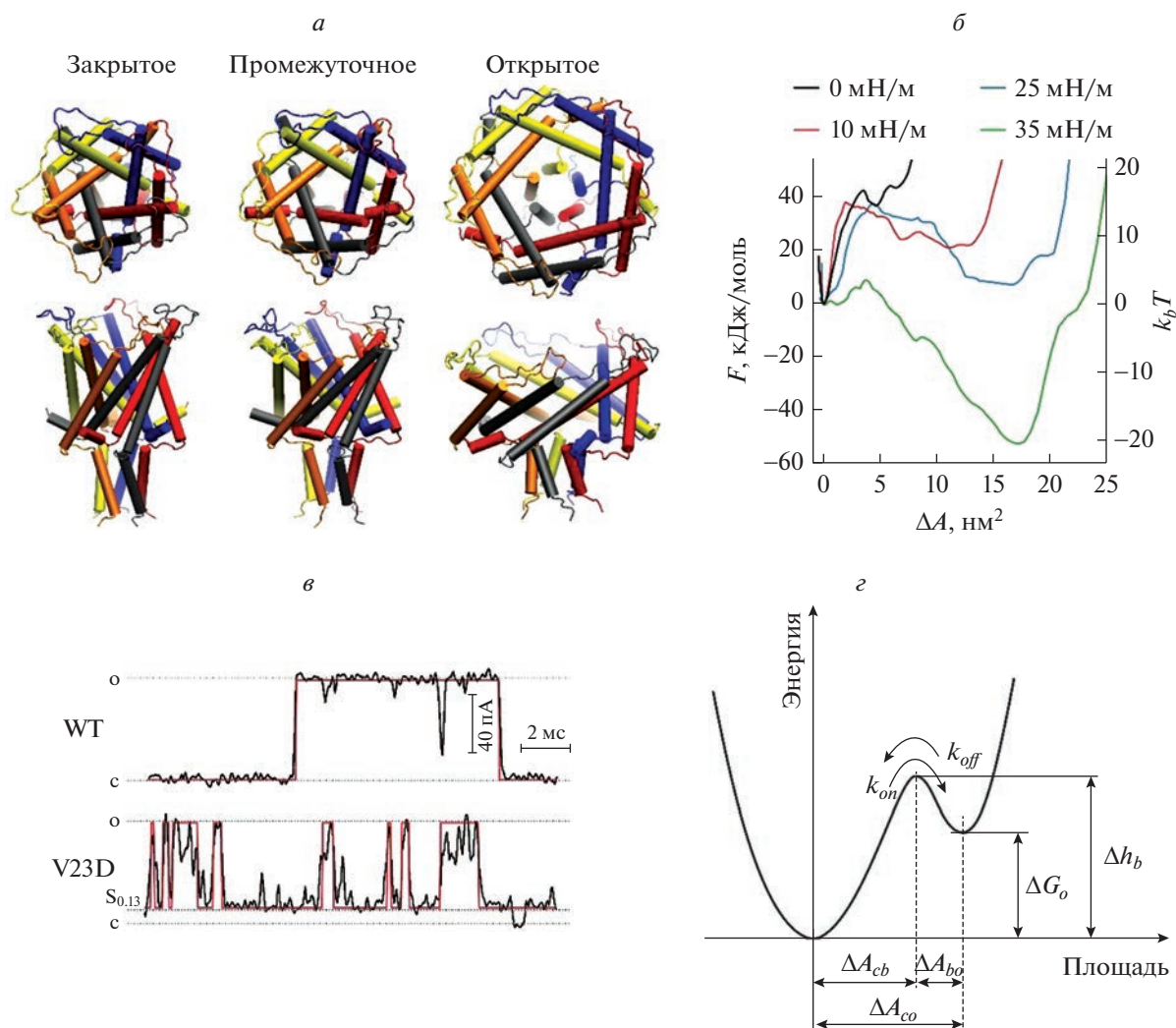


Рис. 9. Механизм открывания MscL. *а* – Открывание TbMscL, смоделированное с использованием метода LDT-MD. Узкая конформация слева представляет собой кристаллическую структуру (PDB ID 1MSL). Структура была уравновешена в бислое PE/PG и растягивалась под действием радиальных сил, приложенных к граничным липидам. Проходя через расширенное промежуточное состояние, канал переходит в открытое состояние, характеризующееся большим наклоном спиральных пар TM2-TM2 (правая панель). *б* – Энергетические профили, рассчитанные при различных натяжениях вдоль координаты расширения. *в* – Примеры записей токов одиночных каналов для дикого типа и мутанта с усиленной функцией V23D MscL, их идеализация (красная запись). *г* – Энергетический профиль для EcMscL, реконструированный по кинетическим данным (Анишкин и др., 2005 [103]). ΔA_{cb} – расстояние от дна ямы закрытого состояния до вершины барьера перехода, составляющее примерно 0.65 расстояния между дном ямы закрытого и дном ямы открытого состояний, ΔA_{co} .

позволило Rajeshwar и коллегам [98] рассчитать профиль свободной энергии канала при различных натяжениях, приложенных к белку (рис. 9б).

Экспериментальные параметры открывания *E. coli* MscL, такие как натяжение в средней точке активации, определяли путем реконструирования в гигантских однослойных липосомах и визуализации кривизны участка мембраны в ходе стимуляции [99]. В настоящее время общепризнано, что натяжение полуактивации ($\gamma_{1/2}$) для MscL составляет около 12 мН/м [8, 99, 100]. С этим параметром кривые активации были аппроксимиро-

ваны с использованием уравнения Больцмана (ур. 1), и было выяснено, что разность энергий открытого и закрытого состояний в отсутствие натяжения (G_0) составляет $\sim 50 kT$ (125 кДж/моль), а увеличение латеральной площади при переходе (ΔA) составляет около 20 нм² [93]. Таким образом, изменение площади канала 17 нм², рассчитанное для TbMscL, хорошо соответствует изменению площади, экспериментально определенному для гомологичного EcMscL. Подобный ирис характер смещений спиралей был подтвержден многочисленными экспериментами, в которых исполь-

зовали сшивание доменов в открытом состоянии дисульфидными мостиками [101], определение липидной и водной доступности различных спиральных доменов с помощью электронного парамагнитного резонанса [102], а также мономолекулярную (single-molecule) флуоресценцию резонансного переноса энергии [97]. Важно отметить, что полностью десольватированные ворота в значительной степени определяют высокий барьер перехода в MscL, что также делает переходы практически мгновенными и сильно согласованными (рис. 9в). Введение в ворота зарядовой мутации с усилением функции (V23D, соответствует положению V21 ворот TbMscL) предрасполагает канал к спонтанному открытию и разбивает синхронные переходы на множество субпроводящих состояний [103].

Параметры латерального расширения площади для открытия MscL, определяемые из эксперимента [93] и из моделирования [98], оказываются близки. Дополнительный параметр, описывающий положение барьера, разделяющего закрытое и открытое состояния в EcMscL, был определен путем анализа индивидуальных зависимостей скоростей открытия (k_{on}) и закрытия (k_{off}) от натяжения [103, 104]. Наклоны этих зависимостей определяют положение переходного барьера при растяжении комплекса примерно до 0.65 от общего изменения площади (рис. 9г) между закрытым и открытым состояниями для MscL дикого типа. Расположение барьера ближе к открытому состоянию делает энергетическую яму, соответствующую закрытому состоянию, более широкой. Поэтому предполагается, что закрытая конформация будет “мягче”, чем открытая, и канал должен пройти существенное “скрытое” расширение, прежде чем он преодолеет переходный барьер и откроется.

Этот переход, сопровождаемый сильным наклоном спиралей, согласуется с рассчитанным профилем латерального давления липидного бислоя [105]. Предполагается, что натяжение, передаваемое через эти пограничные слои мембраны, действует на концы трансмембранных спиралей, вызывая их наклон. Асимметрично встроенные лизолипиды, увеличивающие спонтанную кривизну, могут изгибать мембрану и действовать как мощные активирующие агенты [106].

Канал MscS и его адаптивный функциональный цикл. В экспериментах пэтч-кламп на гигантских сферопластах *E. coli* MscS открывается при натяжении 5–7 мН/м с наклоном кривой $P_o(\gamma)$, соответствующим латеральному расширению белка (ΔA) на 15–18 нм² [89]. Приложение к участку мембраны, содержащему популяцию из ~100 каналов, ступенчатого натяжения вызывает пик тока с

последующим медленным затуханием, которое представляют собой комбинацию трех процессов: закрытие из-за адаптации стимула внутри участка мембраны [107], внутренняя адаптация и полная инактивация.

Это адаптивное поведение позволяет MscS по-разному реагировать в зависимости от скорости приложения натяжения. На рис. 10а показаны четыре записи, зарегистрированные для популяции MscS в участке мембраны, при стимуляции линейно растущим во времени давлением, прикладываемым с разной скоростью [108]. Конечное давление во всех записях одинаково. Полная популяция быстро реагирует на резкое увеличение давления, но только малая часть каналов реагирует на медленное возрастание давления. Такое поведение обусловлено наличием инактивированного состояния, которое не проводит ток и не чувствительно к натяжению.

Как показывает анализ, инактивация и активация вызываются приложением натяжения, и оба процесса начинаются из закрытого состояния [109]. Эти два конформационных пути разделены частично перекрывающимися диапазонами натяжений, каждый из которых управляет отдельным процессом. MscS открывается без признаков инактивации при натяжении выше 8–9 мН/м, что заметно выше средней точки. Что касается зависимости инактивации от натяжения, то она достигает максимума у подножия кривой активации, между порогом и средней точкой (рис. 10б). После инактивации каналы остаются в непроводящем состоянии, пока приложено натяжение, но возвращаются в состояние покоя в течение 2 с после снятия натяжения.

Процесс инактивации критически зависит от натяжения мембраны, но его скорость резко возрастает в присутствии полимеров на цитоплазматической стороне участка мембраны (crowders) [110]. Таким образом, MscS учитывает два независимых механических стимула: латеральное натяжение мембраны (2D) и объемное давление, связанное с высокой плотностью непроницаемых веществ и макромолекул в цитоплазме (3D). Чтобы объяснить, как достигается этот синергизм, и проиллюстрировать полный функциональный цикл MscS, который включает как минимум три основных состояния, мы анализируем имеющиеся структуры и пытаемся с помощью моделирования и вычислений восстановить одно состояние, ранее не выявленное из анализа структур.

На рис. 10д показана структура MscS с его периплазматическим N-концевым доменом (6PWP), полученная в нанодисках [91]. В этой непроводящей конформации видны наклоненные периферические пары спиралей (TM1–TM2), образующие

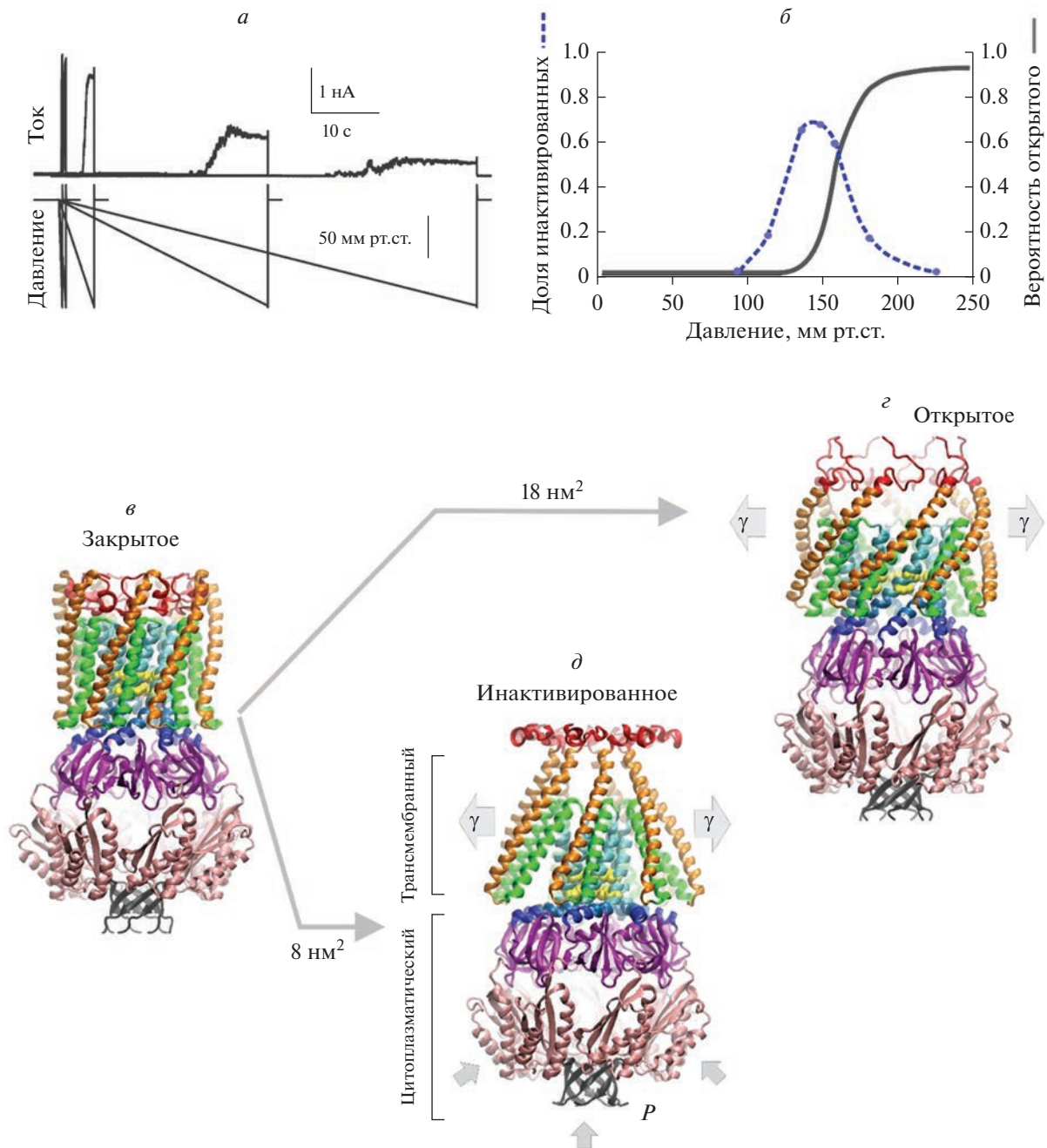


Рис. 10. Адаптивный функциональный цикл бактериального механочувствительного канала MscS. *а* — Реакции популяции MscS в участке мембраны, стимулированные линейными рампами давления, прилагаемыми с разной скоростью (из Boer et al, 2011 [108]). *б* — Вероятности переходов открытия и инактивации в зависимости от давления в участке мембраны (из Akitake et al, 2005 [89]). Вероятность инактивации достигает максимума вблизи порога открытия. *в–д* — Гипотетические переходы MscS в открытое и инактивированное состояния из компактного закрытого (покоящегося) состояния (*в*) с оценкой изменений латеральной площади. Переход в открытое состояние (*г*) сопровождается латеральным расширением $\sim 18 \text{ nm}^2$ и образованием водной поры диаметром 16 Å, окруженной выпрямленными спиралями TM3. Модель открытого состояния воссоздана из структуры крио-ЭМ, полученной в липидах с короткими цепями (PDB ID 6VYL). Инактивированное состояние представлено полной крио-ЭМ структурой MscS, полученной в нанодисках (PDB ID 6PWP), оно характеризуется периферийными (TM1-TM2) спиралями, отсоединенными от образующих пору и ворота спиралей TM3. Инактивированное состояние стабилизируется умеренным натяжением (γ) и давлением макромолекул (P) в цитоплазме. Переход в инактивированное состояние включает отсоединение пар TM1–TM2 от TM3 и сопутствующее образование кристаллографического излома в точке G113, связанное с расширением канала на $\sim 8 \text{ nm}^2$.

ребристую границу белка с липидом. Внутренние ТМ3 спирали выстилают центральную пору с гидрофобными воротами на цитоплазматическом конце, прямо над резким изломом. Горизонтальные части спиралей ТМ3, параллельные плоскости мембраны, продолжают в длинные С-концевые домены от каждой субъединицы, которые объединяются, образуя большой полый цитоплазматический домен с семью боковыми порталами (“клетка”). Существенное расстояние от периферических спиралей ТМ1–ТМ2 до образующих ворота ТМ3 указывает на отсоединенное состояние ворот от доменов, воспринимающих натяжение. Это подразумевает, что структура 6PWP, вероятно, напоминает инактивированную конформацию, в которой прервана связь, передающая натяжение от липидного бислоя к воротам. Переупаковка уширенных ТМ1–ТМ2 пар ближе к ТМ3 позволила восстановить гипотетический физический контакт между воротами и внешними спиралью, обращенными к липиду [111]. Реконструированный гидрофобный контакт ТМ2–ТМ3, по-видимому, является “сцепляющим звеном” и путем передачи силы от липидного бислоя к воротам. Эта “компактная” модель закрытого состояния показана на рис. 10в.

Для моделирования открытого состояния мы рассмотрели кристаллическую структуру мутанта A106V (2VV5), в которой канал оказывается в полуоткрытом состоянии [112], и аналогичную структуру (6VYL), полученную методом крио-ЭМ в нанодисках, сформированных из липидов с короткими цепями [92]. Моделирование перехода открытия с экспериментально определенным расширением трансмембранного домена на 15–18 нм² дает пору диаметром 16 Å, которая хорошо согласуется с проводимостью одиночного канала 1.1–1.2 нСм. При открывании выпрямляются спирали ТМ3, имеющие две консервативные шарнирные точки (глицины G113 и G121). ТМ3 спирали, таким образом, действуют как “складные распорки” [94]. Модель полностью открытого состояния, полученная из крио-ЭМ структур, представлена на рис. 10г.

Мутации, увеличивающие вероятность и скорость инактивации, представляют собой гидрофильные замены в реконструированной зоне контакта ТМ2–ТМ3. Они приводят к немедленной инактивации канала без открытия, что указывает на то, что контакт ТМ2–ТМ3 представляет собой лабильную “скользящую связь”, передающую натяжение на ворота [95]. Из зависимостей скорости инактивации и восстановления от натяжения [110] было определено, что отсоединение ворот связано с латеральным расширением примерно на 8 нм², что согласуется с движением на-

ружу пар ТМ1–ТМ2, как в конформациях, зафиксированных в кристалле 2OAU и крио-ЭМ структуре 6PWP.

MscS быстро инактивируется, когда на цитоплазматической стороне присутствуют макромолекулы или полимеры (5–10 об. %) [110]. Возникающее макромолекулярное давление, по-видимому, делает путь инактивации более предпочтительным. Моделирование методами МД закрытых и инактивированных моделей показало, что положение полого цитоплазматического домена таково, что цитоплазматическая часть белка более компактна в инактивированном состоянии по сравнению с закрытым состоянием [110]. Приложение радиально симметричного давления к области полого домена при моделировании МД для имитации эффекта повышения концентрации макромолекул приводит к большему расширению пар ТМ1–ТМ2, что увеличивает площадь проекции канала на мембране. Это аллостерическое взаимодействие между цитоплазматическим и трансмембранным доменами убедительно свидетельствует о том, что давление, связанное с высокой концентрацией макромолекул, будет помогать натяжению отделить периферические спирали от центральной поры и способствовать отсоединению ворот. Для объяснения биологического смысла наблюдаемого влияния высокой концентрации макромолекул на инактивацию MscS, следует предположить, что в ходе повышения проницаемости в ответ на осмотический стресс, канал получает обратную связь о состоянии цитоплазмы. Увеличенный исключенный объем макромолекул, воспринимаемый клеткообразным доменом как макромолекулярное давление, отсоединяет ворота. Этот механизм обратной связи предотвращает обезвоживание клеток при высвобождении избыточных цитоплазматических осмолитов во время адаптации тургора к гипотонической среде [110].

Такое сложное поведение MscS было отточено эволюцией для минимизации потерь метаболитов во время приспособления к широкому спектру осмотических шоков. Другая предполагаемая роль инактивации MscS, по-видимому, заключается в полной герметизации мембраны в конце периода высокой осмотической проницаемости тогда, когда клетка уже сбросила опасное давление и процесс выхода метаболитов необходимо прекратить. Важно отметить, что как у MscS, так и у MscL в непроводящем состоянии ворота полностью дегидратированы, что позволяет им оставаться полностью герметичными в закрытом состоянии во внутренней энергопреобразующей бактериальной мембране, обычно находящейся под напряжением до –180 мВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ встречаемости каналов в разных таксонах организмов показывает интересные случаи наследования молекулярной организации от менее развитых форм к более сложным, как показано на примере MscS, перешедшего с малыми изменениями к грибам и растениям от бактерий. Также имеются случаи четкого разграничения между таксонами, примером чего является MscL, который найден почти исключительно в прокариотическом мире (бактерии и археи). Некоторые типы каналов являются общими как для животных, так и для растений; к ним относятся Piezo, K2Ps, а также каналы из семейства TMEM16/OSCA. ENaC и TRP не обнаружены у высших растений. МСА каналы, специфичные для растений, никогда не встречаются у животных.

Это преобладание специфических типов механочувствительных каналов в разных таксонах, по-видимому, следует за древним разделением в зависимости от того, как организмы справляются с вездесущими осмотическими силами. Организмы, окруженные жесткой клеточной стенкой, используют гидростатическое (тургорное) давление для поддержания своей формы и объема. В этих клетках осмотически активная цитоплазматическая мембрана постоянно оказывает нормальное давление на клеточную стенку. Прокариоты, покрытые эластичным пептидогликановым слоем, обрели MscS для регуляции внутреннего тургора и гидратации цитоплазмы, а MscL — как аварийный клапан для предотвращения чрезмерного растяжения эластичного пептидогликанового слоя и мембраны. Сочетание тургора и давления, связанного с высокой концентрацией макромолекул, действующих на MscS в направлении, нормальном к плоскости мембраны, является доминирующей силой, действующей на полый цитоплазматический домен канала. Предположительно, по этой причине MscS и его гомологи обнаружены только в организмах с клеточной стенкой (бактерии, археи, водоросли, грибы и растения). Растения, окруженные особенно жесткой клеточной стенкой, унаследовали и разнообразили MscS, который теперь присутствует во всех растительных клетках и симбиотических органеллах, подверженных тургорному давлению.

Противоположная тенденция отмечается у животных, которые воспользовались сократительной способностью актомиозина и отказались от внешней стенки. Чтобы выдерживать осмотические силы, освободившиеся клетки развили мощный внутренний цитоскелет, который сдерживает осмотическое набухание за счет многочисленных точек крепления цитоскелета к сильно складчатой мембране. Большой избыток пло-

щади мембраны в типичной животной клетке обеспечивает свободу формы и регулировки объема. Предполагается, что в отсутствие сильных возмущений глобальное натяжение в мембране клеток животных близко к нулю, однако деформация клетки и прикрепление к субстрату могут вызывать локальное натяжение мембраны [113]. Предполагается, что локальные всплески натяжения будут скоротечными из-за способности мембраны течь. Каналы из семейств DEG/ENaC или TRP, для которых взаимодействие с цитоскелетом показано или предполагается, являются строго животными и не обнаружены у высших растений; однако в геномах растений присутствует единственный гомолог Piezo. Piezo, широко распространенные у животных, эволюционировали специально для функционирования в складчатой плазматической мембране, имеющей каркас, и, видимо, наиболее приспособлены для отслеживания локальных изменений натяжения. Каналы Piezo функционируют специфически в искривленных участках мембраны и регистрируют незначительное напряжение, которое не сильно растягивает, а скорее расправляет складчатую мембрану.

По-видимому, в самой ранней конструкции мембранных механопреобразователей использовался простейший принцип “сила от липида” для открывания, движимого непосредственно натяжением мембраны. TRP, K2P, Piezo унаследовали этот древний механизм, и только высокоспециализированные каналы, такие как NompC, MECs и слуховой канал, были помещены в определенные места и стали реагировать на силу в одном определенном направлении и, таким образом, оказались связаны с филаментами цитоскелета или внеклеточного матрикса. Относительно роли липидного бислоя, мы должны помнить, что Gd^{3+} и GsMTx4, два типичных блокатора/модификатора механочувствительных каналов, работают путем взаимодействия с липидами. Gd^{3+} конденсирует анионные липиды вокруг канала, индуцируя положительное давление, удерживающее канал закрытым [114]. Пептид GsMTx4 неглубоко встраивается в покоящуюся мембрану, но проникает глубже в натянутаю мембрану. Привнося в мембрану свою молекулярную площадь, GsMTx4 компенсирует часть возмущающего натяжения и действует как подвижный амфипатический материал, фиксирующий латеральное давление во внешнем монослое мембраны, тем самым сдвигая кривые активации Piezo вправо [74].

Обычно методы генетического нокаута или нокдауна редко демонстрируют функциональный эффект по принципу “все или ничего”, относящийся к одному интересующему белку. Экспери-

менты часто выявляют несколько компонентов с перекрывающимися диапазонами чувствительности и некоторой избыточностью. Это говорит о том, что принципы эволюционированности (evolvability) [115] полностью применимы к эволюции механосенсорных систем, которая выбрала несколько консервативных конструкций МЧ-каналов, диверсифицировала их и смешала в разных контекстах, где комбинация работает лучше, чем любой отдельный тип. Очевидное организационное сходство между липидными скрамблазами (TMEM16) и механочувствительными каналами (OSCA, TMC) подчеркивает исключительно оппортунистический ход эволюции. Комбинирование различных типов каналов с различными типами каркасов может дополнительно изменить порог и наклон активации, а также адаптивную способность.

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

Благодарности. Авторы благодарят Дэвида Кори и Элизабет Хасвелл за критические комментарии.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wolfenson H., Yang B., Sheetz M.P. 2019. Steps in mechanotransduction pathways that control cell morphology. *Ann. Rev. Physiol.* **81**, 585–605.
- Yasuda N., Miura S., Akazawa H., Tanaka T., Qin Y., Kiya Y., Imaizumi S., Fujino M., Ito K., Zou Y., Fukuhara S., Kunitomo S., Fukuzaki K., Sato T., Ge J., Mochizuki N., Nakaya H., Saku K., Komuro I. 2008. Conformational switch of angiotensin II type 1 receptor underlying mechanical stress-induced activation. *EMBO Rep.* **9** (2), 179–186. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401157>
- Foo Y.H., Gao Y., Zhang H., Kenney L.J. 2015. Cytoplasmic sensing by the inner membrane histidine kinase EnvZ. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **118** (3), 119–129.
- Abeytunge S., Gianoli F., Hudspeth A.J., Kozlov A.S. 2021. Rapid mechanical stimulation of inner-ear hair cells by photonic pressure. *Elife*. **10**, e65930.
- Handler A., Ginty D.D. 2021. The mechanosensory neurons of touch and their mechanisms of activation. *Nat. Rev. Neurosci.* **22** (9), 521–537.
- Cetiner U., Rowe I., Schams A., Mayhew C., Rubin D., Anishkin A., Sukharev S. 2017. Tension-activated channels in the mechanism of osmotic fitness in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Physiol.* **149** (5), 595–609.
- Corey D.P., Hudspeth A.J. 1979. Response latency of vertebrate hair cells. *Biophys. J.* **26** (3), 499–506.
- Moe P., Blount P. 2005. Assessment of potential stimuli for mechano-dependent gating of MscL: effects of pressure, tension, and lipid headgroups. *Biochemistry*. **44** (36), 12239–12244.
- Syeda R. 2021. Physiology and pathophysiology of mechanically activated PIEZO channels. *Ann. Rev. Neurosci.* **44**, 383–402.
- Corey D.P., Hudspeth A.J. 1979. Ionic basis of the receptor potential in a vertebrate hair cell. *Nature*. **281** (5733), 675–677.
- Beurg M., Fettiplace R., Nam J.H., Ricci A.J. 2009. Localization of inner hair cell mechanotransducer channels using high-speed calcium imaging. *Nature Neurosci.* **12** (5), 553–558.
- Ricci A.J., Crawford A.C., Fettiplace R. 2003. Tonic variation in the conductance of the hair cell mechanotransducer channel. *Neuron*. **40** (5), 983–990.
- Longo-Guess C.M., Gagnon L.H., Cook S.A., Wu J., Zheng Q.Y., Johnson K.R. 2005. A missense mutation in the previously undescribed gene Tmhs underlies deafness in hurry-scurry (hscy) mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (22), 7894–7899.
- Kawashima Y., Geleoc G.S., Kurima K., Labay V., Lelli A., Asai Y., Makishima T., Wu D.K., Della Santina C.C., Holt J.R., Griffith A.J. 2011. Mechano-transduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *J. Clin. Invest.* **121** (12), 4796–4809.
- Pan B., Akyuz N., Liu X.P., Asai Y., Nist-Lund C., Kurima K., Derfler B.H., Gyorgy B., Limapichat W., Walujkar S., Wimalasena L.N., Sotomayor M., Corey D.P., Holt J.R. 2018. TMC1 forms the pore of mechanosensory transduction channels in vertebrate inner ear hair cells. *Neuron*. **99** (4), 736–753.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.033>
- Cunningham C.L., Qiu X., Wu Z., Zhao B., Peng G., Kim Y.H., Lauer A., Muller U. 2020. TMIE defines pore and gating properties of the mechanotransduction channel of mammalian cochlear hair cells. *Neuron*. **107** (1), 126–143. e128.
- Gyobu S., Ishihara K., Suzuki J., Segawa K., Nagata S. 2017. Characterization of the scrambling domain of the TMEM16 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114** (24), 6274–6279.
- Jeong H., Clark S., Goehring A., Dehghani-Ghahnavieh S., Rasouli A., Tajkhorshid E., Gouaux E. 2022. Structure of *C. elegans* TMC-1 complex illuminates auditory mechanosensory transduction. *Preprint*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1623715/v1>
- Sotomayor M., Weihofen W.A., Gaudet R., Corey D.P. 2012. Structure of a force-conveying cadherin bond essential for inner-ear mechanotransduction. *Nature*. **492** (7427), 128–132.
- Ge J., Elferich J., Goehring A., Zhao H., Schuck P., Gouaux E. 2018. Structure of mouse protocadherin 15 of the stereocilia tip link in complex with LHFPL5. *Elife*. **7**.

21. Guharay F., Sachs F. 1984. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J. Physiol.* **352**, 685–701.
22. Martinac B., Buechner M., Delcour A.H., Adler J., Kung C. 1987. Pressure-sensitive ion channel in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** (8), 2297–2301.
23. Gustin M.C., Zhou X.L., Martinac B., Kung C. 1988. A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science.* **242** (4879), 762–765.
24. Zhang Y., Gao F., Popov V.L., Wen J.W., Hamill O.P. 2000. Mechanically gated channel activity in cytoskeleton-deficient plasma membrane blebs and vesicles from *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* **523 Pt 1**, 117–130.
25. Cosgrove D.J., Hedrich R. 1991. Stretch-activated chloride, potassium, and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba* L. *Planta.* **186** (1), 143–153.
26. Hamill O.P., McBride D.W., Jr. 1996. The pharmacology of mechanogated membrane ion channels. *Pharmacol. Rev.* **48** (2), 231–252.
27. Bae C., Sachs F., Gottlieb P.A. 2011. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry.* **50** (29), 6295–6300.
28. Chalfie M., Sulston J. 1981. Developmental genetics of the mechanosensory neurons of *Caenorhabditis elegans*. *Develop. Biol.* **82** (2), 358–370.
29. Arnadottir J., Chalfie M. 2010. Eukaryotic mechanosensitive channels. *Ann. Rev. Biophys.* **39**, 111–137.
30. Arnadottir J., O'Hagan R., Chen Y., Goodman M.B., Chalfie M. 2011. The DEG/ENaC protein MEC-10 regulates the transduction channel complex in *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *J. Neurosci.* **31** (35), 12695–12704.
31. Geffeney S.L., Goodman M.B. 2012. How we feel: Ion channel partnerships that detect mechanical inputs and give rise to touch and pain perception. *Neuron.* **74** (4), 609–619.
32. Adams C.M., Anderson M.G., Motto D.G., Price M.P., Johnson W.A., Welsh M.J. 1998. Ripped pocket and pickpocket, novel *Drosophila* DEG/ENaC subunits expressed in early development and in mechanosensory neurons. *J. Cell Biol.* **140** (1), 143–152.
33. Ruthe H.J., Adler J. 1985. Fusion of bacterial spheroplasts by electric fields. *Biochim. Biophys. Acta.* **819** (1), 105–113.
34. Sukharev S.I., Martinac B., Arshavsky V.Y., Kung C. 1993. Two types of mechanosensitive channels in the *Escherichia coli* cell envelope: Solubilization and functional reconstitution. *Biophys. J.* **65** (1), 177–183.
35. Berrier C., Besnard M., Ajouz B., Coulombe A., Ghazi A. 1996. Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure. *J. Membr. Biol.* **151** (2), 175–187.
36. Sukharev S.I., Blount P., Martinac B., Blattner F.R., Kung C. 1994. A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature.* **368** (6468), 265–268.
37. Levina N., Totemeyer S., Stokes N.R., Louis P., Jones M.A., Booth I.R. 1999. Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: Identification of genes required for MscS activity. *EMBO J.* **18** (7), 1730–1737.
38. Li Y., Moe P.C., Chandrasekaran S., Booth I.R., Blount P. 2002. Ionic regulation of MscK, a mechanosensitive channel from *Escherichia coli*. *EMBO J.* **21** (20), 5323–5330.
39. Edwards M.D., Black S., Rasmussen T., Rasmussen A., Stokes N.R., Stephen T.L., Miller S., Booth I.R. 2012. Characterization of three novel mechanosensitive channel activities in *Escherichia coli*. *Channels.* **6**(4), 272–281.
40. Sukharev S. 2002. Purification of the small mechanosensitive channel of *Escherichia coli* (MscS): The subunit structure, conduction, and gating characteristics in liposomes. *Biophys. J.* **83** (1), 290–298.
41. Steinbacher S., Bass R., Strop P., Rees D.C. 2007. Structures of the prokaryotic mechanosensitive channels MscL and MscS. *Mechanosensitive Ion Channels, Part A.* **58**, 1–24.
42. Balleza D., Gomez-Lagunas F. 2009. Conserved motifs in mechanosensitive channels MscL and MscS. *Eur. Biophys. J.* **38** (7), 1013–1027.
43. Hamilton E.S., Schlegel A.M., Haswell E.S. 2015. United in diversity: Mechanosensitive ion channels in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **66**, 113–137.
44. Qi Z., Kishigami A., Nakagawa Y., Iida H., Sokabe M. 2004. A mechanosensitive anion channel in *Arabidopsis thaliana* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* **45** (11), 1704–1708.
45. Ding J.P., Pickard B.G. 1993. Mechanosensory calcium-selective cation channels in epidermal cells. *Plant J.* **3** (1), 83–110.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.1993.tb00013.x>
46. Fujiu K., Nakayama Y., Iida H., Sokabe M., Yoshimura K. 2011. Mechanoreception in motile flagella of *Chlamydomonas*. *Nature Cell Biol.* **13** (5), 630–632.
47. Procko C., Murthy S., Keenan W.T., Mousavi S.A.R., Dabi T., Coombs A., Procko E., Baird L., Patapoutian A., Chory J. 2021. Stretch-activated ion channels identified in the touch-sensitive structures of carnivorous Droseraceae plants. *Elife.* **10**.
48. Maathuis F.J.M. 2011. Vacuolar two-pore K⁺ channels act as vacuolar osmosensors. *New Phytol.* **191** (1), 84–91.
49. Murthy S.E., Dubin A.E., Whitwam T., Jojoa-Cruz S., Cahalan S.M., Mousavi S.A.R., Ward A.B., Patapoutian A. 2018. OSCA/TMEM63 are an evolutionarily conserved family of mechanically activated ion channels. *Elife.* **7**.
50. Honore E., Patel A.J., Chemin J., Suchyna T., Sachs F. 2006. Desensitization of mechano-gated K2P channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103** (18), 6859–6864.

51. Honore E. 2007. The neuronal background K2P channels: Focus on TREK1. *Nat. Rev. Neurosci.* **8** (4), 251–261.
52. Brohawn S.G., Su Z., MacKinnon R. 2014. Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (9), 3614–3619.
53. Brohawn S.G., del Marmol J., MacKinnon R. 2012. Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science.* **335** (6067), 436–441.
54. Gees M., Owsianik G., Nilius B., Voets T. 2012. TRP channels. *Comprehensive Physiol.* **2** (1), 563–608.
55. Zhou X.L., Batiza A.F., Loukin S.H., Palmer C.P., Kung C., Saimi Y. 2003. The transient receptor potential channel on the yeast vacuole is mechanosensitive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (12), 7105–7110.
56. Ahmed T., Nisler C.R., Fluck E.C., 3rd, Walujkar S., Sotomayor M., Moiseenkova-Bell V.Y. 2022. Structure of the ancient TRPY1 channel from *Saccharomyces cerevisiae* reveals mechanisms of modulation by lipids and calcium. *Structure.* **30** (1), 139–155. e135.
57. Loukin S., Su Z., Zhou X., Kung C. 2010. Forward genetic analysis reveals multiple gating mechanisms of TRPV4. *J. Biol. Chem.* **285** (26), 19884–19890.
58. Jin P., Bulkley D., Guo Y., Zhang W., Guo Z., Huynh W., Wu S., Meltzer S., Cheng T., Jan L.Y., Jan Y.N., Cheng Y. 2017. Electron cryo-microscopy structure of the mechanotransduction channel NOMPC. *Nature.* **547** (7661), 118–122.
<https://doi.org/10.1038/nature22981>
59. Liang X., Madrid J., Gartner R., Verbavatz J.M., Schiklenk C., Wilsch-Brauninger M., Bogdanova A., Stenger F., Voigt A., Howard J. 2013. A NOMPC-dependent membrane-microtubule connector is a candidate for the gating spring in fly mechanoreceptors. *Curr. Biol.* **23** (9), 755–763.
60. Wang Y., Guo Y., Li G., Liu C., Wang L., Zhang A., Yan Z., Song C. 2021. The push-to-open mechanism of the tethered mechanosensitive ion channel NompC. *Elife.* **10**.
61. Nauli S.M., Alenghat F.J., Luo Y., Williams E., Vasilev P., Li X., Elia A.E., Lu W., Brown E.M., Quinn S.J., Ingber D.E., Zhou J. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics.* **33** (2), 129–137.
<https://doi.org/10.1038/ng1076>
62. Delmas P. 2004. The gating of polycystin signaling complex. *Biol. Res.* **37** (4), 681–691.
63. Kunzelmann K. 2015. TMEM16, LRRC8A, bestrophin: chloride channels controlled by Ca²⁺ and cell volume. *Trends Biochem. Sci.* **40** (9), 535–543.
64. Syeda R., Qiu Z., Dubin A.E., Murthy S.E., Florendo M.N., Mason D.E., Mathur J., Cahalan S.M., Peters E.C., Montal M., Patapoutian A. 2016. LRRC8 proteins form volume-regulated anion channels that sense ionic strength. *Cell.* **164** (3), 499–511.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.031>
65. Saotome K., Murthy S.E., Kefauver J.M., Whitwam T., Patapoutian A., Ward A.B. 2018. Structure of the mechanically activated ion channel Piezo1. *Nature.* **554** (7693), 481–486.
66. Coste B., Mathur J., Schmidt M., Earley T.J., Ranade S., Petrus M.J., Dubin A.E., Patapoutian A. 2010. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science.* **330** (6000), 55–60.
67. Lewis A.H., Grandl J. 2015. Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension. *Elife.* **4**.
68. Cox C.D., Bae C., Ziegler L., Hartley S., Nikolova-Krstevski V., Rohde P.R., Ng C.A., Sachs F., Göttslieb P.A., Martinac B. 2016. Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nature Comm.* **7**, 10366.
69. Maneshi M.M., Ziegler L., Sachs F., Hua S.Z., Göttslieb P.A. 2018. Enantiomeric Abeta peptides inhibit the fluid shear stress response of PIEZO1. *Sci. Rep.* **8** (1), 14267.
70. Guo Y.R., MacKinnon R. 2017. Structure-based membrane dome mechanism for Piezo mechanosensitivity. *Elife.* **6**.
71. Wang L., Zhou H., Zhang M., Liu W., Deng T., Zhao Q., Li Y., Lei J., Li X., Xiao B. 2019. Structure and mechanogating of the mammalian tactile channel PIEZO2. *Nature.* **573** (7773), 225–229.
72. Lee W., Leddy H.A., Chen Y., Lee S.H., Zelenski N.A., McNulty A.L., Wu J., Beicker K.N., Coles J., Zauscher S., Grandl J., Sachs F., Guilak F., Liedtke W.B. 2014. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111** (47), E5114–E5122.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1414298111>
73. Zeng W.Z., Marshall K.L., Min S., Daou I., Chapleau M.W., Abboud F.M., Liberles S.D., Patapoutian A. 2018. PIEZO2 mediate neuronal sensing of blood pressure and the baroreceptor reflex. *Science.* **362** (6413), 464–467.
74. Gnanasambandam R., Ghatak C., Yasman A., Nishizawa K., Sachs F., Ladokhin A.S., Sukharev S.I., Suchyna T.M. 2017. GsMTx4: Mechanism of inhibiting mechanosensitive ion channels. *Biophys. J.* **112** (1), 31–45.
75. Xiao B. 2020. Levering mechanically activated piezo channels for potential pharmacological intervention. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **60**, 195–218.
76. Young M., Lewis A.H., Grandl J. 2022. Physics of mechanotransduction by Piezo ion channels. *J. Gen. Physiol.* **154** (7).
77. Carattino M.D., Sheng S., Kleyman T.R. 2004. Epithelial Na⁺ channels are activated by laminar shear stress. *J. Biol. Chem.* **279**(6), 4120–4126.
78. Corey D.P., Hudspeth A.J. 1983. Kinetics of the receptor current in bullfrog saccular hair cells. *J. Neurosci.* **3** (5), 962–976.

79. Markin V.S., Sachs F. 2004. Thermodynamics of mechanosensitivity. *Phys. Biol.* **1**(1–2), 110–124.
80. Hille B. 2001. *Ion channels of excitable membranes*. 3rd edn. Sunderland, Mass.: Sinauer, 2001.
81. Sachs F. 2010. Stretch-activated ion channels: What are they? *Physiol.* **25**(1), 50–56.
82. Zheng W., Gracheva E.O., Bagriantsev S.N. 2019. A hydrophobic gate in the inner pore helix is the major determinant of inactivation in mechanosensitive Piezo channels. *Elife*. **8**.
83. Vollrath M.A., Kwan K.Y., Corey D.P. 2007. The micromachinery of mechanotransduction in hair cells. *Ann. Rev. Neurosci.* **30**, 339–365.
84. Markin V.S., Hudspeth A.J. 1995. Gating-spring models of mechanoelectrical transduction by hair cells of the internal ear. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 59–83.
85. Cheung E.L., Corey D.P. 2006. Ca^{2+} changes the force sensitivity of the hair-cell transduction channel. *Biophys. J.* **90** (1), 124–139.
86. Kachar B., Parakkal M., Kurc M., Zhao Y., Gillespie P.G. 2000. High-resolution structure of hair-cell tip links. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97** (24), 13336–13341.
87. Powers R.J., Kulason S., Atilgan E., Brownell W.E., Sun S.X., Barr-Gillespie P.G., Spector A.A. 2014. The local forces acting on the mechanotransduction channel in hair cell stereocilia. *Biophys. J.* **106**(11), 2519–2528.
88. Bialecka-Fornal M., Lee H.J., Deberg H.A., Gandhi C.S., Phillips R. 2012. Single-cell census of mechanosensitive channels in living bacteria. *PLoS One*. **7**(3), e33077.
89. Akitake B., Anishkin A., Sukharev S. 2005. The “dashpot” mechanism of stretch-dependent gating in MscS. *J. Gen. Physiol.* **125** (2), 143–154.
90. Chang G., Spencer R.H., Lee A.T., Barclay M.T., Reyes D.C. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A gated mechanosensitive ion channel. *Science*. **282** (5397), 2220–2226.
91. Reddy B., Bavi N., Lu A., Park Y., Perozo E. 2019. Molecular basis of force-from-lipids gating in the mechanosensitive channel MscS. *Elife*. **8**.
92. Zhang Y., Daday C., Gu R.X., Cox C.D., Martinac B., de Groot B.L., Walz T. 2021. Visualization of the mechanosensitive ion channel MscS under membrane tension. *Nature*. **590** (7846), 509–514.
93. Chiang C.S., Anishkin A., Sukharev S. 2004. Gating of the large mechanosensitive channel in situ: estimation of the spatial scale of the transition from channel population responses. *Biophys. J.* **86** (5), 2846–2861.
94. Akitake B., Anishkin A., Liu N., Sukharev S. 2007. Straightening and sequential buckling of the pore-lining helices define the gating cycle of MscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (12), 1141–1149.
95. Belyy V., Anishkin A., Kamaraju K., Liu N., Sukharev S. 2010. The tension-transmitting 'clutch' in the mechanosensitive channel MscS. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17** (4), 451–458.
96. Vasquez V., Sotomayor M., Cordero-Morales J., Schulten K., Perozo E. 2008. A structural mechanism for MscS gating in lipid bilayers. *Science*. **321** (5893), 1210–1214.
97. Corry B., Hurst A.C., Pal P., Nomura T., Rigby P., Martinac B. 2010. An improved open-channel structure of MscL determined from FRET confocal microscopy and simulation. *J. Gen. Physiol.* **136** (4), 483–494.
98. Rajeshwar T.R., Anishkin A., Sukharev S., Vanegas J.M. 2021. Mechanical activation of MscL revealed by a locally distributed tension molecular dynamics approach. *Biophys. J.* **120** (2), 232–242.
99. Sukharev S.I., Sigurdson W.J., Kung C., Sachs F. 1999. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *J. Gen. Physiol.* **113** (4), 525–540.
100. Nomura T., Cranfield C.G., Deplazes E., Owen D.M., Macmillan A., Battle A.R., Constantine M., Sokabe M., Martinac B. 2012. Differential effects of lipids and lyso-lipids on the mechanosensitivity of the mechanosensitive channels MscL and MscS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109** (22), 8770–8775.
101. Betanzos M., Chiang C.S., Guy H.R., Sukharev S. 2002. A large iris-like expansion of a mechanosensitive channel protein induced by membrane tension. *Nat. Struct. Biol.* **9** (9), 704–710.
102. Perozo E., Cortes D.M., Somporpnisut P., Kloda A., Martinac B. 2002. Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature*. **418** (6901), 942–948.
103. Anishkin A., Chiang C.S., Sukharev S. 2005. Gain-of-function mutations reveal expanded intermediate states and a sequential action of two gates in MscL. *J. Gen. Physiol.* **125** (2), 155–170.
104. Sukharev S.I., Sigurdson W.J., Kung C., Sachs F. 1999. Energetic and spatial parameters for gating of the bacterial large conductance mechanosensitive channel, MscL. *J. Gen. Physiol.* **113** (4), 525–540.
105. Gullingsrud J., Schulten K. 2004. Lipid bilayer pressure profiles and mechanosensitive channel gating. *Biophys. J.* **86** (6), 3496–3509.
106. Perozo E., Kloda A., Cortes D.M., Martinac B. 2002. Physical principles underlying the transduction of bilayer deformation forces during mechanosensitive channel gating. *Nat. Struct. Biol.* **9** (9), 696–703.
107. Belyy V., Kamaraju K., Akitake B., Anishkin A., Sukharev S. 2010. Adaptive behavior of bacterial mechanosensitive channels is coupled to membrane mechanics. *J. Gen. Physiol.* **135** (6), 641–652.
108. Boer M., Anishkin A., Sukharev S. 2011. Adaptive MscS gating in the osmotic permeability response in *E. coli*: The question of time. *Biochemistry*. **50** (19), 4087–4096.
109. Kamaraju K., Belyy V., Rowe I., Anishkin A., Sukharev S. 2011. The pathway and spatial scale for MscS inactivation. *J. Gen. Physiol.* **138** (1), 49–57.

110. Rowe I., Anishkin A., Kamaraju K., Yoshimura K., Sukharev S. 2014. The cytoplasmic cage domain of the mechanosensitive channel MscS is a sensor of macromolecular crowding. *J. Gen. Physiol.* **143** (5), 543–557.
111. Anishkin A., Akitake B., Sukharev S. 2008. Characterization of the resting MscS: Modeling and analysis of the closed bacterial mechanosensitive channel of small conductance. *Biophys. J.* **94** (4), 1252–1266.
112. Wang W., Black S.S., Edwards M.D., Miller S., Morrison E.L., Bartlett W., Dong C., Naismith J.H., Booth I.R. 2008. The structure of an open form of an *E. coli* mechanosensitive channel at 3.45 Å resolution. *Science*. **321** (5893), 1179–1183.
113. Shi Z., Graber Z.T., Baumgart T., Stone H.A., Cohen A.E. 2018. Cell membranes resist flow. *Cell*. **175** (7), 1769–1779 e1713.
114. Ermakov Y.A., Kamaraju K., Sengupta K., Sukharev S. 2010. Gadolinium ions block mechanosensitive channels by altering the packing and lateral pressure of anionic lipids. *Biophys. J.* **98** (6), 1018–1027.
115. Kirschner M., Gerhart J. 1998. Evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95** (15), 8420–8427.

Mechanosensitive Channels: History, Diversity, and Emerging Mechanisms

S. Sukharev^{1, 2, *}, A. Anishkin^{1, **}

¹Department of Biology, University of Maryland, College Park, MD 20742 USA

²Institute of Physical Science and Technology, University of Maryland, College Park, MD 20742 USA

*e-mail: sukharev@umd.edu

**e-mail: anisan@umd.edu

Mechanical forces are inseparable from most cellular functions. Cell division, contraction and adhesion generate intrinsic forces in the cells, whereas perturbations in the environment such as osmotic shifts, mechanical pressure, shear or sound represent the external forces that the cells gauge and respond to. Mechanosensitive (MS) ion channels, which are the fastest mechanotransducers, represent a polyphyletic group with vastly diverse structural designs. In this review we briefly outline the history of the field by presenting major findings in a nearly chronological order, describe structural features of different groups and attempt to illustrate some common physical principles of their gating mechanisms.

Keywords: mechanosensitive ion channels, force, membrane tension, pressure, cytoskeleton, ECM, gating, adaptation, inactivation

УДК 577.21

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ С ЕДИНСТВЕННОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ИЗОФОРМОЙ IP_3 -РЕЦЕПТОРА

© 2023 г. Е. Е. Копылова^а, Е. А. Воронова^а, Н. В. Кабанова^а,
О. А. Рогачевская^а, М. Ф. Быстрова^а, С. С. Колесников^а, *

^аИнститут биофизики клетки РАН ФИЦ ПНЦБ РАН,

Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: staskolesnikov@yahoo.com

Поступила в редакцию 29.08.2022 г.

После доработки 29.09.2022 г.

Принята к публикации 03.10.2022 г.

Многие агонисты регулируют клеточные функции, стимулируя поверхностные рецепторы сопряженные фосфоинозитидным каскадом с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . В невозбудимых клетках генерация внутриклеточных Ca^{2+} сигналов протекает преимущественно за счет выброса Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо, локализованного в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). В этой системе IP_3 -рецепторы, являющиеся внутриклеточным IP_3 -активируемыми Ca^{2+} -каналами, обеспечивают регулируемый выброс депонированного Ca^{2+} в ответ на стимуляцию клеток. Ряд факторов затрудняет анализ специфической роли IP_3 -рецепторов в физиологии клетки и их регуляторных механизмов. Во-первых, три гена кодируют IP_3 -рецепторы, и в клетках обычно экспрессированы два из них или даже все гены. При этом разные изоформы IP_3 -рецепторов находятся под контролем различных механизмов. Кроме того, изоформоспецифичные антагонисты IP_3 -рецепторов не идентифицированы на данный момент. Клеточные линии, экспрессирующие IP_3 -рецепторы только одного типа, представляют собой эффективную клеточную модель для исследования регуляторных механизмов, фармакологии и физиологической роли изоформ IP_3 -рецепторов. В данной работе мы использовали CRISPR/Cas9 технологию для инактивации генов IP_3 -рецепторов в клетках НЕК-293, экспрессирующих все три гена этих белков. Были получены моноклоны генетически модифицированных клеток НЕК-293 и идентифицированы те из них, которые содержали биаллельные инактивирующие мутации в двух из трех генов IP_3 -рецепторов. В результате были получены моноклональные клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора, которые можно использовать для исследования роли данного подтипа IP_3 -рецептора в агонист-индуцированной Ca^{2+} -сигнализации и анализа его регуляторных механизмов.

Ключевые слова: IP_3 -рецепторы, CRISPR/Cas9, клетки НЕК-293, клеточные моноклоны

DOI: 10.31857/S0233475523010036, **EDN:** NSLVNI

ВВЕДЕНИЕ

Внутриклеточный Ca^{2+} вовлечен в регуляцию разнообразных клеточных функций, таких как экспрессия генов, подвижность, дифференцировка и пролиферация, апоптоз, синаптическая передача, мышечная сократимость [1]. В невозбудимых клетках генерация внутриклеточных Ca^{2+} -сигналов протекает за счет выброса Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо, локализованных преимущественно в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) [2, 3]. Гомеостаз Ca^{2+} в ЭР контролируется достаточно сложной системой транспортных и регуляторных белков, которая обеспечивает поддержание стационарного уровня депонированного Ca^{2+} в покое, контролируемый выброс Ca^{2+} в ответ на стимуляцию кле-

ток и эффективное пополнение Ca^{2+} -депо [4–6]. В этой системе IP_3 -рецептор, представляющий собой Ca^{2+} -канал ЭР, обеспечивает регулируемый выброс депонированного Ca^{2+} при стимуляции невозбудимых клеток [7, 8]. Ключевым в этом процессе является стимул-рецептор-G-белок-зависимая активация фосфолипазы C, которая катализирует продукцию вторичного медиатора IP_3 с последующей стимуляцией IP_3 -рецепторов. У позвоночных субъединицы IP_3 -рецепторов кодируют три гена: IP_3R1 , IP_3R2 и IP_3R3 . В разных клетках обычно функциональны 2–3 изоформы IP_3 -рецепторов, активность каждой из которых находится под контролем различных механизмов. Это определяет индивидуальные особенности

IP₃-зависимых Ca²⁺-сигналов и специфическую роль IP₃-рецепторов данного типа в физиологии различных клеток [1, 7, 8].

В клеточных исследованиях все в большей мере используется инструментарий редактирования генома для адресной модификации генов, кодирующих компоненты рецепторных систем, систем трансдукции сигналов и регуляторных путей [9]. В настоящее время используют несколько систем сайт-специфического узнавания и разрезания ДНК: цинковопальцевые нуклеазы (ZFN, Zinc-Finger Nuclease), TALE-ассоциированные нуклеазы (Transcription Activator-like Effector Nucleases, TALEN) и CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Shortpalindromic Repeats/CRISPR-associated protein) [10]. Все эти системы осуществляют направленный двухцепочечный разрыв в целевом участке ДНК. В настоящий момент наибольшее распространение получила технология CRISPR/Cas9 в силу универсальности и относительной простоты реализации: в ней ключевым является конструирование короткого (17–20 нуклеотидов) РНК-гида (sg-РНК), который будет направлять нуклеазу в место внесения разрыва в ДНК [11]. Нуклеаза Cas9 в комплексе с sg-РНК распознает последовательность PAM (Protospacer Adjacent Motif) и вносит разрыв в целевой локус, комплементарный sg-РНК, на расстоянии 3–4 нуклеотидов от PAM. В целом, при наличии последовательности PAM комплекс CRISPR/Cas9 можно направить на любую выбранную исследователем последовательность-мишень. После внесения двухцепочечных разрывов в ДНК клетка активирует эндогенную систему репарации разными путями — за счет гомологичной и негомологичной рекомбинации, что приводит к возникновению целевых мутаций, хотя нецелевые повреждения ДНК (off-target) также возможны. Нецелевые мутации возникают при посадке системы CRISPR/Cas9 на области генома, частично комплементарные sg-РНК, при наличии мотива PAM.

Клеточные линии, экспрессирующие IP₃-рецепторы только определенного типа, представляют собой эффективную модель для исследования регуляторных механизмов, фармакологии и физиологической роли изоформ этих лиганд-управляемых внутриклеточных Ca²⁺-каналов. В данной работе мы использовали систему CRISPR/Cas9 для редактирования генома клеток НЕК-293, которые экспрессируют все три гена IP₃-рецепторов [12]. В гены IP₃-рецепторов вносились мутации, которые приводили к смещению открытой рамки считывания, что приводило к трансляции дефектного рецепторного белка. Были выявлены моноклоны генетически модифицированных клеток НЕК-293, которые содержали биаллельные инактивирующие мутации в двух из трех генов IP₃-ре-

цепторов. В результате были получены стабильные клеточные линии с единственной функциональной изоформой IP₃-рецептора, т.е. либо IP₃R1, либо IP₃R2, либо IP₃R3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Редактирование генов IP₃-рецепторов

1.1. Конструкция pGuide-it-tdTomato Vector/IP3R3 для направленного редактирования гена IP3R3 (эндонуклеазная система)

Поиск оптимального расположения протоспейсера и мотива PAM проводили на смысловой и антисмысловой цепях ДНК гена IP3R3 на последовательности мРНК IP3R3 (GenBank NM_002224.4). При дизайне sg-РНК учитывались данные по влиянию протяженности и нуклеотидного состава sg-РНК на эффективность и специфичность редактирования [13]. Для редактирования был выбран участок с контекстом 5'-ATGTCCAGCTTTCTTCACAT, расположенный в первом экзоне гена справа от иницирующего кодона. Для внесения редактирующего комплекса в клетки использован вектор pGuide-it-tdTomato Vector, содержащий ген *cas9* и позволяющий экспрессировать требуемую sg-РНК под контролем промотора U6. Для синтеза спейсерной последовательности были получены два взаимно-комплементарных олигонуклеотида 5'-ccggATGTCCAGCTTTCTTCACAT-3' и 5'-aaacATGTGAAGAAAGCTGGACAT-3'. Все олигонуклеотиды содержали на 5'-концах адаптерные последовательности для клонирования в вектор (подчеркнуты). Каждый олигонуклеотид (50 пмоль/мкл) фосфорилировали по 5'-концам при помощи T4-полинуклеотидкиназы Anza™ T4 PNK kit (Invitrogen) в соответствии с рекомендацией производителя. Реакцию отжига фосфорилированных олигонуклеотидов проводили в буфере Annealing Buffer из набора Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara) путем нагревания до 94°C и постепенного охлаждения в течение 40 мин. Олигонуклеотидный дуплекс с концентрацией 100 фмоль/мкл клонировали в линейаризованную плазмиду pGuide-it-tdTomato Vector по липким концам адаптерных последовательностей с использованием набора для быстрого лигирования Guide-it CRISPR/Cas9 System (Takara). Компетентные клетки Stellar Competent Cells (Takara) трансформировали лигазной смесью, полученные плазмиды (pGuide-it-tdTomato/IP3R3) тестировали на наличие вставки при помощи набора для ПЦР (ScreenMix-HS (UDG), Евроген) с праймерами 5'-ccggATGTCCAGCTTTCTTCACAT-3' и 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCC-3' (коммерческий праймер к плазмиде). Наличие вставки спейсера и правильность полученной конструкции подтверждали секвенированием (Евроген).

1.2. Конструкция pGuide-it-tdTomato Vector/IP3R2 для направленного редактирования гена IP3R2 (эндонуклеазная система)

В последовательности мРНК гена *IP3R2* (база данных GenBank NM_002223.4) для редактирования был выбран потенциальный протоспейсер, содержащий с 3'-конца мотив РАМ — CGG. Для конструирования вставки, кодирующей sg-РНК, синтезированы взаимно-комплементарные олигонуклеотиды 5'-ccggGGACATCGTGTCCCTGTACG-3' и 5'-aaacCGTACAGGGACACGATGTCC-3', содержащие на 5'-концах адаптерные последовательности для клонирования в плазмидный вектор (подчеркнуты). Фосфорилирование олигонуклеотидов, формирование дуплекса и клонирование в вектор pGuide-it-tdTomato Vector проводили аналогично тому, как описано для плазмиды pGuide-it-tdTomato Vector/IP3R3. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки Stellar Competent Cells (Takara), полученные плазмиды тестировали на наличие вставки при помощи набора для ПЦР с колоний (ScreenMix-HS (UDG), Евроген) с праймерами 5'-ccggGGACATCGTGTCCCTGTACG-3' и 5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCC-3'. Для подтверждения правильности полученной конструкции (pGuide-it-tdTomato/IP3R2) плазмиды секвенировали (Евроген).

1.3. Конструкция AIO-GFP/IP3R1 для направленного редактирования IP3R1 (никазная система)

Редактирование гена *IP3R1* осуществляли при помощи вектора AIO-GFP, обеспечивающего экспрессию Cas9-D10A никазы, слитой с EGFP и двух sg-РНК [14]. Вектор AIO-GFP был предоставлен Steve Jackson (Addgene plasmid # 74119; <http://n2t.net/addgene:74119>). Поиск мишени для редактирования на смысловой и антисмысловой нитях ДНК проводили по последовательностям NM_001099952.4; NM_001168272.2; NM_001378452.1; NM_002222.7 (GenBank), соответствующим всем четырем вариантам транскриптов гена. Для редактирования были выбраны участки в составе третьего экзона, идентичные для всех вариантов транскриптов: 1) на расстоянии 68 пар нуклеотидов (п.н.) справа от иницирующего кодона (пара взаимно-комплементарных олигонуклеотидов: 5'-accgAAATGGATTTATTAGCACCT-3' и 5'-aaacAGGTGCTAATAAATCCATTT-3', “смысловый дуплекс”) и 2) на расстоянии 25 п.н. справа от иницирующего кодона (пара взаимно-комплементарных олигонуклеотидов 5'-accgAACAAATGTCTCCAATATGT-3' и 5'-aaacACATATTGGAGACATTTGTT-3' “антисмысловой дуплекс”). Все синтезированные олигонуклеотиды содержат адаптерные последовательности для последующего клонирования в

вектор (подчеркнуты). Олигонуклеотиды были фосфорилированы на 5'-концах, как описано выше, и проведена реакция отжига для формирования дуплексов перед клонированием в линейаризованную плазмиду AIO-GFP. В вектор последовательно встраивали сначала антисмысловой дуплекс фосфорилированных олигонуклеотидов по сайту BbsI (Thermo Scientific), затем смысловой дуплекс по сайту BsaI (Eco31I) (Thermo Scientific). При встраивании “антисмыслового” дуплекса результат лигирования контролировали при помощи ПЦР с колоний (ScreenMix-HS (UDG), Евроген) с праймерами 5'-accgAACAAATGTCTCCAATATGT-3' и 5'-CTTGATGTACTGCCAAGTGGGC-3' после трансформации вектором клеток Stellar Competent Cells (Takara). При лигировании “смыслового” дуплекса по сайту BsaI плазмидную ДНК вектора со вставкой “антисмыслового” дуплекса обрабатывали рестриктазой, дефосфорилировали при помощи щелочной фосфатазы Fast-AP (Thermo Scientific) и проводили вторую реакцию лигирования. Колонии после трансформации проверяли при помощи ПЦР с колоний с праймерами 5'-accgAAATGGATTTATTAGCACCT-3' и 5'-CTTGATGTACTGCCAAGTGGGC-3'. Наличие вставок, соответствующих последовательностям sg-РНК в векторе AIO-GFP/IP3R1, подтверждали секвенированием (Евроген).

2. Получение моноклонов НЕК-293

Трансфекцию клеток НЕК-293 проводили с использованием набора реагентов Lipofectamin 3000 (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Через 72 ч после трансфекции клетки анализировались по интенсивности флуоресценции с помощью сортера клеток FACS Aria SORP (BD Biosciences). Для получения моноклонов отбирали клетки, обладающие наибольшей интенсивностью флуоресценции, переносили их по одной в лунку 96-луночного планшета и по достижении 50–70% конфлюэнтности клеточные клоны переносили в лунки с большей ростовой поверхностью (последовательно в 24-, 12- и 6-луночные планшеты). После достижения монослоя в лунке 6-луночного планшета клетки использовались для генетического анализа. Клеточные моноклоны с выявленными биаллельными мутациями целевого гена культивировали в среде DMEM (Gibco) с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10–15% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл гентамицина (Sigma), 4 мМ глутамин (Sigma) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в воздухе при 37°C.

3. Идентификация клеточных моноклонов с биаллельными мутациями целевых генов

Для обнаружения моноклонов с биаллельными мутациями сначала выявляли клоны с мутациями в модели *in vitro* с коммерческим ферментом Cas9 и синтезированными sg-РНК, а затем секвенировали по Сэнгеру область редактирования выбранных клонов. Из суспензии клеток каждого из полученных моноклонов HEK293 выделяли геномную ДНК набором реактивов Quick-gDNA MiniPrep, (ZymoResearch) и амплифицировали фрагмент гена (размером от 700 до 900 п.н.) с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion Hot Start II (F549; Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Для этого использовали следующие праймеры: 5'-GGGATTTCATGTGTGGTG-3' и 5'-CTACTGAAGCTGGGAACAACAGG-3' для *IP3R3* (ожидаемый размер ампликона 962 п.н.); 5'-CTGTCCAAAAATCCCTGAG-3' и 5'-AAGCCAGCGAAGACCTCTTC-3' для *IP3R2* (ожидаемый размер ампликона 848 п.н.); и 5'-CATTCCTGAAGCAAATTGAATATG-3' и 5'-AGTGGAATAAAGGCACTCTC-3' для *IP3R1* (ожидаемый размер ампликона 769 п.н.). Амплифицированный участок геномной ДНК, содержащий предполагаемую мутацию, подвергался анализу в модели *in vitro* комплексом sg-РНК/Cas9.

sg-РНК для трех генов рецептора получали методом транскрипции *in vitro*, используя набор реактивов Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit (Takara), содержащего РНК-полимеразу фага T7. Для синтеза ДНК-матрицы, содержащей последовательность промотора T7, спейсерные последовательности редактируемых генов и scaffold-матрицу, включающую транс-активирующую РНК, были сконструированы смысловые (прямые) олигонуклеотиды: CCTCTAATACGACTCAC-TATAGGATGTCCAGCTTCTTCACATGTTTA-AGAGCTATGC для *IP3R3*, CCTCTAATACGACTCACTATAGGACATCGTGTCCCTGTACGGTTTA-AGAGCTATGC для *IP3R2*, CCTCTAATACGACTCACTATAGGAAATGGATTATTAGCACCTGTTTA-AGAGCTATGC для *IP3R1* (последовательности, соответствующие sg-РНК в составе олигонуклеотидов подчеркнуты). Антисмысловой (обратный) праймер входил в состав реакционной смеси использованного коммерческого набора. Полученные с помощью ПЦР ДНК-матрицы использовали для синтеза (транскрипции) sg-РНК *in vitro*, очищали продукты с использованием набора реагентов (Guide-it IVT RNA Clean-Up Kit, Takara).

Реакцию гидролиза фрагментов амплифицированной геномной ДНК проводили комплексом Cas9/sgRNA *in vitro* согласно протоколу производителя (Guide-it™ Genotype Confirmation Kit, Takara). По характеру гидролиза отбирали монокло-

ны, в которых редактируемый участок не содержит мишеней для Cas9 в комплексе с sg-РНК и, следовательно, несет мутации, затрагивающие область, комплементарную sg-РНК. Для проверки точной локализации мутаций для каждого моноклона была приготовлена клонотека ПЦР-фрагментов редактируемого участка, содержащих продукты амплификации, соответствующие обоим аллелям. Очищенные ПЦР-фрагменты моноклонов с выявленными *in vitro* биаллельными мутациями клонировали в вектор pJET1.2/blunt по тупым концам с использованием набора CloneGet PCR Cloning Kit (Thermo Scientific), лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1-blue (Евроген), колонии тестировали на присутствие вставки ПЦР с праймерами pjet F/R (ScreenMix-HS (UDG), Евроген). Продукты ПЦР очищали при помощи набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Для выявления indel-мутаций продукты ПЦР не менее чем 10 индивидуальных клонов для каждой клонотеки были секвенированы по Сэнгеру в компании Евроген с праймерами pjet F/R (5'-CGACTCAC-TATAGGGAGAGCGGC-3', 5'-AAGAACATC-GATTTTCCATGGCAG-3').

4. Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+}

Для фотометрического эксперимента клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (мМ): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы. Для загрузки флуоресцентным Ca^{2+} -зондом Fluo-4 клетки инкубировали в присутствии проникающего предшественника Fluo-4 AM (4 мкМ) и детергента Pluronic (0.02%) (оба Molecular Probes) при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем при комнатной температуре в течение 1 ч.

Фотометрические эксперименты проводили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). В соответствии со спектральными характеристиками Fluo-4 флуоресценцию клеток возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 — интенсивность эмиссии Ca^{2+} -индикатора в текущий момент времени и в начале регистрации, соответ-

ственно. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS Elements (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 12.5 (Systat Software Inc).

Вещества, использовавшиеся в физиологических экспериментах, приобретались в Sigma-Aldrich (соли, буферы, глюкоза) и Tocris Bioscience (ацетилхолин, ACh).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ряд факторов затрудняет анализ регуляторных механизмов индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов и их специфической роли в физиологии клетки. Во-первых, в клетках обычно экспрессированы два или даже все три гена, кодирующие IP_3 -рецепторы. Кроме того, разные изоформы IP_3 -рецепторов находятся под контролем различных механизмов. Ингибиторный анализ не позволяет выявить индивидуальный вклад IP_3R1 , IP_3R2 или IP_3R3 изоформ в генерацию клеточного ответа, поскольку на данный момент изоформ-специфичные антагонисты IP_3 -рецепторов не идентифицированы. Поэтому целью данной работы было получение клеточных линий, экспрессирующих лишь один ген IP_3 -рецептора, с целью дальнейшего использования этих клеточных моделей для анализа роли различных изоформ IP_3 -рецептора в сигнальных процессах. Клетки НЕК-293 традиционно используются как модельная система для физиологических тестов и гетерологической экспрессии рекомбинантных белков, включая ионные каналы и рецепторные, сигнальные и регуляторные белки. Учитывая это обстоятельство, а также то, что эти клетки экспрессируют все три гена IP_3 рецепторов, именно эта клеточная система была выбрана для геномного редактирования и получения клеточных линий с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора.

Технология CRISPR/Cas9 — удобный и надежный инструмент для направленного мутагенеза ДНК в различных объектах [9, 11]. Суть технологии заключается в способности рибопротеинового комплекса нуклеазы Cas9 с sg-РНК узнавать целевую последовательность в геноме и вносить двунитевые разрывы, которые затем репарируются с внесением делеций и инсерций. Направленный характер мутаций определяется последовательностью sg-РНК, комплементарной редактируемому локусу и наличием мотива РАМ, обеспечивающего пространственную ориентацию фермента, оптимальную для гидролиза ДНК-мишени. Широкое применение метода связано с возможностью доставки в клетку системы, продуцирующей и

Cas9, и sg-РНК с заданной последовательностью в составе одного вектора. Однако в каждом случае, в зависимости от локализации на хромосоме, структурного состояния ДНК, особенностей нуклеотидных последовательностей в области редактирования, результаты направленного мутагенеза остаются плохо предсказуемыми. Поэтому помимо важности для клеточных исследований, получение двойных биаллельных мутаций IP_3 -рецепторов в клетках млекопитающих представлял интерес для отработки стратегии выбора мишеней и оптимального пути верификации результатов.

Получение линии клеток НЕК293/ $\Delta IP3R2$ / $\Delta IP3R1$

Получение клеточных линий с двойным нокаутом IP_3 -рецепторов подробно рассматривается на примере линии НЕК293/ $\Delta IP3R2$ / $\Delta IP3R1$, в клетках которой были инактивированы гены $IP3R2$ и $IP3R1$. Аналогично были получены линии НЕК293/ $\Delta IP3R3$ / $\Delta IP3R2$ и НЕК293/ $\Delta IP3R1$ / $\Delta IP3R3$, в клетках которых функциональными оставались лишь $IP3R1$ и $IP3R2$, соответственно. В целом получение стабильной клеточной линии в каждом случае было проведено по схеме, представленной на рис. 1.

Инактивация двух из трех генов IP_3 -рецепторов проводилась последовательно. В рассматриваемом случае на первом этапе был получен клеточный моноклон НЕК293/ $\Delta IP3R2$ с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания $IP3R2$ человека, затем в клетках этой линии с использованием системы CRISPR/Cas9-D10A был инактивирован ген $IP3R1$. Для редактирования $IP3R2$ был использован вектор pGuide-it-td Tomato (Takara), обеспечивающий синтез sg-РНК для $IP3R2$ и нуклеазы Cas9. Красный флуоресцентный белок tdTomato, который экспрессировался независимо, являлся индикатором успешной трансфекции и обеспечивал эффективный первичный отбор клонов для последующего анализа мутаций. Участок для редактирования был выбран вблизи АТГ-кодона $IP3R2$ в последовательности первого экзона.

После подтверждения интеграции олигонуклеотидного дуплекса, кодирующего sg-РНК, полученной плазмидой трансфицировали клетки НЕК-293. Моноклоны анализировали на наличие мутаций в два этапа: 1) тестированием *in vitro* доступности редактируемого участка для гидролиза Cas9 в комплексе с соответствующей sg-РНК и 2) секвенированием редактируемой области в клонотеках, полученных для ПЦР-продуктов гена-мишени.

Первый этап, RGEN-RFLP, (RNA-guided engineered nucleases) существенно сужает круг моно-

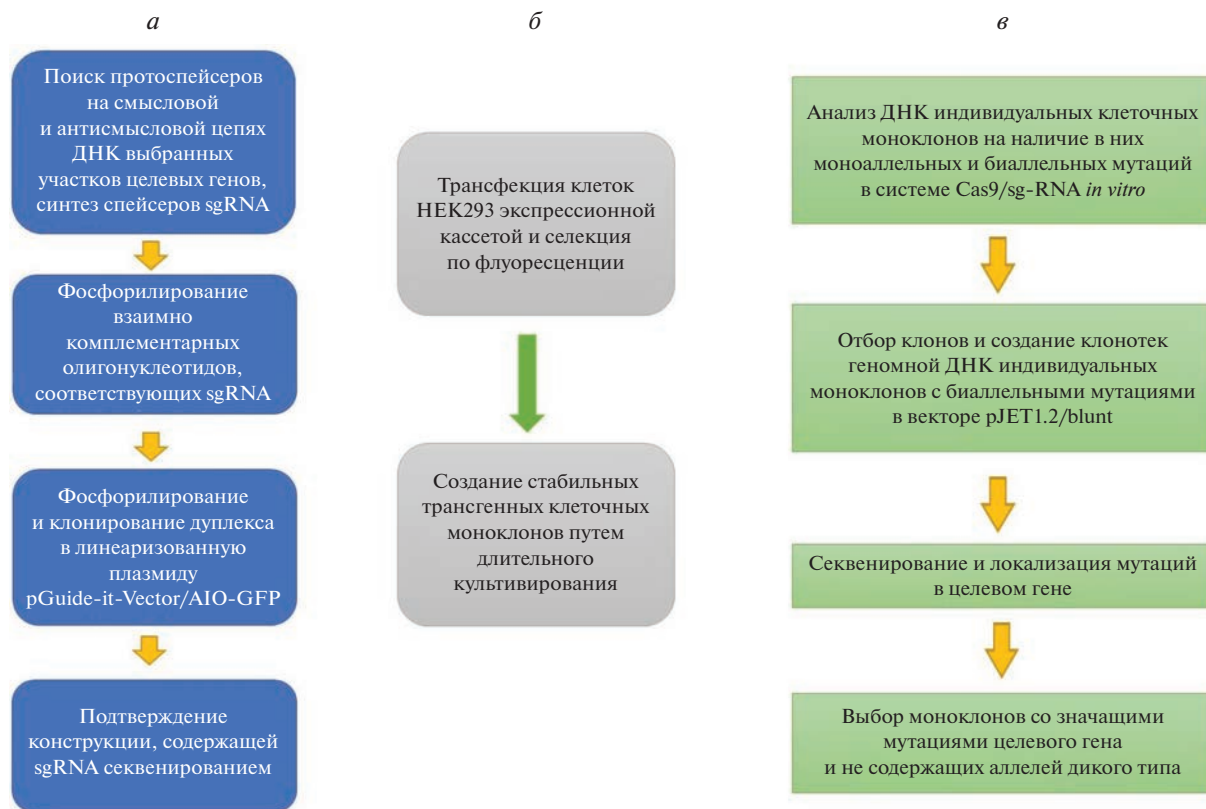


Рис. 1. Основные этапы получения и верификации биаллельных мутаций, приводящих к инактивации целевого гена. *а* – Создание генетических конструкций; *б* – получение и идентификация клеточных моноклонов; *в* – анализ характера и локализации мутаций.

клонов, для которых целесообразно приготовление клонотек и последующая процедура секвенирования [15]. Этот метод гораздо более точно отражает число событий редактирования, чем другие методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas9 при геномном редактировании [16]. Суть метода заключается в том, что аналогично процессу, произошедшему в клетках, в условиях *in vitro* проводится внесение разрыва комплексом Cas9/sg-RNA на амплифицированном фрагменте гена (рис. 2). Праймеры для амплификации участка гена подбираются таким образом, чтобы место предполагаемой мутации было ассиметрично, и продукты гидролиза эффективно разделялись в агарозном геле. Во фрагментах ДНК дикого типа визуализируется два продукта неравной длины, поскольку комплекс Cas9/sg-RNA узнает как PAM, так и последовательность протоспейсера и вносит двунитевой разрыв. Три продукта на электрофореграмме свидетельствуют о наличии моноаллельной мутации в целевом участке: одна аллель была отредактирована и не подвергалась гидролизу (один непорезанный продукт), участок на второй неизменной аллели был доступен для гидролиза (два продукта). Отсутствие гидролиза указывает на

наличие в ДНК биаллельной мутации, приводящей к изменению последовательности, узнаваемой комплексом Cas9/sg-RNA (рис. 2).

Для линии HEK293/DIP3R2 моноаллельные мутации выявляются на дорожках под номерами 1, 2, 4, 6 и 7; дикий тип – 3; биаллельные мутации – 5, 8 и 9 (рис. 3а). Клон, соответствующий паттерну разрезания, приведенному на дорожке 5, был выбран для получения клонотеки ПЦР-продуктов и последующего секвенирования.

В моноклоне с генотипом HEK293/DIP3R2 было проведено редактирование гена *IP3R1*. Для минимизации off-target эффектов была использована система Cas9-D10A с низкой активностью в составе вектора AIO-GFP [14]. Действие фермента Cas9-D10A, приводящее к двунитевому разрыву ДНК, обеспечивается кооперацией двух направляющих sg-PHK, что повышает точность взаимодействия редактирующего комплекса с мишенью [17]. Протоспейсеры для CRISPR/Cas9-10A, содержащие на 3'-конце смысловой цепи мотив PAM – TGG и на 3'-конце антисмысловой цепи мотив PAM – CCT, были выбраны в третьем экзоне гена *IP3R1* справа от ATG-кодона (табл. 1). Вектор на основе AIO-GFP, обеспечивающий

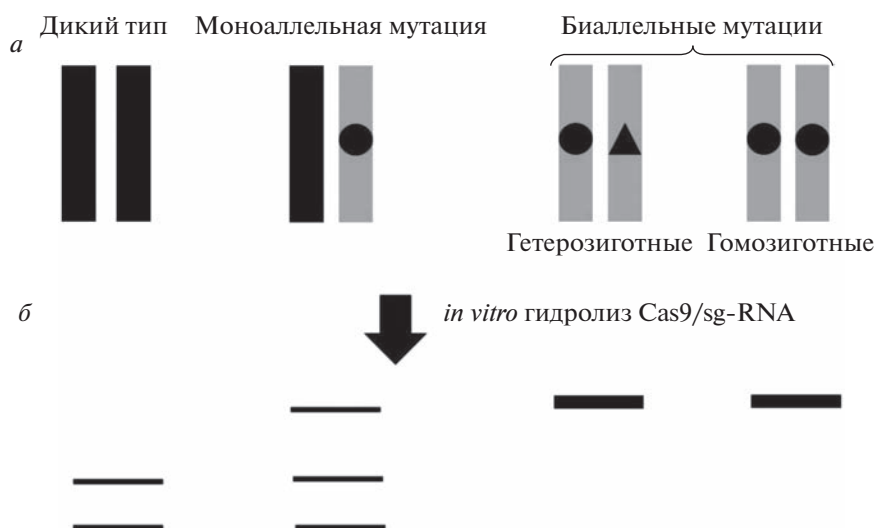


Рис. 2. Варианты гидролиза амплифицированных фрагментов ДНК моноклонов после обработки *in vitro* комплексом Cas9/sg-RNA. *a* – Типы аллельных мутаций; *б* – ожидаемые продукты расщепления, соответствующие типу мутаций. Представлены три различные картины рестрикции, получаемые на электрофореграмме. Если мутации присутствуют в аллели, то стандартный Cas9-sgRNA комплекс не сможет расщепить ПЦР-фрагмент, содержащий редактируемую область, тогда как аллели дикого типа будут опознаны и порезаны.

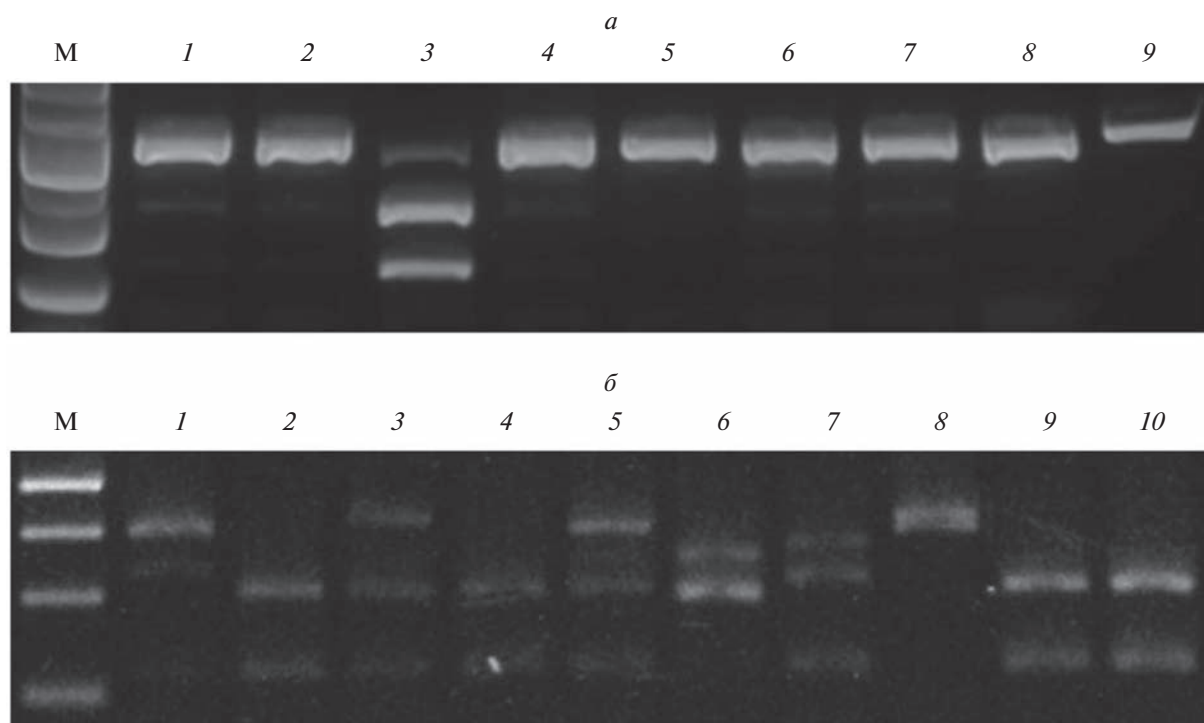


Рис. 3. Примеры гидролиза ПЦР-фрагментов, содержащих редактируемый участок ДНК, *in vitro* комплексом Cas9/sg-RNA. ДНК-маркер (M) – 1 kb Plus Ladder (Ферментас). *a* – Гидролиз фрагментов геномной ДНК для *IP3R2*, амплифицированных из индивидуальных моноклонов (дорожки 1–9). *б* – гидролиз фрагментов геномной ДНК для *IP3R1*, амплифицированных из индивидуальных моноклонов (дорожки 1–10).

экспрессию “смыслового” и “антисмыслового” протоспейсеров использовали для трансфекции линии клеток НЕК293/ Δ IP3R2. Тестирование *in vitro* (рис. 3б) указывает на наличие биаллельной мутации в одном клоне (дорожка 8). Моноал-

лельным мутациям соответствуют дорожки 1, 3, 5, 6, 7; дикому типу – 2, 4, 9, 10. После секвенирования клонотеки с фрагментом гена *IP3R1* для выбранного клона установлено, что одна аллель имеет делецию 38 пар нуклеотидов, приводящую

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность участков целевого гена после редактирования клеточных линий НЕК293/ Δ IP3R3/ Δ IP3R2, НЕК293/ Δ IP3R1/ Δ IP3R3, НЕК293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R1

Клеточная линия	Целевой ген	Мутации	Геномные мутации
НЕК293/ Δ IP3R3/ Δ IP3R2	<i>IP3R3</i>	WT	ATGAGTGAATATGCCAGCTTTCTTCACATCGGCGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		-50	ATGAGTGAATATGCCAGCTTTCTTCACATCGGCGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		-2	ATGAGTGAATATGCCAGCTTTCTTCACATCGGCGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
	<i>IP3R2</i>	WT	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		-8	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		+1	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
НЕК293/ Δ IP3R1/ Δ IP3R3	<i>IP3R1</i>	WT	ATGCTGACAAAATGCTAGCTTCCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCCGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTTGG
		+7	ATGCTGACAAAATGCTAGCTTCCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCCGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTTGG
	<i>IP3R3</i>	WT	ATGAGTGAATATGCCAGCTTTCTTCACATCGGCGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		-2	ATGAGTGAATATGCCAGCTTTCTTCACATCGGCGACATCGTCTCCCTGTACGCCGAGGGCTCCGTCATGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
НЕК293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R1	<i>IP3R2</i>	WT	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		-10	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
		+1	ATGACTGAGAAAATGTCAGCTTCTCTACATAGGGACATCGTGTCCCTGTACGCGAGGGCTCGGTCAACGGCTTCATCAGCACCTTTGGG
	<i>IP3R1</i>	WT	ATGCTGACAAAATGCTAGCTTCCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCCGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTTGG
		-38	ATGCTGACAAAATGCTAGCTTCCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCCGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTTGG
		-238	ATGCTGACAAAATGCTAGCTTCCATACATATTGGAGACATTTGTTCTCTGTACGCCGAGGGATCGACAAATGGATTATTAGCACCTTTGG

Примечание. Инсерции выделены красным жирным шрифтом; последовательность РАМ — жирным курсивом и голубым; последовательность sg-РНК — желтым цветом. Последовательность генов представлена начиная с иницирующего кодона.

к смещению открытой рамки считывания и появлению стоп-кодона после 14-й аминокислоты, во второй аллели обнаружена делеция 238 пар нуклеотидов, приводящая к смещению открытой рамки считывания и появлению стоп-кодона после 70-й аминокислоты (табл. 1). При получении двойных мутаций НЕК-293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R1 инвариантность мутаций, внесенных на первом этапе при редактировании гена *IP3R2*, вновь подтверждали секвенированием клонотек для ПЦР-продуктов *IP3R2*. Этот шаг служил для проверки стабильности клеточной линии с одним мутированным геном при последующих редактировании и культивировании. Результаты секвенирования подтверждали устойчивость первоначальной indel-мутации и демонстрировали, что в течение нескольких пассажей не происходит реверсии внесенных изменений.

Таким образом, с помощью технологии CRISPR/Cas9 получена стабильная линия клеток НЕК293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R1 с биаллельными мутациями генов *IP3R2* и *IP3R1*, приводящими к их инактивации, при сохранении функционального гена *IP3R3*.

Получение линии клеток НЕК293/ Δ IP3R3/ Δ IP3R2

В данном случае первоначально инактивировался ген *IP3R3* с использованием вектора pGuide-it-tdTomato Vector/IP3R3. Участок геномной ДНК, выбранный для редактирования, представляет собой GC-богатую последовательность, что затрудняло амплификацию. Для оптимизации амплификации участка отредактированного гена применяли полимеразу Qiagen Taq Hot Start

DNA polymerase, буфер с добавлением Q-solution и подбирали оптимальный температурный режим. После двухэтапного тестирования был отобран моноклон с биаллельными мутациями, приводящими к смещению открытой рамки считывания гена *IP3R3* (табл. 1). На одной аллели обнаружена делеция 50 п.н., приводящая к образованию укороченного белка — 16 аминокислот. В другой аллели имеется делеция 2 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 9-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 32-й аминокислоты.

В полученной линии НЕК293/ Δ IP3R3 с использованием вектора pGuide-it-tdTomato Vector/IP3R2 затем инактивировался ген *IP3R2*. Инактивирующие мутации включали делецию 8 п.н., приводящую к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты, и появление стоп-кодона после 31-й аминокислоты, а также инсерцию 1 п.н., приводящую к смещению открытой рамки считывания после 17-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 34-й аминокислоты (табл. 1). В полученной линии (НЕК293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R3) интактным остается ген *IP3R1*.

Появление одной и той же мутации (инсерция 1 п.н. в гене *IP3R2*) при независимых манипуляциях (получение линий НЕК293/ Δ IP3R2/ Δ IP3R1 и НЕК293/ Δ IP3R3/ Δ IP3R2) с редактируемым участком с использованием одного и того же инструмента не является неожиданным эффектом. Характер мутации зависит от особенности используемой ферментативной системы, и для Cas9 описана высокая частота как делеций > 3 п.н. (58%), так и инсерционных замен 1 п.н. (13%), в то время как протяженные инсерции встречаются гораздо реже (около 1%) [18, 19].

Получение линии клеток НЕК293/ Δ IP3R1/ Δ IP3R3

При получении данной клеточной линии сначала нокаутировали ген *IP3R1* с помощью плазмиды AIO-GFP/*IP3R1*, а затем редактировали ген *IP3R3* с использованием вектора pGuide-it-tdTomato/*IP3R3*. После первого этапа редактирования был отобран моноклон, имеющий только один вариант мутации (гомозигота) по гену *IP3R1*, который воспроизводимо идентифицируется в нескольких секвенированных клонотеках: инсерция 7 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 28-й аминокислоты и появлению стоп-кодона (табл. 1).

Эту клеточную линию (НЕК293/ Δ IP3R1) использовали на втором этапе последовательного редактирования с использованием плазмиды pGuide-it-tdTomato/*IP3R3*. В полученном моноклоне выявлена гомозиготная мутация — делеция 2 п.н., приводящая к смещению открытой рамки считывания после 9-й аминокислоты и появлению стоп-кодона после 32-й аминокислоты (табл. 1). Таким образом, полученная клеточная линия НЕК293/ Δ IP3R1/ Δ IP3R3 имеет по обоим генам биаллельные идентичные мутации, инактивирующие трансляцию обоих белков.

Полученные клеточные линии были протестированы на устойчивость направленных мутаций через 1 год хранения при -80°C . Для каждого генамишени были приготовлены и секвенированы клонотеки ПЦР-фрагментов отредактированных областей. Во всех случаях было подтверждено наличие полученных ранее инактивирующих мутаций и отсутствие дополнительных нуклеотидных замен.

ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные медиаторы, вовлеченные в паракринные и аутокринные регуляции, модулируют клеточные функции, взаимодействуя с поверхностными рецепторами и стимулируя сопряженные с ними внутриклеточные сигнальные каскады. Трансдукция многих агонистов, рецепторы которых сопряжены с фосфоинозитидным каскадом, сопровождается мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} [3, 7, 20]. Ключевым событием в трансдукции Ca^{2+} -мобилизующих агонистов является стимуляция фосфолипазы C (PLC), которая гидролизует липидный субстрат фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат и продуцирует два вторичных медиатора, IP_3 и диацилглицерин. Первичная роль IP_3 состоит в активации IP_3 -рецепторов и высвобождении Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо [3, 7]. Помимо связывания коагонистов IP_3 и Ca^{2+} , активность IP_3 -рецепторов модулируется рядом механизмов, включая фосфорилирование несколькими киназами и взаимодействие со специализированными белками [21]. Это

обстоятельство, а также то, что в клетках обычно функционируют несколько изоформ IP_3 -рецепторов [8], затрудняют анализ их регуляции и физиологической роли в нативных клетках. Существенно более однозначную интерпретацию результатов могут обеспечить клеточные модели с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецепторов.

Первая такая модель была разработана на основе клеток DT40, полученных из лимфомы цыпленка, в которых были инактивированы собственные гены IP_3 -рецепторов (DT40-ТКО клетки) [22]. Гетерологическая экспрессия индивидуальных изоформ IP_3 -рецепторов млекопитающих в клетках DT40-ТКО позволила выявить многие особенности функционирования этих IP_3 -активируемых Ca^{2+} -каналов. В частности, было показано, что обмен Ca^{2+} между ЭР и митохондриями через IP_3 -рецепторы необходим для поддержания биоэнергетики клетки [23]. Ряд фактов свидетельствовал о том, что, хотя все изоформы IP_3 -рецепторов могут участвовать в формировании контакта между ЭР и митохондриями, $\text{IP}_3\text{R2}$ обеспечивает наиболее эффективный перенос Ca^{2+} в митохондрии [24]. Используя пермеабелизованные клетки DT40-ТКО, экспрессирующие индивидуальные изоформы IP_3 -рецепторов, были получены кривые доза—ответ, характеризующие выброс Ca^{2+} , который индуцировался IP_3 и его синтетическими аналогами [25]. Фактически это было первое исследование связи структуры лиганда с активностью IP_3 -рецепторов. Анализ Ca^{2+} -сигналов в клетках DT40-ТКО с рекомбинантными IP_3 -рецепторами млекопитающих позволил прийти к заключению, что IP_3 -индуцированный выброс Ca^{2+} достаточно эффективен только, если каждая субъединица тетрамерного IP_3 -рецептора связана с IP_3 [26].

Клетки различных линий в культуре представляют собой традиционный объект для исследований рецепторных систем и сигнальных процессов. По сравнению с нативными клетками, выделенными из диссоциированных биологических тканей, культивируемые клетки более стабильны, и их можно эффективно модифицировать за счет гетерологической экспрессии целевых белков или редактирования целевых генов. Клетки линии НЕК-293 часто используются для клеточных исследований, поскольку они экспрессируют широкий набор сигнальных и регуляторных белков, достаточно стабильны при различных условиях культивирования, быстро достигают требуемой плотности (время удвоения культуры 36 ч). Кроме того, клетки НЕК-293 с высокой эффективностью могут быть трансфицированы разными методами (химическая и электрическая трансфекция) с использованием плазмидных и вирусных

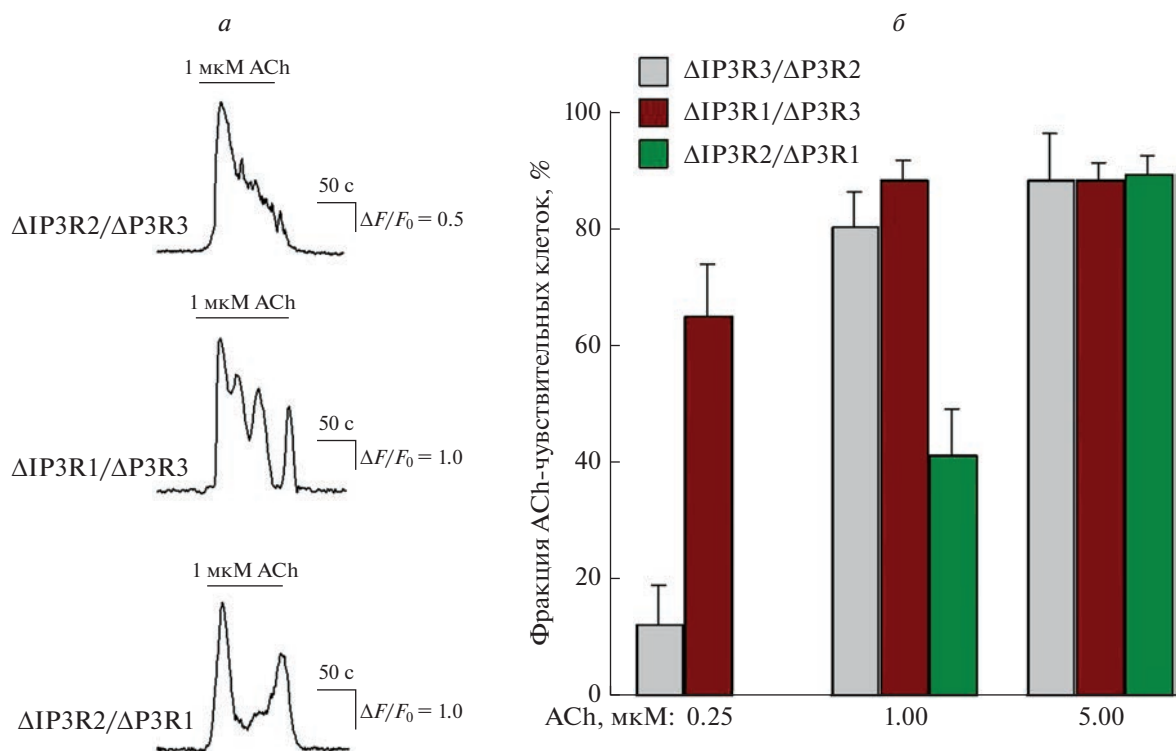


Рис. 4. Ca^{2+} -ответы клеток на ACh. *a* — Репрезентативный мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в клетках HEK293/ $\Delta\text{IP3R2}/\Delta\text{IP3R1}$ ($n = 62$), HEK293/ $\Delta\text{IP3R1}/\Delta\text{IP3R3}$ ($n = 51$) и HEK293/ $\Delta\text{IP3R3}/\Delta\text{IP3R2}$ HEK-293WT ($n = 58$), загруженных Fluo-4. Моменты и продолжительность аппликаций ACh (1 мкМ) обозначены горизонтальными линиями выше экспериментальных кривых. Изменение внутриклеточного Ca^{2+} оценивали по относительному изменению флуоресценции Fluo-4 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F — текущая интенсивность флуоресценции, F_0 — средняя интенсивность флуоресценции в начальный момент регистрации. *б* — Фракция клеток для каждой из линий, генерирующих Ca^{2+} -ответы на ACh при концентрациях 0.25, 1 и 5 мкМ.

векторов и обеспечивают точную трансляцию рекомбинантных белков и достаточную продуктивность их синтеза. Совокупность этих характеристик делает клетки линии HEK-293 хорошей тест-системой для экспериментов, сочетающих функциональные физиологические тесты и гетерологичную экспрессию белков, вовлеченных в сигнальные процессы [27].

В данной работе мы использовали клетки HEK-293, CRISPR/Cas9 технологию и методы клеточной селекции для генерации моноклональных клеточных линий с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора. Были получены стабильные клеточные моноклоны HEK293/ $\Delta\text{IP3R2}/\Delta\text{IP3R1}$, HEK293/ $\Delta\text{IP3R1}/\Delta\text{IP3R3}$, HEK293/ $\Delta\text{IP3R3}/\Delta\text{IP3R2}$ с биаллельными мутациями, приводящими к сдвигу открытой рамки считывания, с использованием одного sg-РНК для генов IP3R3 и IP3R2 , двух sg-РНК для нуклеотидной системы редактирования гена IP3R1 . Описан простой и удобный способ выявления полученных мутаций в модели *in vitro* при гидролизе участков геномной ДНК моноклонов комплексом Cas9-sgRNA, с подтверждением целевых мутаций секвенированием.

Физиологические тесты показали, что клетки в этих линиях способны отвечать на агонисты мобилизацией Ca^{2+} . В случае ACh этот агонист мобилизовал Ca^{2+} примерно в 90% популяции клеток каждой из полученных линий (рис. 4). Это свидетельствует о том, что фосфоинозитидный каскад с единственной функциональной изоформой IP_3 -рецептора способен обеспечить сопряжение клеточных рецепторов с мобилизацией Ca^{2+} . В дальнейшем полученные нами клеточные линии могут быть использованы для исследования роли индивидуальных изоформ IP_3 -рецептора во внутриклеточной Ca^{2+} -сигнализации.

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток (поддерживаются Программой развития МГУ). Авторы признательны И.С. Масулис и Ю.А. Ковалицкой за плодотворную дискуссию и сделанные замечания.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00031.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foskett J.K., White C., Cheung K.-H., Mak D.O. 2007. Inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} release channels. *Physiol. Rev.* **87**, 593–658.
2. Berridge M.J., Bootman M.D., Roderick H.L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 517–529.
3. Clapham D.E. Calcium signaling. 2007. *Cell* **131**, 1047–1058.
4. Zampese E., Pizzo P. 2012. Intracellular organelles in the saga of Ca^{2+} homeostasis: different molecules for different purposes? *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1077–1104.
5. Takeshima H., Venturi E., Sitsapesan R. New and notable ion-channels in the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum: Do they support the process of intracellular Ca^{2+} release? 2015. *J. Physiol.* **593**, 3241–3251.
6. Carreras-Sureda A., Pihán P., Hetz C. 2018. Calcium signaling at the endoplasmic reticulum: Fine-tuning stress responses. *Cell Calcium* **70**, 24–31.
7. Berridge M.J. 2016. The inositol trisphosphate/calcium signaling pathway in health and disease. *Physiol. Rev.* **96**, 1261–1296.
8. Hamada K., Mikoshiba K. 2020. IP_3 receptor plasticity underlying diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **82**, 151–176.
9. Milligan G., Inoue A. 2018. Genome editing provides new insights into receptor-controlled signalling pathways. *Trends Pharm. Sci.* **39**, 481–493. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.02.005>
10. Wijshake T., Baker D.J., van de Sluis B. 2014. Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Bioph. Acta.* **1842**, 1942–1950.
11. Jiang F., Doudna J.A. 2017. CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
12. Lock J.T., Alzayady K.J., Yule D.I., Parker I. 2018. All three IP_3 receptor isoforms generate Ca^{2+} puffs that display similar characteristics. *Sci. Signal.* **11**, eaau0344.
13. Sledzinski P., Dabrowska M., Nowaczyk M., Olejniczak M. 2021. Paving the way towards precise and safe CRISPR genome editing. *Biotechnol. Adv.* **49**, 107737.
14. Chiang T.W., le Sage C., Larrieu D., Demir M., Jackson S.P. 2016. CRISPR–Cas9(D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.* **6**, 24356.
15. Kim J.M., Kim D., Kim S., Kim J.S. 2014. Genotyping with CRISPR–Cas-derived RNA-guided endonucleases. *Nat. Commun.* **5**, 3157.
16. Ломов Н.А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. 2019. Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas 9 при геномном редактировании. *Мол. биол.* **53**, 982–997.
17. Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. 2016. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии. *Вавиловский журн. генетики и селекции.* **20**, 493–510.
18. Allen F., Crepaldi L., Alsinet C., Strong A.J., Kleshchevnikov V., De Angeli P., Páleníková P., Khodak A., Kiselev V., Kosicki M., Bassett A.R., Harding H., Galanty Y., Muñoz-Martínez F., Metzakupian E., Jackson S.P., Parts L. 2018. Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat. Biotechnol.* **27**, 10.
19. Bennett E.P., Petersen B.L., Johansen I.E., Niu Y., Yang Z., Chamberlain Ch.A., Met Ö., Wandall H.H., Frödin M. 2020. INDEL detection, the ‘Achilles heel’ of precise genome editing: A survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. *Nucleic Acids Res.* **48**, 11958–11981.
20. Lemmon M.A., Schlessinger J. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **141**, 1117–1134.
21. Parys J.B., Vervliet T. 2020. New insights in the IP_3 receptor and its regulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1131**, 243–270.
22. Sugawara H., Kurosaki M., Takata M., Kurosaki T. 1997. Genetic evidence for involvement of type 1, type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in signal transduction through the B-cell antigen receptor. *EMBO J.* **16**, 3078–3088.
23. Cardenas C., Miller R.A., Smith I., Bui T., Molgó J., Müller M., Vais H., Cheung K.H., Yang J., Parker I., Thompson C.B., Birnbaum M.J., Hallows K.R., Foskett J.K. 2010. Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP_3 receptor Ca^{2+} transfer to mitochondria. *Cell.* **142**, 270–283.
24. Bartok A., Weaver D., Golenár T., Nichtova Z., Kátona M., Bánsághi S., Alzayady K.J., Thomas V.K., Ando H., Mikoshiba K., Joseph S.K., Yule D.I., Csordás G., Hajnóczky G. 2019. IP_3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat. Commun.* **10**, 3726.
25. Saleem H., Tovey S.C., Rahman T., Riley A.M., Potter B.V., Taylor C.W. 2013. Stimulation of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) receptor subtypes by analogues of IP_3 . *PLoS One.* **8**, 54877.
26. Alzayady K.J., Wang L., Chandrasekhar R., Wagner II L.E., Petegem F.V., Yule D.I. 2016. Defining the stoichiometry of inositol 1,4,5-trisphosphate binding required to initiate Ca^{2+} release. *Sci. Signal.* **9**, ra35.
27. Hu J., Han J., Li H., Zhang X., Liu L.L., Chen F., Zeng B. 2018. Human embryonic kidney 293 cells: A vehicle for biopharmaceutical manufacturing, structural biology, and electrophysiology. *Cells Tissues Organs.* **205**, 1–8.

Cell Lines with a Single Functional Isoform of the IP₃ Receptor

E. E. Kopylova¹, E. A. Voronova¹, N. V. Kabanova¹, O. A. Rogachevskaja¹,
M. F. Bystrova¹, S. S. Kolesnikov^{1,*}

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: staskolesnikov@yahoo.com*

Many agonists regulate cellular functions through surface receptors coupled by the phosphoinositide cascade to Ca²⁺ mobilization. In unexcitable cells, the generation of Ca²⁺ signals relies largely on Ca²⁺ release from из Ca²⁺ store localized in the endoplasmic reticulum (ER). In this system, IP₃ receptors (IP₃Rs), which are intracellular IP₃-gated Ca²⁺- channels, mediate controllable Ca²⁺ release from Ca²⁺ store in response to cell stimulation. A variety of factors embarrass both the analysis of a specific role for IP₃Rs in cell physiology and detailing their regulatory mechanisms. Firstly, three genes encode IP₃Rs, while cells usually express two or even all of them. Moreover, different IP₃R isoforms are under control of distinct mechanisms. Yet, isoform-specific antagonists of IP₃Rs have not been identified yet. Cell lines that express a single isoform appear to be an effective cellular model for studying regulatory mechanisms, pharmacology, and physiological role of IP₃R subtypes. Here we employed the CRISPR/Cas9 technology to inactivate genes of IP₃Rs in cells of the HEK-293 line, which express all three isoforms. Several monoclonal lines of genetically modified HEK-293 were obtained, and those containing biallelic inactivation mutation in two IP₃R genes were identified. Finally, three monoclonal cell lines, each containing the only functional IP₃R isoform, were generated. These cellular models can be used to evaluate a role for IP₃R of a particular subtype in agonist-induced Ca²⁺ signaling as well as for the analysis of their regulatory mechanisms.

Keywords: IP₃ receptors, CRISPR/Cas9, HEK-293 cells, cellular monoclonal

УДК 577.352.465

ДВА ТИПА КЛЕТОЧНЫХ БИОСЕНСОРОВ СЕРОТОНИНА

© 2023 г. О. А. Рогачевская^{а, *}, А. П. Черкашин^а, Е. Е. Копылова^а, М. Ф. Быстрова^а

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 30.09.2022 г.

Метод клеточных биосенсоров, позволяющий локально детектировать вещества, секретируемые одиночными клетками, традиционно используется в изучении периферической вкусовой системы. В основе этого метода лежит клетка, экспрессирующая рецептор секретируемой молекулы, который обычно сопряжен с мобилизацией Ca^{2+} . Таким образом, высвобождение нейротрансмиттера исследуемыми клетками можно отслеживать в реальном времени по Ca^{2+} -сигналам в клетках-биосенсорах. Определенной особенностью таких сенсоров является то, что Ca^{2+} -сигналы, инициируемые лигандами GPCR-рецепторов, могут генерироваться по принципу “все или ничего” за счет участия Ca^{2+} -индуцированного выброса Ca^{2+} (CICR), являющегося триггер-подобным механизмом. По ответам такого биосенсора можно констатировать сам факт секреции нейромедиатора, но для изучения регуляций, влияющих на количество высвобождаемого нейромедиатора, такие биосенсоры малоприспособлены. С этой точки зрения градуальные биосенсоры, которые используют иные сигнальные системы, например cAMP-систему, могут оказаться более информативными. Нами были получены биосенсоры серотонина двух типов. Один биосенсор был получен на основе клеток СНО, экспрессирующих рекомбинантный рецептор 5-НТ2С, сопряженный фосфолипазным путем с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Другой биосенсор представлял собой клетки НЕК-293, экспрессирующие как рецептор 5-НТ4, сопряженный с активацией аденилатциклазы, так и флуоресцентный белок Pink Flamingo (НЕК/5-НТ4/PF), являющийся генетически кодируемым молекулярным сенсором cAMP. Хотя оба клеточных биосенсора позволяли детектировать серотонин в наномолярных концентрациях, 5-НТ2С-положительные клетки генерировали Ca^{2+} -ответы в соответствии с принципом “все или ничего”. Между тем в клетках, экспрессирующих рецептор 5-НТ4 и Pink Flamingo, серотонин-индуцируемые cAMP-сигналы градуально возрастали с концентрацией агониста в области 0.3–30 нМ. Представляется, что НЕК/5-НТ4/PF биосенсор вполне пригоден для исследований механизмов регуляции секреции серотонина.

Ключевые слова: клеточный биосенсор, серотонин, Ca^{2+} -сигнализация, cAMP-сигнализация, генетически кодируемые сенсоры

DOI: 10.31857/S0233475523010085, **EDN:** NTZCSG

ВВЕДЕНИЕ

Изучение секреции сигнальных молекул на уровне одиночной клетки сопряжено с необходимостью мониторинга секретируемого соединения в локальной области пространства и в режиме реального времени. Эффективным подходом для решения этой задачи является метод клеточного биосенсора. В основе этого метода лежит клетка, экспрессирующая рецептор секретируемой молекулы, который сопряжен с сигнальной системой, активность которой можно тем или иным образом детектировать. Обычно используются гептаспиральные рецепторы (G-protein-coupled receptor, GPCR), рекомбинантные или эндогенные, которые сопряжены с мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} . Методы мониторинга последнего в

реальном времени хорошо отработаны [1]. С использованием метода клеточного биосенсора была проанализирована секреция различных нейротрансмиттеров, идентифицированных во вкусовой почке, таких как серотонин [2], АТР [3, 4], норадреналин [5], ГАМК [6] и ацетилхолин [7]. Серотонин — первый нейромедиатор, идентифицированный во вкусовой системе вначале иммуногистохимически, а затем физиологически и методом клеточного биосенсора [2, 8]. Считается, что экзоцитозный механизм обеспечивает секрецию серотонина в ответ на вкусовую стимуляцию вкусовых клеток III типа. В режиме on-line это впервые было показано с использованием клеток СНО, стабильно экспрессирующих рекомбинантный рецептор 5-НТ2С [2], и в этой работе ре-

шалась задача демонстрации стимул-зависимого выброса серотонина. Между тем количественные характеристики секреции, например анализ зависимости количества секретируемого серотонина от интенсивности вкусового стимула, требуют градуального сенсора, т.е. сенсора, ответы которого пропорциональны локальной концентрации соединения, высвобожденного клеткой за определенное время. В предыдущих работах было показано, что многие клетки в ответ на агонисты GPCR-рецепторов генерируют Ca^{2+} -сигналы по принципу “все или ничего” [9, 10]. Иными словами, при разных дозах выше пороговой, агонисты инициировали Ca^{2+} -сигналы, практически идентичные по амплитуде и близкие по форме. Возникает вопрос, можно ли получить градуальный клеточный сенсор серотонина путем гетерологичной экспрессии серотониновых GPCR-рецепторов, сопряженных фосфоинозитидным каскадом с мобилизацией Ca^{2+} , к которым относятся серотониновые рецепторы 5-HT2 типа [11]. На базе клеток СНО, трансфицированных плазмидой для гетерологичной экспрессии рецептора 5-HT2C, нами был получен сенсор, способный детектировать серотонин в наномолярной области концентраций. Оказалось, однако, что 5-HT2C-положительные клетки СНО генерировали Ca^{2+} -ответы на серотонин по принципу “все или ничего” и, следовательно, были непригодны для количественного анализа секреции. Следует отметить, что семейство GPCR-рецепторов серотонина включает рецепторы, сопряженные с аденилатциклазой [12], например 5-HT4, который стимулирует продукцию сАМР. Учитывая разницу в работе аденилатциклазной системы и системы Ca^{2+} -сигналикации, можно было ожидать, что клеточный сенсор серотонина на основе 5-HT4-рецептора окажется градуальным. Развитие генетически кодируемых флуоресцентных зондов предоставляет в настоящий момент возможность on-line мониторинга внутриклеточного сАМР. В частности, таким сенсором является Pink Flamingo (PF) [13], интенсивность флуоресценции которого растет с сАМР в физиологической области концентраций. В данной работе мы провели сравнительный анализ двух различных клеточных биосенсоров серотонина – СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярная биология. Для клонирования рецепторов серотонина (5-HT2C, 5-HT4) из мозга мыши с использованием набора GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma) была выделена тотальная РНК. Методом реакции обратной транскрипции с применением набора SuperScript

IV VILO Master Mix (Invitrogene) в присутствии олиго(dT)-праймеров была получена кДНК, которая служила матрицей для дальнейших ПЦР. Для амплификации полноразмерного рецептора 5-HT2C выбрана последовательность, кодирующая 5-HT2C (Htr2c, NM_008312.4), которая включает нуклеотиды 689–2065. ПЦР проводили с ген-специфичными праймерами TAAGAAT-TCTGGCCACCATGGTGAACCTGGGGCACT и TATGTCGACTGCACACTACTAATCCTCTCGCTG, включающие сайты рестрикции EcoRI и SalI, по которым полученный транскрипт клонировали в плазмидный вектор pDsRed-Monomer-N1 (Clontech). Эта плазида обеспечивала экспрессию химерного белка, состоящего из рецептора серотонина 5-HT2C, на N-конце которого находится красный флуоресцентный белок DsRed. Последовательность рецептора 5-HT4 (Htr4, NM_008313.4), включающую нуклеотиды 207–1376, амплифицировали с помощью праймеров TATAAGCTTCCTGTAATGGACAACTTGATG и TATAAGCTTAGTATCACTGGGGCTGAGC. ПЦР-продукт был клонирован по сайту HindIII в вектор pAcGFP1-Hyg-N1 (Takara Bio). Сконструированная плазида обеспечивала экспрессию 5-HT4 рецептора серотонина, слитого с зеленым флуоресцентным белком. Клонирование и наработка плазмид в препаративных количествах осуществлялась в соответствии с протоколами, подробно описанными нами ранее [9, 14].

Трансфекция клеток и получение моноклональных линий клеток-сенсоров. Клетки трансфицировали плазмидными векторами набором для трансфекции FuGENE 6 (Promega) по оптимизированному согласно рекомендациям производителя протоколу, используя 1 мкг конструкта pDsRed-Monomer-N1/5-HT2C или смесь двух плазмид в равном соотношении: 0.5 мкг pAcGFP1-Hyg-N1/5-HT4 + 0.5 мкг Pink Flamingo (#102356, Addgene) для трансфекции $(2-4) \times 10^5$ клеток в 1 лунке 12-лучного планшета. Из популяции трансфицированных клеток с помощью многоступенчатого последовательного отбора, включающего применение селективных антибиотиков, клеточного сортера, визуального контроля и физиологического тестирования (подобно полученным ранее клеткам [9, 14]), были получены две моноклональные линии клеток-сенсоров, СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF.

Культура клеток. Клетки линий СНО-K1 и НЕК-293 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных) и модифицированные моноклональные линии СНО/5-HT2C и НЕК/5-HT4/PF культивировали в среде F12 (Invitrogen) и DMEM (Invitrogen) с высоким содержанием глюкозы соответственно, с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone), 100 мг/мл

гентамицина (Sigma), 2 mM глутамин (Sigma) (ростовая среда) во влажной атмосфере с 5% содержанием CO_2 в воздухе при 37 °C. Для культивирования полученных моноклональных линий дополнительно добавляли к 1 мл ростовой среды 300 мкг антибиотика G418 (Invivogen) для клеток CHO/5-HT2C и 300 мкг G418 + 200 мкг гигромицина (Hygromycin B, Invivogen) для клеток HEK/5-HT4/PF.

Мониторинг внутриклеточных сигналов клеток-сенсоров. Перед экспериментом клетки снимали с культурального пластика 0.25% раствором трипсина (Sigma-Aldrich), а затем прикрепляли ко дну фотометрической камеры с помощью адгезивного материала Cell Tak (Corning). При дальнейших манипуляциях клетки находились во внеклеточном растворе, содержащем (mM): 130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 HEPES, pH 7.4, 10 глюкозы (все соли и буферы произведены Sigma-Aldrich). Для загрузки флуоресцентным Ca^{2+} -зондом клетки CHO/5-HT2C инкубировали 30 мин в присутствии 4 мкМ Fluo-8 AM (ATTOBioquest) и 0.02% детергента Pluronic (Molecular Probes). Затем клетки отмывали внеклеточным раствором и выдерживали в нем в течение 1 ч. Клетки HEK/5-HT4/PF перед экспериментом инкубировали 1.5 ч в фотометрической камере в физиологическом растворе. Описанные манипуляции и дальнейшие эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24 °C). Фотометрические эксперименты осуществляли с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 135 (Zeiss), оборудованного объективом Plan NeoFluar 20×/0.75 и цифровой EMCCD камерой LucaR (Andor Technology). Флуоресценцию клеток CHO/5-HT2C возбуждали на длине волны 480 ± 10 нм, эмиссию регистрировали в области 520 ± 20 нм, что соответствует спектральным характеристикам Fluo-8. Изменение уровня Ca^{2+} в цитоплазме оценивали по относительному изменению интенсивности флуоресценции Fluo-8 $\Delta F/F_0$, где $\Delta F = F - F_0$, F и F_0 – интенсивность эмиссии Ca^{2+} -зонда в текущий момент времени и в начале регистрации, соответственно. Флуоресценцию клеток HEK/5-HT4/PF возбуждали при 572 ± 17.5 нм, эмиссию регистрировали в области 634 ± 34 нм, что соответствует характеристикам флуоресцентного белка Pink Flamingo. Количественный фотометрический анализ изображений осуществляли с использованием программы NIS-Elements AR 5.3 (Nikon). Полученные экспериментальные данные обрабатывали с помощью программы Sigma Plot 14.5 (Systat Software Inc). В работе использовали серотонин (Tocris Bioscience), апплицируя его путем полной замены раствора в фотометрической камере с помощью системы перфузии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основываясь на предыдущем опыте получения клеточных моноклонов [9, 14], мы получили собственную линию клеток CHO, стабильно экспрессирующую рекомбинантный рецептор 5-HT2C мыши. Далее были получены несколько моноклональных линий CHO/5-HT2C, большая часть клеток которых генерировала Ca^{2+} -сигналы в ответ на серотонин с порогом 1–3 нМ (рис. 1а) и обладала высокой степенью селективности. Нам удалось многократно наблюдать выброс серотонина из отдельных вкусовых клеток III типа, однако полученные нами клетки CHO/5-HT2C реагировали на появление нейромедиатора по принципу “все или ничего”, т.е. не реагировали на подпороговые концентрации серотонина, но генерировали одинаково максимальный Ca^{2+} -сигнал при пороговых и значительно превосходящих порог концентрациях серотонина. (рис. 1б). Такое поведение биосенсора не позволяет проводить исследования количественной регуляции секреции серотонина.

Ранее было показано, что механизм “все или ничего” характерен для агонист-индуцированных Ca^{2+} -ответов мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека [15]. Ряд фактов свидетельствовал о том, что в основе этого явления лежит механизм CICR, который обеспечивает генерацию относительно универсальных ответов при разных дозах агонистов [15, 16]. Вероятно, механизм CICR присущ всем клеткам, экспрессирующим IP_3 - и риадиновые рецепторы [17, 18]. Таким образом, для получения градуального клеточного биосенсора серотонина следовало использовать другой рецептор-сигнальный каскад.

Семейство рецепторов серотонина включает семь типов рецепторов (5-HT1–7), шесть из которых являются GPCR (G-protein coupled receptors) рецепторами, а 5-HT3 представляет собой лиганд-управляемый катионный канал [12]. Поскольку нами исследовалась зависимость секреции серотонина не только от величины прикладываемого стимула, но и от внеклеточного Ca^{2+} , рецепторы семейства 5-HT3, как и рецепторы, связанные с мобилизацией Ca^{2+} , не соответствовали нашим требованиям. Известно, что серотониновый рецептор 5-HT4 в основном сопряжен со стимуляцией аденилатциклазы, а не с мобилизацией Ca^{2+} [19]. Учитывая, что сАМР-сигнализация не включает в себя какой-либо триггероподобный механизм, такой как CICR [20], мы ожидали, что в 5-HT4-положительных клетках серотонин будет вызывать сАМР-сигналы, которые градуально увеличиваются с ростом дозы агониста. On-line мониторинг внутриклеточного

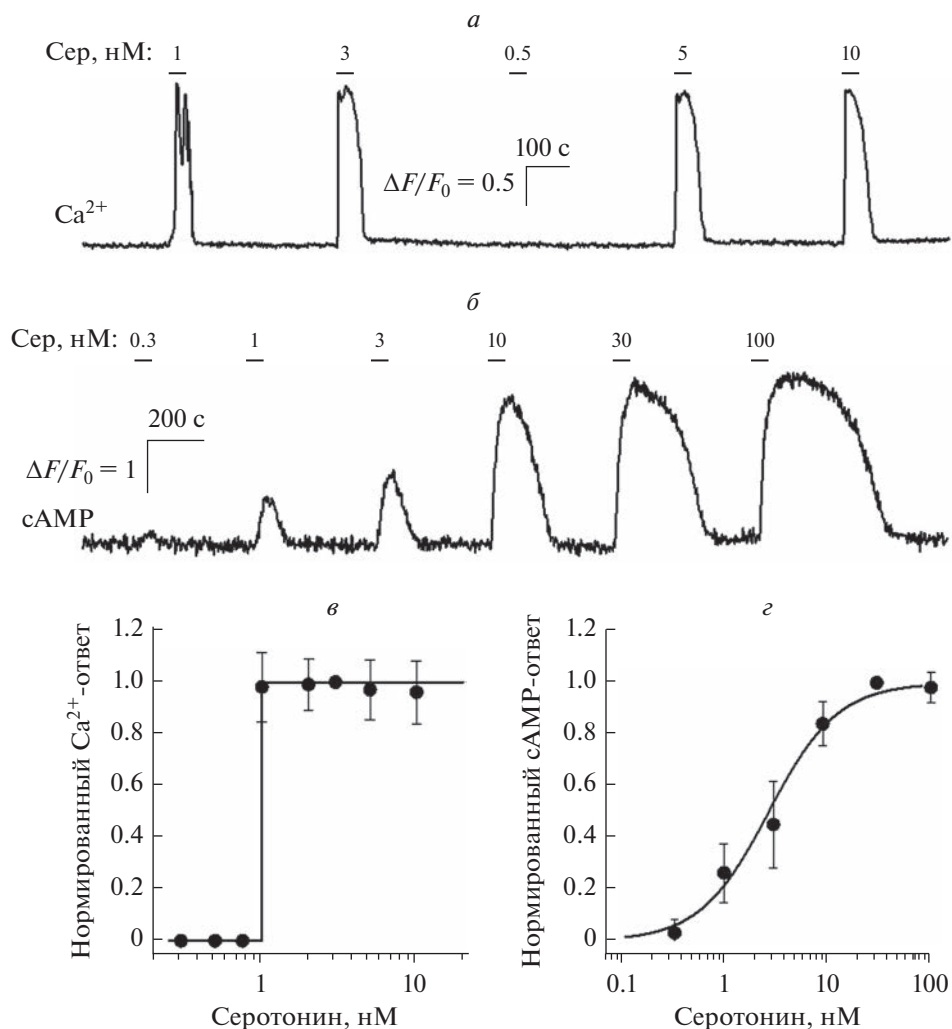


Рис. 1. Биосенсоры серотонина.

a – Мониторинг внутриклеточного Ca^{2+} в 5-HT2C-положительной CHO-клетке по флуоресценции Fluo-8 при последовательной стимуляции серотонином в указанных концентрациях.

б – Мониторинг внутриклеточного cAMP с помощью сенсора Pink Flamindo в клетке HEK-293, экспрессирующей рецептор 5-HT4 при последовательной стимуляции серотонином в указанных концентрациях.

в – Кривая доза–ответ для биосенсора CHO/5-HT2C. В каждом конкретном эксперименте изменения концентрации Ca^{2+} ($\Delta F/F_0$), вызванные серотонином в данной концентрации, нормировались на серотониновый ответ при 3 нМ. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 46$). Сплошная линия представляет собой функцию Хевисайда $H(S-1)$ от концентрации серотонина S .

г – Кривая доза–ответ для биосенсора HEK/5-HT4/PF. В каждом конкретном эксперименте cAMP-ответы на серотонин в различных концентрациях нормировались на cAMP-ответ, вызванный 30 нМ серотонина. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n = 31$). Сплошная прямая представляет уравнение Хилла $R = S^n / (S_{0.5}^n + S^n)$ для нормированного cAMP-ответа R при коэффициенте Хилла $n = 1.3$ и концентрации полуэффекта $S_{0.5} = 27$ нМ.

cAMP стал возможен относительно недавно с появлением генетически кодируемых сенсоров, включая белок Pink Flamindo, флуоресценция которого зависит от концентрации cAMP в клетке [13].

Для получения клеточного биосенсора мы клонировали рецептор 5-HT4 из мозга мыши и экспрессировали его в клетках HEK-293 одновременно с генетически кодируемым cAMP-сенсором Pink Flamindo [13]. Было показано, что лишь небольшая часть 5-HT4-положительных клеток

генерирует хорошо детектируемые cAMP-сигналы, проявлявшиеся в форме повышения флуоресценции Pink Flamindo, в ответ на серотонин в области наномолярных концентраций (рис. 1б). Используя методы клеточной селекции для отбора максимально чувствительных клеток, нам удалось получить несколько моноклональных линий клеток HEK/5-HT4/PF, большинство из которых демонстрировали достаточную чувствительность к серотонину и показывали градуальную зависи-

мость внутриклеточных сАМР-сигналов от концентрации наружного серотонина. Полученные клетки НЕК/5-НТ4/РФ обычно отвечали на 1 нМ серотонина, хотя отдельные клетки могли детектировать появление агониста и при существенно меньших концентрациях. Насыщение сАМР-ответов достигалось при 20 нМ агониста. Таким образом, второй полученный нами клеточный биосенсор серотонина НЕК/5-НТ4/РФ характеризуется градуальной зависимостью доза — ответ в диапазоне 1–20 нМ (рис. 1з). Это позволило нам более детально исследовать секрецию серотонина вкусовыми клетками в разных физиологических условиях и при различных условиях стимуляции [9].

Авторы благодарят Д.М. Поташникову за помощь в проведении работ по сортировке клеток на клеточном сортере FACSaria SORP в рамках Программы развития МГУ.

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

Источники финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 19-75-10068.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neher E. 1995. The use of Fura-2 for estimating Ca buffers and Ca fluxes. *Neuropharm.* **11**, 1423–1442.
2. Huang Y.J., Maruyama Y., Lu K.S., Pereira E., Plonsky, I., Baur, J.E., Wu, D., Roper, S.D. 2005. Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J. Neurosci.* **25**, 843–847.
3. Huang, Y.J., Maruyama Y., Dvoryanchikov G., Pereira E., Chaudhari N., Roper S.D. 2007. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 6436–6441.
4. Romanov R.A., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Jiang P., Margolskee R.F., Kolesnikov S.S. 2007. Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *EMBO J.* **26**, 657–667.
5. Huang Y.A., Maruyama Y., Roper S.D. 2008. Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *J. Neurosci.* **28**, 13088–13093.
6. Huang Y.A., Pereira E., Roper S.D. 2011. Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS ONE.* **6**, e25471.
7. Dando, R., Roper, S.D. 2012. Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling. *J. Physiol.* **590**, 3009–3017.
8. Yee C.L., Yang R., Bottger B., Finger T.E., Kinnamon J.C. 2001. “Type III” cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J. Comp. Neurol.* **440** (1), 97–108.
9. Cherkashin A.P., Rogachevskaja O.A., Kabanova N.V., Kotova P.D., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2022. Taste cells of the type III employ CASR to maintain steady serotonin exocytosis at variable Ca^{2+} in the extracellular medium. *Cells.* **11**(8), 1369.
10. Kotova P.D., Bystrova M.F., Rogachevskaja O.A., Khokhlov A.A., Sysoeva V.Y., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2018. Coupling of P2Y receptors to Ca^{2+} mobilization in mesenchymal stromal cells from the human adipose tissue. *Cell Calcium.* **71**, 1–14.
11. Berg K.A., Clarke W.P., Sailstad C., Saltzman A., Maayani S. 1994 Signal transduction differences between 5-hydroxytryptamine type 2A and type 2C receptor systems. *Mol. Pharmacol.* **46**, 477–484.
12. Barnes N.M., Ahern G.P., Becamel C., Bockaert J., Camilleri M., Chaumont-Dubel S., Claeysen S., Cunningham K.A., Fone K. C., Gershon M., Di Giovanni G., Goodfellow N.M., Halberstadt A.L., Hartley R.M., Hassaine G., Herrick-Davis K., Hovius R., Lacivita E., Lambe E.K., Leopoldo M., Levy F.O., Lummis S.C.R., Marin P., Maroteaux L., McCreary A.C., Nelson D.L., Neumaier J.F., Newman-Tancredi A., Nury H., Roberts A., Roth B. L., Roumier A., Sanger G.J., Teitler M., Sharp T., Villalón C.M., Vogel H., Watts S.W., Hoyer D. 2021. Classification of receptors for 5-hydroxytryptamine. *Pharmacology and Function. Pharmacol. Rev.* **73** (1), 310–520.
13. Harada K., Ito M., Wang X., Tanaka M., Wongso D., Konno A., Hirai H., Hirase H., Tsuboi T., Kitaguchi T. 2017. Red fluorescent protein-based cAMP indicator applicable to optogenetics and in vivo imaging. *Sci. Rep.* **7**, 735.
14. Котова П.Д., Рогачевская О.А. 2020. Клеточная тест-система с генетически кодируемыми сенсорами цитоплазматического и ретикулярного кальция. *Биол. мембраны.* **37** (5), 373–380.
15. Kotova P.D., Sysoeva V.Y., Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Kolesnikova A.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Fadeeva J.I., Tkachuk V.A., Kolesnikov S.S. 2014. Functional expression of adrenoreceptors in mesenchymal stromal cells derived from the human adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* **1843**, 1899–1908.
16. Kaimachnikov N.P., Kotova P.D., Kochkina E.N., Rogachevskaja, O.A., Khokhlov A.A., Bystrova M.F., Kolesnikov S.S. 2021. Modeling of Ca^{2+} transients initiated by GPCR agonists in mesenchymal stromal cells. *BBA Adv.* **1**, 100012.
17. Park J.B., Lee C.S., Jang J.H., Ghim J., Kim Y.J., You S., Hwang D., Suh P. G., Ryu S.H. 2012. Phospholipase signalling networks in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **12**, 782–792.
18. Atakpa-Adaji P., Thillaiappan N.B., Taylor C.W. 2020. IP3 receptors and their intimate liaisons. *Curr. Opin. Physiol.* **17**, 9–16.
19. Masson J., Emerit M.B., Hamon M., Darmon M. 2012. Serotonergic signaling: Multiple effectors and pleiotropic effects. *WIREs Membr. Transp. Signal* **1**, 685–713.
20. Sassone-Corsi P. 2012. The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011148.

Two Types of Cellular Serotonin Biosensors

O. A. Rogachevskaja^{1, *}, A. P. Cherkashin¹, E. E. Kopylova¹, M. F. Bystrova¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: o.rogachevskaja@gmail.com*

The method of cellular biosensors, which allows local detection of substances secreted by single cells, is traditionally used for studying the peripheral taste system. This method is based on cells that can detect secreted molecules with surface receptors coupled to the mobilization of intracellular Ca^{2+} . Thus, the neurotransmitter release can be tracked on-line by Ca^{2+} signals generated by a cell-biosensor. A specific feature of such cellular biosensors is that Ca^{2+} signals induced by GPCR ligands may be generated in the “all-or-nothing” manner due to the involvement of trigger-like mechanism, that is Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (CICR). Although such a sensor validates the fact of neurotransmitter secretion, it does not allow studying regulatory circuits controlling the quantity of the released substance. This implies that biosensors, which are based on distinct intracellular signaling pathways, such as for cAMP signaling, could be more informative. Here we generated two types of serotonin biosensors. One was based on CHO cells expressing the recombinant 5-HT_{2C} receptor coupled by the phospholipase pathway to Ca^{2+} mobilization. Another involved HEK-293 cells that expressed both 5-HT_{2C} receptor coupled to adenylyl cyclase and the fluorescent protein Pink Flamindo serving as genetically encoded cAMP sensor. Although both cellular biosensors allow detection of nanomolar serotonin, 5-HT_{2C} cells generated Ca^{2+} responses in the “all-or-nothing” manner. In contrast, in 5-HT₄ and Pink Flamindo expressing cells, serotonin-triggered cAMP responses gradually rose with agonist concentration in the range of 0.3–30 nM. It thus appears that the 5-HT₄/Pink Flamindo biosensor is suitable for studying regulatory mechanism of serotonin secretion.

Keywords: cellular biosensor, serotonin, Ca^{2+} signaling, cAMP signaling, genetically encoded sensors

УДК 577.34

ВЫРАБОТКА АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫМИ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРАМИ 4D5ScFv-miniSOG И DARPIn-miniSOG ВНУТРИ ЖИВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. Г. М. Прошкина^{a, *}, Е. И. Шрамова^a, С. М. Деев^{a, b}

^aИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117997 Россия

^bПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 01.09.2022 г.

После доработки 04.10.2022 г.

Принята к публикации 05.10.2022 г.

В настоящее время в экспериментальной онкологии развиваются подходы, основанные на разработке адресных фотосенсибилизаторов, которые можно доставлять специфично к опухоли определенного молекулярного профиля. Данная работа посвящена изучению генерации активных форм кислорода фотосенсибилизаторами белковой природы 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG, специфичными к онкомаркеру HER2. Установлено, что, несмотря на наличие одного и того же фототоксического модуля в своем составе, данные фотосенсибилизаторы характеризуются различным уровнем производства АФК, что, возможно, объясняется различной скоростью рецептор-опосредованной интернализации 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG.

Ключевые слова: активные формы кислорода, генетически кодируемые фотосенсибилизаторы, фотодинамическая терапия

DOI: 10.31857/S0233475523010073, **EDN:** NTUFGR

ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия представляет собой одну из интересных реализаций фотонной терапии для лечения рака. Терапевтический эффект достигается за счет использования фотосенсибилизаторов (ФС) органического (порфирины, фталоцианины и др.) или неорганического (например, наночастицы TiO₂, CdSe/CdS, ZnO) происхождения, способных генерировать активные формы кислорода (АФК), включая синглетный кислород и свободные радикалы. Раковые клетки уничтожаются за счет передачи энергии от фотосенсибилизаторов, активируемых светом, к кислороду, что вызывает внутриклеточный окислительный стресс вследствие генерации АФК. Именно АФК, образуемые при фотовозбуждении ФС, вызывают повреждение ДНК, белков и липидов раковых клеток. Данный подход отличается селективностью и локальностью терапевтического воздействия на опухоль, поскольку разрушение раковых клеток происходит только при облучении зоны опухоли светом определенной длины волны, необходимой для возбуждения накопившегося в клетках ФС [1, 2].

В настоящее время в экспериментальной онкологии развиваются подходы, основанные на разработке адресных ФС, представляющих собой химические конъюгаты с направляющими модулями белковой природы.

Опухоль-ассоциированный антиген HER2 (рецептор 2 эпидермального фактора роста человека), являющийся рецепторной тирозинкиназой, представляет собой привлекательную мишень для адресной терапии рака, поскольку он сверхэкспрессируется в 15–25% случаев рака молочной железы человека и его наличие коррелирует с агрессивной формой развития заболевания [3, 4].

Создание фототоксичных белков KillerRed [5] и miniSOG [6], способных к производству АФК, натолкнуло исследователей на мысль о создании адресных генетически кодируемых ФС. В качестве адресной молекулы может использоваться антитело, его фрагмент или искусственные белки неиммуноглобулиновой природы [7–9].

Фототоксичный белок miniSOG сконструирован на основе фототропина 2 *Arabidopsis thaliana* и содержит флавиномононуклеотид в качестве кофактора [6]. В хромофорном кармане кофактор

связан с белковой глобулой нековалентно. Именно кофактор ФМН определяет фототоксические (генерацию АФК) и флуоресцентные свойства miniSOG под действием синего света [6, 10, 11].

Ранее нами были получены генетически кодируемые ФС на основе miniSOG, способные специфично и селективно взаимодействовать с рецептором HER2 на поверхности раковых клеток [12, 13]. В качестве HER2-специфичного домена в составе ФС использовали мини-антитело scFv4D5 [14] или DARPIn_9-29 [15].

Оказалось, что при наличии одного и того же фототоксического модуля в своем составе данные ФС обладают различным цитотоксическим эффектом в отношении HER2-положительных раковых клеток *in vitro*. Так, IC_{50} для 4D5scFv-miniSOG составила 0.16 мкМ, в то время как для DARPIn-miniSOG это значение равно 0.8 мкМ [12, 13]. Мы предположили, что возможным объяснением такой разницы в цитотоксичности может быть различная способность генерации АФК. Работа посвящена изучению фотоиндуцированной токсичности генетически кодируемыми ФС (4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG) внутри живой клетки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. В работе использовали HER2-положительную клеточную линию аденокарциномы протоков молочной железы BT-474 (ATCC HTB-20) и линию аденокарциномы молочной железы с нормальным уровнем экспрессии рецептора HER2 — MDA-MB-231 (ATCC HTB-26). Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ *L*-глутамин, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 мкг/мл пенициллина при +37°C в атмосфере с 5% CO₂. Для проточной цитометрии и опытов по определению АФК снятие клеток с подложки проводили раствором Версена (ПанЭко, Россия) без использования трипсина.

Наработка белков. Экспрессию генов, кодирующих гибридные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) по методу автоиндукции [16]. Трансформанты *E. coli* культивировали в среде для автоиндукции TBP-5052, содержащей 0.1 г/л ампициллина, при 25°C с интенсивной аэрацией до OD₆₀₀ 12–14 ч. Клетки собирали центрифугированием при 6000 g в течение 10 мин при 4°C. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (20 мМ фосфат натрия (Na-P_i), 500 мМ NaCl, pH 7.5, 50 мкг/мл лизоцима), обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Vibra-Cell (Sonics, США) (режим: 30 раз по 10 с с интервалом в 10 с). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин при

4°C. Осветленный лизат пропускали через фильтр 0.22 мкм и наносили на колонку Ni²⁺-NTA (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером следующего состава: 20 мМ Na-P_i, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол. Последующую очистку целевого белка проводили в соответствии с инструкциями производителя колонки His-tag (GE Healthcare, США). Выход очищенного белка составил 40 мг на 1 л культуры для DARPIn-miniSOG и 25 мг на 1 л культуры для 4D5scFv-miniSOG.

Проточная цитометрия. Клетки снимали с подложки раствором Версена, осаждали центрифугированием при 100 g в течение 2 мин и ресуспендировали в среде RPMI-1640 без сыворотки до конечной концентрации 10⁶ клеток/мл. К 100 мкл клеточной суспензии добавляли 4D5scFv-miniSOG или DARPIn-miniSOG до конечной концентрации 250 нМ. Инкубацию проводили в течение 10 мин в темноте при 37°C, после чего клетки отмывали трижды от не связавшегося с рецептором белка. Флуоресценцию детектировали с использованием проточного цитометра NovoCyte 3000 (ACEA Biosciences) при следующих параметрах: возбуждение — лазер с длиной волны 488 нм, детекция флуоресценции — фильтр 530 ± 30 нм. Для каждого образца исследовали не менее 10000 событий.

Измерение АФК в живых клетках. Уровень внутриклеточных АФК в клетках BT-474, инкубированных с 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG, определяли путем окрашивания клеток флуоресцентным красителем карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетатом (carboxy-H₂DCFDA, Invitrogen). Для оценки продукции АФК при фотосенсибилизации, опосредованной внешним источником излучения, клетки высевали в 96-луночный планшет и выращивали в течение ночи. Затем к клеткам добавляли белки 4D5scFv-miniSOG или DARPIn-miniSOG до конечной концентрации 500 нМ, инкубировали 10 мин при 37°C, отмывали от не связавшихся с рецептором молекул ФС и подвергали облучению светодиодом (465 нм, 55 мВт/см², Ledszone) в течение 10 мин при 37°C. В качестве положительного контроля продукции АФК использовали клетки, обработанные 50 мМ H₂O₂ при 37°C в течение 30 мин. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, инкубированные с 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG, но не подвергнутые облучению. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером и инкубировали в ростовой среде с 10 мМ карбокси-H₂DCFDA в течение 1 ч при 37°C. Флуоресценцию окисленной формы карбокси-H₂DCFDA измеряли на планшетном спектрофлуориметре Infinite Pro M1000 (Tecan) с возбуж-

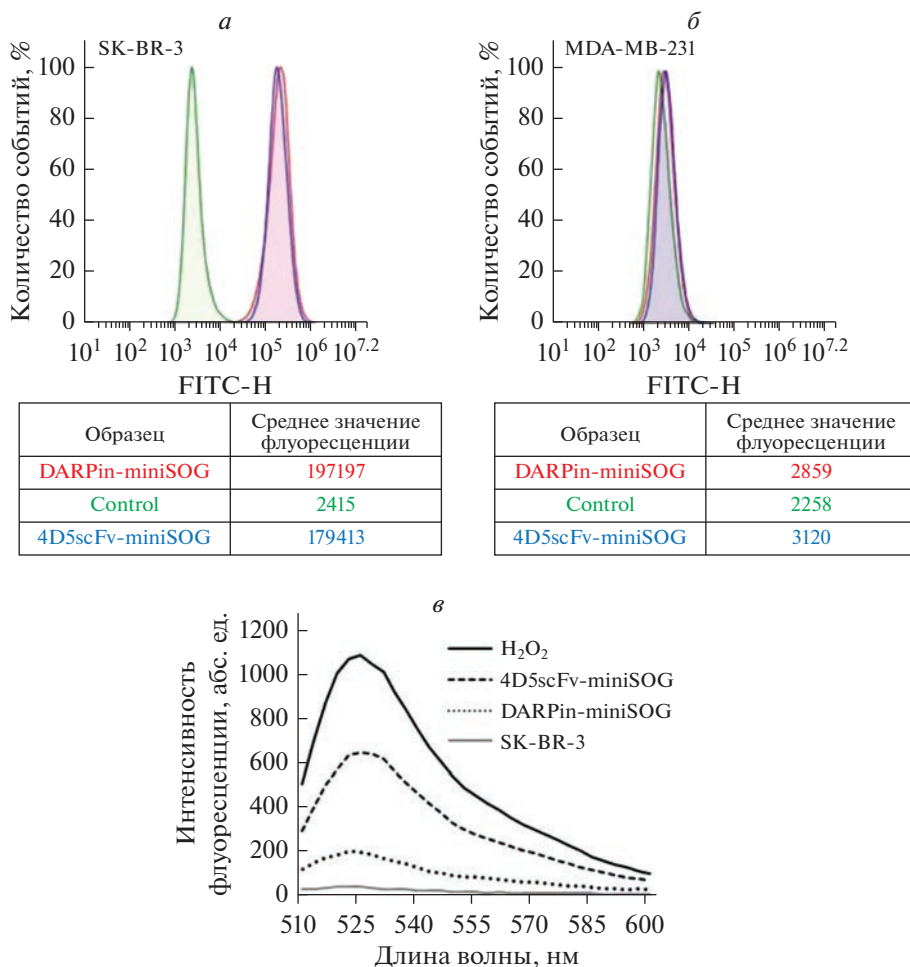


Рис. 1. Функциональная характеристика адресного и цитотоксического модуля в составе генетически кодируемых ФС 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG. *а, б* – Взаимодействие 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2 на поверхности клеток SK-BR-3 (*а*) и MDA-MB-231 (*б*). Зеленая кривая соответствует клеткам, не обработанным белками (контроль автофлуоресценции), красная и синяя кривые соответствуют клеткам, обработанным DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG соответственно. *в* – Определение уровня АФК, индуцируемых 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG при облучении в живой клетке.

дением при 485 нм и эмиссией в диапазоне 500–650 нм с шагом 2 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка взаимодействия с рецептором HER2 гибридных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG. Эффективность взаимодействия HER2-специфичных адресных ФС 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2 на поверхности раковых клеток оценивали методом проточной цитометрии. Для этого клетки инкубировали с 4D5scFv-miniSOG или DARPin-miniSOG, как описано в “Материалах и методах”. В качестве контроля специфичности взаимодействия использовали клетки аденокарциномы молочной железы MDA-MB-231, характеризующиеся нормальным для клеток эпителиального происхож-

дения уровнем экспрессии рецептора HER2 [17]. Как видно из результатов проточной цитометрии (рис. 1*а* и 1*б*), оба белка, 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, одинаково эффективно взаимодействуют с рецептором HER2 на поверхности HER2-положительных раковых клеток, о чем свидетельствует значительный сдвиг медианы флуоресценции относительно клеток, не обработанных белком. В то же время для клеток MDA-MB-231, инкубированных с 4D5scFv-miniSOG или DARPin-miniSOG, сдвиг медианы флуоресценции относительно контроля остается незначительным (рис. 1*б*).

Оценка уровня АФК в живых клетках. Принимая во внимание данные проточной цитометрии и данные по цитотоксичности 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, полученные нами ранее [12, 13], мы предположили, что значительная разница в

вызываемом цитотоксическом эффекте этих двух ФС при одинаково эффективном взаимодействии с рецептором, может быть обусловлена различным уровнем генерации АФК.

Для того чтобы оценить уровень продукции АФК, клетки BT-474 инкубировали с белками 4D5scFv-miniSOG или DARPin-miniSOG в течение 10 мин, облучали синим светом и измеряли АФК согласно протоколу, описанному в “Материалах и методах”. Оказалось, что уровень АФК в клетках, обработанных 4D5scFv-miniSOG, примерно в 4 раза выше, чем в клетках, обработанных DARPin-miniSOG (рис. 1в). Вероятным объяснением этому факту может быть различная скорость рецептор-опосредованной интернализации белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, связанная с размером белков. Как было показано нами ранее, DARPin-miniSOG локализуется в ранних эндосомах через 5–7 мин после начала инкубации, попадая в дальнейшем на терминальную деградацию в лизосомы [13], в то время как процесс интернализации 4D5scFv-miniSOG занимает до 30 мин [12]. Кроме того, также ранее было установлено, что интенсивность флуоресценции 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG на поверхности HER2-положительных клеток в условиях, исключающих процесс рецептор-опосредованной интернализации, одинакова [18], а фототоксичность DARPin-miniSOG повышается, если проводить облучение клеток синим светом при пониженной температуре (4°C); IC₅₀ в этом случае составляла 0.2 мМ [19]. Известно, что при пониженной температуре происходит замедление процесса рецептор-опосредованной интернализации. Таким образом, увеличение времени нахождения на мембране или в липидном бислое для DARPin-miniSOG приводит к тому, что его фотоиндуцированный цитотоксический эффект становится сравним с эффектом от 4D5scFv-miniSOG. Известно, что наибольшие фотодинамические повреждения от ФС можно ожидать, когда он локализуется в клеточной мембране, поскольку именно мембрана является главной мишенью для АФК, продуцируемых ФС [20]. Дополнительным фактором, способствующим повреждению липидов при фотодинамической терапии, является высокая растворимость молекулярного кислорода в липидах. Таким образом, в липидной среде у ФС больше шансов, чем в воде, столкнуться с O₂ и выработать АФК. Более того, если в клетке образуются АФК, существует множество ферментативных и неферментативных способов поддержания внутриклеточного окислительно-восстановительного гомеостаза и защиты клетки от различных типов оксидантов. Система защиты клетки от АФК представлена глутатионом, супероксиддисмутазами, пероксиредоксинами, а также белками семейств

тиоредоксина и глутаредоксина, каждый из которых имеет специфическую субклеточную локализацию и активность [21]. Принимая во внимание эти факты, а также наши данные по уровню генерации АФК, можно заключить, что скорость интернализации для генетически кодируемых ФС является одним из важных параметров, определяющих фототоксичность 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2020-773.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. 1978. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res.* **38** (8), 2628–2635.
2. Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. 2006. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer.* **6** (7), 535–545.
3. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. 1987. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* **235** (4785), 177–182.
4. Gusterson B.A., Gelber R.D., Goldhirsch A., Price K.N., Save-Soderborgh J., Anbazhagan R., Styles J., Rudenstam C.M., Golouh R., Reed R. 1992. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **10** (7), 1049–1056.
5. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. 2006. A genetically encoded photosensitizer. *Nat. Biotechnol.* **24** (1), 95–99.
6. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. 2011. A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* **9** (4), e1001041.
7. Serebrovskaya E.O., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Lukyanov K.A., Chudakov D.M., Deyev S.M. 2009. Targeting cancer cells by using an antireceptor antibody-photosensitizer fusion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106** (23), 9221–9225.
8. Shipunova V.O., Deyev S.M. 2022. Artificial scaffold polypeptides as an efficient tool for the targeted delivery of nanostructures *in vitro* and *in vivo*. *Acta Naturae.* **14** (1), 54–72.

9. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. 2022. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy. *Russ. Chem. Rev.* **91**, RCR5034. <https://doi.org/10.1070/RCR5034>
10. Shramova E.I., Chumakov S.P., Shipunova V.O., Ryabova A.V., Telegin G.B., Kabashin A.V., Deyev S.M., Proshkina G.M. 2022. Genetically encoded BRET-activated photodynamic therapy for the treatment of deep-seated tumors. *Light Sci. Appl.* **11** (1), 38.
11. Zhai Y., Huang X., Zhang K., Huang Y., Jiang Y., Cui J., Zhang Z., Chiu C.K.C., Zhong W., Li G. 2022. Spatio-temporal-resolved protein networks profiling with photoactivation dependent proximity labeling. *Nat. Commun.* **13** (1), 4906.
12. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. 2013. Genetically encoded immunophotosensitizer 4D5scFv-miniSOG is a highly selective agent for targeted photokilling of tumor cells in vitro. *Theranostics*. **3** (11), 831–840.
13. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. 2015. A new anticancer toxin based on HER2/neu-specific DARPIn and photoactive flavoprotein miniSOG. *Biochimie*. **118**, 116–122.
14. Worn A., Plückthun A. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **305** (5), 989–1010.
15. Binz H.K., Amstutz P., Kohl A., Stumpp M.T., Briand C., Forrer P., Grütter M.G., Plückthun A. 2004. High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat. Biotechnol.* **22** (5), 575–582.
16. Studier F.W. 2014. Stable expression clones and auto-induction for protein production in *E. coli*. *Methods Mol. Biol.* **1091**, 17–32.
17. Subik K., Lee J.F., Baxter L., Strzepek T., Costello D., Crowley P., Xing L., Hung M.C., Bonfiglio T., Hicks D.G., Tang P. 2010. The expression patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by immunohistochemical analysis in breast cancer cell lines. *Breast Cancer (Auckl)*. **4**, 35–41.
18. Кузичкина Е.О., Шилова О.Н., Деев С.М. 2018. Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2. *Acta Naturae*. **10** (4), 87–94.
19. Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Лебеденко Е.Н., Деев С.М. 2015. Интернализация и рециркуляция рецептора HER2 при взаимодействии адресного фототоксичного белка DARPIn-miniSOG с клетками аденокарциномы молочной железы человека. *Acta Naturae*. **7** (3), 141–148.
20. Girotti A.W. 2001. Photosensitized oxidation of membrane lipids: Reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms. *J. Photochem. Photobiol. B*. **63** (1–3), 103–113.
21. Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell Biol.* **194** (1), 7–15.

Production of Reactive Oxygen Species by Genetically Encoded Photosensitizers 4D5scFv-miniSOG and DARPIn-miniSOG in Living Cells

G. M. Proshkina^{1, *}, E. I. Shramova¹, S. M. Deyev^{1, 2}

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia

²Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia

*e-mail: gmb@ibch.ru

Currently, experimental oncology is developing approaches based on the development of targeted photosensitizers that can be delivered specifically to a tumor of a certain molecular profile. This work is devoted to the study of the generation of reactive oxygen species by photosensitizers of protein nature 4D5scFv-miniSOG and DARPIn-miniSOG, specific to the oncomarker HER2. It was found that despite the presence of the same phototoxic module in their composition, these photosensitizers are characterized by different levels of ROS production, which may be explained by the different rate of receptor-mediated internalization of 4D5scFv-miniSOG and DARPIn-miniSOG.

Keywords: reactive oxygen species, genetically encoded photosensitizers, photodynamic therapy

УДК 57.085.23

ТАРГЕТНЫЕ ЛИПОСОМЫ, НАГРУЖЕННЫЕ ДНК-МИМЕТИКАМИ, ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ЭЛИМИНАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

© 2023 г. Е. И. Шрамова^{а, *}, Г. М. Прошкина^а, С. М. Деев^{а, б}

^аИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

^бПервый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

*e-mail: shramova.e.i@gmail.com

Поступила в редакцию 01.09.2022 г.

После доработки 28.09.2022 г.

Принята к публикации 05.10.2022 г.

В работе представлен инновационный метод направленной элиминации опухолевых клеток определенного молекулярного профиля путем инактивации транскрипции генов общих субъединиц ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз человека. Для инактивации генов общих субъединиц РНК-полимераз использовали комплементарные им ДНК-миметики, которые доставляли к клеткам в составе липосом, модифицированных по внешней поверхности адресными молекулами. Было показано, что инактивация генов общих субъединиц РНК-полимераз Rpb5, Rpb6 или Rpb8 в зависимости от выбранной мишени вызывает гибель до 50% HER2-положительных клеток рака молочной железы человека в культуре.

Ключевые слова: таргетная липосомальная доставка, ДНК-миметики

DOI: 10.31857/S0233475523010097, **EDN:** NTWQTL

ВВЕДЕНИЕ

Проблема поиска новых высокотехнологичных подходов к терапии злокачественных новообразований особенно остро стоит на фоне ежегодного прироста новых случаев онкологических заболеваний и увеличения летальных исходов. Несмотря на значительные успехи в усовершенствовании методов лечения рака, не существует надежных универсальных подходов, позволяющих одновременно элиминировать первичный узел и отдаленные метастазы, зачастую оказывающиеся более устойчивыми к терапии. Наряду с эффективностью разрабатываемых препаратов важную роль играет избирательность доставки терапевтического агента к клеткам-мишеням с целью снижения общей токсической нагрузки на организм. Нами предлагается метод направленной элиминации опухолевых клеток путем инактивации транскрипции генов общих субъединиц ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз человека. Инактивация генов общих субъединиц РНК-полимераз осуществляется комплементар-

ными им ДНК-миметиками, которые доставляются к клеткам определенного молекулярного профиля в составе липосом. Избирательность доставки осуществляется модификацией липосом по внешней поверхности адресными модулями неиммуноглобулиновой природы.

Известно, что ядра всех эукариотических организмов содержат три формы ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз, которые обладают общей структурной организацией и отвечают за транскрипцию разных наборов генов [1, 2]. Отличительной чертой ядерных РНК-полимераз является наличие пяти незаменимых общих субъединиц, входящих в состав всех трех ферментов [3–5]. Таким образом, если в раковой клетке подавить экспрессию генов, кодирующих хотя бы одну из пяти общих субъединиц, то, теоретически, удастся лишить клетку всего транскрипционного аппарата.

Антисмысловая терапия (antisense therapy) представляет собой метод лечения, основанный на выключении/остановке синтеза белка, участвующего в патогенезе заболевания, путем ингибирования трансляции его мРНК с помощью комплементарных коротких нуклеотидных последовательностей (антисмысловых олигонуклеотидов, АО). В последние годы антисмысловая технология стала одной из многообещающих стратегий

Список сокращений: АО — антисмысловые олигонуклеотиды; мРНК — матричная РНК; ТФ-LNA — тифосфатные олигонуклеотиды с концевыми LNA-нуклеотидами; HER2 — рецептор эпидермального фактора роста человека 2 типа; LNA — Locked Nucleic Acid.

лечения рака [6]. Различные гены, известные как ключевые регуляторы апоптоза, клеточного роста, метастазирования и ангиогенеза, с различным успехом были исследованы в качестве молекулярных мишеней для антисмысловой терапии.

Основываясь на принципе антисмысловой терапии, для подавления экспрессии генов общих субъединиц РНК-полимераз нами был осуществлен дизайн ДНК-миметиков на основе тиофосфатных олигонуклеотидов, содержащих на 5'- и 3'-концах по два или три "зашелкнутых" рибонуклеотида (Locked Nucleic Acid, LNA). Тиофосфатные олигонуклеотиды широко используются в антисенсовой биотехнологии как регуляторы экспрессии генов [7–9], поскольку обладают повышенной устойчивостью к действию клеточных нуклеаз и повышенным сродством к ДНК- и РНК-мишеням.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика синтеза адресных моноламеллярных липосом диаметром 100 нм, нагруженных цитотоксическими белковыми компонентами [10, 11]. Применение данной методики для загрузки липосом ДНК-миметиками позволило получить адресные липосомы, содержащие большое количество молекул АО, оказывающих избирательный цитотоксический эффект в отношении HER2⁺ клеток *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Анализ последовательностей вариантов транскриптов общих субъединиц ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз Rpb5, Rpb6 и Rpb8, доступных в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), проводили с помощью программы Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Последовательности для синтеза модифицированных олигонуклеотидов (20–22 п.о.) выбирали в областях, консервативных для всех имеющихся в базе данных изоформ какой-либо субъединицы. Выбранную последовательность скринировали на уникальность в геноме человека. Синтез тиофосфатных олигонуклеотидов с концевыми LNA-нуклеотидами (ТФ-LNA) и с цианиновой меткой на 5'-конце заказывали на фирме Синтол (Москва, Россия).

Для приготовления липосом использовали суспензию фосфолипидов сои, содержащую 40% *L*- α -фосфатидилхолина (Avanti Polar Lipids, США), с конечной концентрацией 4 г/л. ТФ-LNA растворяли в воде до конечной концентрации 100 пмоль/мкл. Загрузку проводили в присутствии 150 мМ KCl в 20 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7.5. Смесь фосфолипидов и ТФ-LNA подвергали 5-кратной процедуре замораживания при температуре –150°C и оттаивания, после чего многократно (19 раз) продавливали через 100-нм

фильтр с помощью экструдера, получая липосомы со средним размером 100 нм. Для устранения невключившегося ДНК-миметика проводили хроматографию на колонке CL-2B в том же буфере.

Наработку адресного модуля DARPin₉₋₂₉ для конъюгации с поверхностью липосом осуществляли в бактериальной системе экспрессии (штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)) методом автоиндукции с последующей очисткой белка с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии, как было описано нами ранее [10]. Функционализацию ТФ-LNA-нагруженных липосом адресным модулем осуществляли согласно ранее разработанному протоколу [10].

Размер и поверхностный заряд нагруженных липосом определяли методом динамического и электрофоретического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Для расчета количества молекул ТФ-LNA, включившихся в состав одной липосомы, использовали метод, описанный в работе [10]. Вычисления проводили, используя спектр поглощения липосом, коэффициент молярной экстинкции для Cu5.5 (~250 000 М⁻¹см⁻¹). Концентрацию ненагруженных липосом, используемых в работе, в суспензии 1 мг/мл считали равной 1.1 нМ [10].

Клетки рака молочной железы человека BT-474 (ATCC HTB-20), гиперэкспрессирующие рецептор HER2, и MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) с уровнем экспрессии HER2, характерным для нормальных эпителиальных тканей, растили в среде RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, Германия), 2 мМ *L*-глутамин и антибиотики пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл) (ПанЭко), при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и повышенной влажности.

Цитотоксическое действие липосомальных препаратов ДНК-миметиков оценивали с помощью стандартного МТТ-теста [12]. Измерение оптического поглощения растворенного формазана на длине волны 570 нм проводили на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария). Относительную жизнеспособность клеток рассчитывали делением значения поглощения на 570 нм на величину поглощения, измеренную для контрольных клеток, инкубировавшихся в тех же условиях в отсутствие токсических препаратов. Все эксперименты были выполнены в трех повторях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве мишени для подавления экспрессии генов общих субъединиц РНК-полимераз были выбраны гены субъединиц Rpb5, Rpb6, Rpb8 РНК-полимераз I–III. На основе анализа

Таблица 1. Характеристики использованных в работе тиофосфатных олигонуклеотидов с концевыми LNA-нуклеотидами (ТФ-LNA)

Название	Последовательность	Общая субъединица	Гидродинамический размер нагруженных липосом, нм	ζ -потенциал, мВ	Расчетное количество молекул ТФ-LNA, включившихся в одну липосому
Rpb5.1	5'Cy5.5- ^m C _s T _s c _s t _s g _s g _s a _s a _s a _s t _s c _s c _s g _s c _s a _s g _s A _s C ^m	Rpb5	95 ± 19	-28.2 ± 1.3	~829
Rpb5.2	5'Cy5.5- ^m C _s T _s ^m C _s t _s g _s g _s a _s a _s a _s t _s c _s c _s g _s c _s a _s g _s A _s C ^m	Rpb5	97 ± 17	-27.8 ± 1.4	~960
Rpb6.1	5'Cy5.5- ^m C _s G _s a _s g _s c _s g _s a _s g _s c _s c _s c _s g _s c _s g _s t _s g _s c _s t _s g _s g _s G _s ^m C	Rpb6	102 ± 24	-32.6 ± 0.6	~770
Rpb6.2	5'Cy5.5- ^m C _s A _s G _s ^m c _s g _s g _s g _s g _s t _s c _s g _s c _s t _s g _s a _s g _s g _s c _s g _s A _s G _s G	Rpb6	108 ± 25	-34.5 ± 0.8	~1060
Rpb8.1	5'Cy5.5- ^m C _s C _s c _s c _s t _s t _s c _s t _s g _s c _s t _s g _s c _s t _s c _s t _s c _s t _s g _s G _s C ^m	Rpb8	105 ± 27	-30.7 ± 1.2	~800
Rpb8.2	5'Cy5.5- ^m C _s C _s t _s g _s a _s g _s t _s g _s g _s c _s a _s g _s c _s c _s g _s c _s t _s c _s t _s G _s C ^m	Rpb8	117 ± 31	-29.8 ± 0.8	~880

Примечание. Рибозы, модифицированные LNA, выделены жирным шрифтом и заглавными буквами. Маленькие буквы обозначают дезоксирибозы; s – фосфотиоат; m – C5-метилцитидин; Cy5.5 ковалентно присоединен к 5'-концу.

изоформ генов общих субъединиц, доступных в PubMed, были выбраны последовательности ДНК, отвечающие двум условиям: 1) последовательность консервативна для всех изоформ какой-либо субъединицы РНК-полимераз; 2) последовательность уникальна для генома человека. Сконструированные последовательности АО представлены в табл. 1. АО загружали в липосомы, внешняя поверхность которых содержала HER2-специфичный модуль на основе белка с анкириновыми повторами DARPIn₉₋₂₉ (Designed Ankyrin Repeat Protein), являющимся инновационным полипептидом неиммуноглобулинового скаффолда и обладающим высокой аффинностью к субдомену I рецептора HER2 [13]. Гидродинамический размер липосом, нагруженных ТФ-LNA и функционализированных DARPIn₉₋₂₉, и ζ -потенциал составляли около 105 нм и -30 мВ соответственно. Для расчета количества молекул ТФ-LNA, включившихся в состав одной липосомы, использовали спектры поглощения липосомальных препаратов и метод, описанный в работе [10]. Было установлено, что среднее количество молекул ТФ-LNA, включившихся в одну липосому, составило около 880 молекул (табл. 1).

Оценку цитотоксического действия адресных липосом, нагруженных ТФ-LNA, проводили методом стандартного МТТ-теста (рис. 1). Стартовая концентрация адресных липосом составляла 300 нМ. Оказалось, что при максимальной концентрации адресных липосом, нагружен-

ных ТФ-LNA, специфически связывающимися с общей субъединицей Rpb5, ТФ-LNARpb5.1 и ТФ-LNARpb5.2, цитотоксический эффект для клеток BT-474 с высоким уровнем экспрессии рецепторов HER2, составил ~31 и 20% соответственно. Эти же липосомы вызывали гибель соответственно лишь ~8 и 5% клеток MDA-MB-231 с нормальным уровнем экспрессии HER2. Для липосом, нагруженных ТФ-LNA, специфичных к общей субъединице Rpb6, цитотоксический эффект для гиперэкспрессирующих HER2 клеток BT-474, составил ~49% для ТФ-LNARpb6.1 и 51% ТФ-LNARpb6.2, а для клеток MDA-MB-231 цитотоксический эффект оказался на уровне ~9 и 10% соответственно. Цитотоксическое действие в отношении клеток BT-474 адресных липосом, нагруженных ТФ-LNARpb8.1 и ТФ-LNARpb8.2, составило около 48 и 53%, для клеток MDA-MB-231 ~10 и 12% соответственно. Отметим, что ненагруженные липосомы не оказывали на клетки цитотоксического действия, что было показано нами ранее [10, 11].

Также было исследовано сочетанное цитотоксическое действие смеси эквимоларных количеств адресных липосом, нагруженных ТФ-LNA, комплементарных участкам разных общих субъединиц РНК-полимераз. Для загрузки были выбраны ТФ-LNA, оказавшие максимальное токсическое воздействие на HER2⁺ клетки в отдельности. Результаты МТТ-теста приведены на рис. 1 (столбец “Смесь”). Было показано, что при макси-

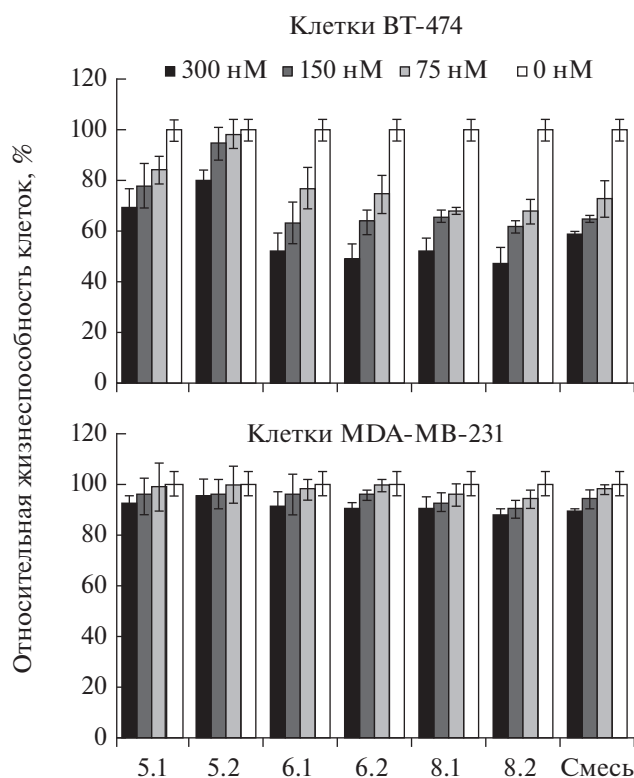


Рис. 1. Цитотоксическое действие адресных липосом, нагруженных специфичными к различным общим субъединицам РНК-полимераз ТФ-LNA, в отношении $HER2^{+}$ клеток BT-474 и $HER2^{-}$ клеток MDA-MB-231. Названия липосом соответствуют номеру нагруженных ТФ-LNA из табл. 1: 5.1 – LipRpb5.1, 5.2 – LipRpb5.2, 6.1 – LipRpb6.1, 6.2 – LipRpb6.2, 8.1 – LipRpb8.1, 8.2 – LipRpb8.2. Смесь – содержит смесь ТФ-LNA 6.2 и 8.2.

мальной концентрации адресных липосом, нагруженных смесью ТФ-LNARpb6.2 и ТФ-LNARpb8.2, цитотоксический эффект для клеток BT-474 составил 42 и 11% для клеток MDA-MB-231.

Достигнутый цитотоксический эффект в отношении $HER2^{+}$ клеток позволяет предположить перспективность предлагаемого подхода. Наиболее подходящими мишенями для ингибирования транскрипции оказались общие субъединицы Rpb6 и Rpb8. При этом оптимизация последовательностей ТФ-LNA может внести вклад в возрастание цитотоксического воздействия. Однако факт, что усиление эффекта от смешивания адресных липосом, нагруженных смесью ТФ-LNA к разным мишеням, не наблюдалось, может говорить об активации клетками “запасных путей” поддержания транскрипции на уровне, необходимом для жизнеобеспечения клетки. Поэтому более эффективным может оказаться сочетанное воздействие предлагаемых липосом с известными токсическими веществами другого механизма действия [14, 15].

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Werner F., Grohmann D. 2011. Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 85–98.
2. Cuevas-Bermúdez A., Martínez-Fernández V., Garrido-Godino A.I., Navarro F. 2017. Subunits common to RNA polymerases. In: *The Yeast Role in Medical Applications*. Ed. Abdulkhair W. M. H. London: IntechOpen, p. 151–165. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70936>
3. Zaros C., Briand J.F., Boulard Y., Labarre-Mariotte S., Garcia-Lopez M.C., Thuriaux P., Navarro F. 2007. Functional organization of the Rpb5 subunit shared by the three yeast RNA polymerases. *Nucl. Acids Research*. **35** (2), 634–647.
4. Garrido-Godino A.I., Garcia-Lopez M.C., Navarro F. 2013. Correct assembly of RNA polymerase II depends on the foot domain and is required for multiple steps of transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3611–3626.
5. Woychik N.A., Liao S.-M., Kolodziej P.A., Young R.A. 1990. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.* **4**, 313–323.
6. Stahel R.A., Zangemeister-Wittke U. 2003. Antisense oligonucleotides for cancer therapy—an overview. *Lung Cancer*. **41** (Suppl 1), S81–S88. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(03)00147-8)
7. Cohen J.S. 1993. Phosphorothioate oligonucleotides. In: *Antisense Research and Applications*. Eds Crooke S.T., Lebleu B. Florida: CRC Press, p. 205–223.
8. Wengel J. 2001. LNA (locked nucleic acid). In: *Antisense Drug Technology; Principles, Strategies, and Applications*. Ed. Crooke, S.T. New York: Marcel Dekker, p. 339–357.
9. Hagedorn P.H., Persson R., Funder E.D., Albæk N., Diemer S.L., Hansen D.J., Møller M.R., Papargyri N., Christiansen H., Hansen B.R., Hansen H.F., Jensen M.A., Koch T. 2018. Locked nucleic acid: Modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discov. Today*. **23** (1), 101–114.
10. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalishman Y., Kotlyar A. 2018. Selective staining and eradication of cancer cells by protein-carrying DARPIn-functionalized liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **130**, 296–305.
11. Shramova E.I., Shilova M.V., Ryabova A.V., Dzhali-lova D.S., Zolotova N.A., Telegin G.B., Deyev S.M., Proshkina G.M. 2021. Barnase*Barstar-guided two-step targeting approach for drug delivery to tumor cells

- in vivo. *J. Control. Release.* **340**, 200–208.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.11.001>
12. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65** (1–2), 55–63.
 13. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. 2008. Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display. *J. Mol. Biol.* **382** (5), 1211–1227.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085>
 14. Shilova O., Shramova E., Proshkina G., Deyev S. 2021. Natural and designed toxins for precise therapy: Modern approaches in experimental oncology. *Int. J. Mol. Sci.* **22** (9), 4975.
<https://doi.org/10.3390/ijms22094975>
 15. Tolmachev V.M., Chernov V.I., Deyev S.M. 2022. Targeted nuclear medicine. Seek and destroy. *Russ. Chem. Rev.* **91**, RCR5034.
<https://doi.org/10.1070/RCR5034>

Targeting Liposomes Loaded with DNA Mimetics for the Directional Elimination of Tumor Cells

E. I. Shramova^{1, *}, G. M. Proshkina¹, S. M. Deyev^{1, 2}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

²*Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, 119991 Russia*

*e-mail: shramova.e.i@gmail.com

The article presents an innovative method for the targeted elimination of tumor cells of a certain molecular profile by inactivating the transcription of genes of common subunits of human RNA polymerases using complementary DNA mimetics delivered into cells inside liposomes modified on the outer surface with targeting molecules. It was shown that inactivation of genes of RNA polymerase common subunits Rpb5, Rpb6, or Rpb8 by the proposed method, depending on the chosen target, causes death of up to 50% of HER2-positive human breast cancer cells in culture.

Keywords: targeted liposomal delivery, DNA mimetics

УДК 577.352.33

ВЛИЯНИЕ АУКСИНА НА ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ И АКТИВНОСТЬ АЦИЛ-ЛИПИДНЫХ ДЕСАТУРАЗ В ПРОРОСТКАХ ЯРОВОЙ ПШЕНИЦЫ *Triticum aestivum* L.

© 2023 г. Н. П. Ковалевская*

Институт экологии и генетики микроорганизмов –
филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: nina_kov@mail.ru

Поступила в редакцию 29.12.2021 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 20.04.2022 г.

Исследовано влияние экзогенного ауксина на изменения жирнокислотного состава суммарных липидов листьев и корней проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Установлено, что разнообразие жирных кислот в вегетативных органах (лист или корень) зависит не только от концентрации ауксина, а также от донора оксида азота (N_2 , NO_3). Отмечено, что при повышении концентрации экзогенного ауксина происходит увеличение микровязкости и уменьшение проницаемости мембран вегетативных органов пшеницы, что подтверждается снижением индекса двойных связей (ИДС). При этом происходит увеличение концентрации насыщенных жирных кислот (пальмитиновой и стеариновой), которые используются в качестве предшественников для образования жирных кислот с очень длинной цепью (ЖКОДЦ). Установлено, что экзогенный ауксин приводит к увеличению суммарного содержания ЖКОДЦ в листьях при дефиците (8.4%) и избытке доноров NO (12.3%). Внесение экзогенного ауксина нивелирует значительные различия активности десатураз в корнях пшеницы при разных уровнях доноров оксида азота. Высказано предположение, что биосинтез докозодиеновой кислоты ($C_{22:2}$) в листьях является одним из ключевых этапов в формировании адаптивного ответа клеточных мембран на воздействие абиотических стрессов при онтогенезе растений. Повышение уровня NO способствует перемещению от корней к побегам ауксина, который может служить регулятором активности элонгаз и десатураз при синтезе ЖКОДЦ.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., жирные кислоты, десатуразы, ауксин, оксид азота

DOI: 10.31857/S0233475522060081, **EDN:** NSIESM

ВВЕДЕНИЕ

В растительных клетках обмен с окружающей средой сигналами и веществами регулируется через плазматическую мембрану, состоящую из двойного слоя липидов со встроенными в него белками. Физико-химические свойства мембран, в том числе температура фазовых переходов, в значительной степени определяются составом жирных кислот (ЖК) их липидов. Рассматривая изменения процентного содержания ЖК в общих мембранных липидах растений, авторы [1] выделили две стратегии адаптивных реакций, связанных с увеличением содержания или насыщенных, или ненасыщенных ЖК и, соответственно, с противоположными изменениями микровязкости клеточных мембран при стрессовых воздействиях. Первая стратегия отличается увеличением содержания ненасыщенных ЖК в составе общих липидов клеточных мембран. Она характерна для биотического [2] и температурного [3] стресса, а

также для стрессов, вызванных высокими концентрациями тяжелых металлов [4]. Вторая стратегия, связанная с увеличением содержания насыщенных ЖК, осуществляется при окислительном и солевом стрессе (который также является и гиперосмотическим) [1].

В клетках растений при окислительном стрессе усиливается образование активных форм кислорода (АФК) [5]. Для своей стабилизации АФК активно захватывают электроны из молекул липидов, белков и нуклеиновых кислот, дестабилизируя макромолекулы и надмолекулярные структуры. Одной из основных мишеней АФК являются остатки ненасыщенных жирных кислот в составе липидов мембран, подвергающиеся свободнорадикальному окислению по месту двойных связей с образованием гидроперекисей и диеновых конъюгатов, которые быстро метаболизируются, превращаясь в альдегиды и диальдегиды. У высших растений наиболее распространенными полиненасыщенными жирными кислотами

(ПНЖК) являются три 18-углеродных вида, а именно олеиновая ($C_{18:1}$), линолевая ($C_{18:2}$) и α -линоленовая ($C_{18:3}$) кислоты. Примечательной особенностью является то, что химическая природа двойной связи, по-видимому, делает их датчиками окислительно-восстановительного потенциала в растениях [6].

Главным фактором, позволяющим клетке поддерживать текучесть мембран в условиях стресса, является эффективная работа клеточных десатураз, обеспечивающая изменение уровня ненасыщенности мембранных липидов [7]. В настоящее время убедительно продемонстрировано, что экспрессия генов десатураз регулируется действием различных стрессовых факторов и гормонов. Это позволяет внести их в список ключевых участников как процессов сигнализации, так и механизмов защиты и адаптации растений к биотическим и абиотическим факторам [8]. Установлено, что наличие в мембранных липидах линолевой ($C_{18:2}$) кислоты, а следовательно, и активность $\Delta 12$ -десатуразы являются критическими факторами для формирования характерной для организма структуры мембраны [9, 10].

В последнее время помимо регулярных публикаций исследований окислительного стресса стали появляться сообщения о нитрозильном/нитроокислительном стрессе [11–14]. Из литературы известно, что увеличение NO часто сопровождается накоплением других реактивных молекул, таких как H_2O_2 и H_2S . Так, в некоторых исследованиях показано, что при введении нитратов в клетки растений образуется пероксид водорода [15, 16]. Наряду с АФК и H_2S , NO потенциально может способствовать общему внутриклеточному окислительно-восстановительному потенциалу клетки [6]. В зависимости от соотношения внутриклеточных концентраций NO и АФК могут взаимно как усиливать, так и ослаблять действие друг друга на клетки. NO может также влиять на биосинтез, катаболизм/конъюгацию, транспорт, восприятие и/или трансдукцию различных фитогормонов, таких как ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен, салициловая кислота, жасмонаты и брассиностероиды. Механизмы, лежащие в основе взаимодействия между NO и растительными гормонами, до сих пор полностью не выяснены [17].

В случае некоторых стрессовых ситуаций в тканях растений возрастает количество насыщенных ЖК с очень длинной (более 20 атомов углерода) цепью (ЖКОДЦ) [18–21]. Синтез ЖКОДЦ играет важную роль в направлении и степени растяжения клеток растений в ходе морфогенеза [22]. В работе [23] показано, что ЖКОДЦ являются незаменимыми регуляторами дифференциации клеток за счет регуляции полярного распределения ауксина. Растительный гормон ауксин (пре-

обладающая форма — индол-3-уксусная кислота; ИУК) является основным координирующим сигналом в регуляции развития растений. Многие аспекты действия ауксина зависят от его дифференциального распределения в тканях растения, где он образует локальные максимумы или градиенты между клетками [24]. Ранее в работе [25] было показано, что снижение уровня NO_3 способствовало перемещению ауксина от побегов к корням. Интересно, что о взаимодействии между сигналом нитрата и транспортом ауксина также сообщает тот факт, что нитратные транспортеры способны переносить ауксин. Изучение физиологической роли ЖКОДЦ находится в настоящее время лишь на начальной стадии накопления фактического материала. Таким образом, дальнейшие исследования ЖКОДЦ как компонентов липидного микроокружения ферментов биомембран, несомненно, позволят получить новые данные об их функционировании.

Цель данной работы — выяснить направленность изменений, происходящих в липидном метаболизме проростков яровой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) под влиянием экзогенного ауксина. В задачи работы входило определить активность ацил-липидных десатураз в листьях и корнях проростков пшеницы под действием экзогенного ауксина и выявить изменения жирнокислотного состава вегетативных органов в ответ на повышение концентрации ауксина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали яровую пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Экада 70. Семена проращивали 3 сут на фильтрах, смоченных дистиллированной водой в лабораторных условиях при 16-часовом дневном освещении и $20^\circ C/24^\circ C$ (ночь/день). Затем проростки помещали на 7 дней в кюветы со средой Громова [26]. В половину кювет дополнительно не вносили азотные соли (N-дефицитные варианты, окислительный стресс). Во вторую половину кювет добавляли 20 мМ $NaNO_3$ (NO_3 -варианты, нитрозильный стресс). В качестве фитогормона ауксина использовали β -индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрациях 5, 25, 50, 100 мкг/мл.

Экстракцию липидов из вегетативных органов пшеницы проводили с использованием системы растворителей хлороформ–метанол–вода (1 : 2 : 0.8, по объему). Для удаления хлороформа из экстракта липидов использовали роторный испаритель RVO-64 (Чехия). Для получения метиловых эфиров жирных кислот к экстракту липидов после удаления растворителя добавляли 1% метанольный раствор H_2SO_4 и нагревали на водяной бане при $60^\circ C$ в течение 30 мин. После охлаждения метиловые эфиры жирных кислот трижды

экстрагировали гексаном. Анализ полученных метиловых эфиров жирных кислот проводили методом газожидкостной хроматографии с использованием хроматомасс-спектрометра 5973N/6890N MSD/DS AgilentTechnology (США). Капиллярная колонка HP-INNOWAX (30 м × 250 мк × 0.50 мм), градиент температуры: от 100 до 150°C со скоростью 10°C в мин от 150 до 255°C со скоростью 3°C в мин. Для расчета эквивалентной длины цепи использовали изократический режим, температура колонки — 200°C. Газ-носитель — гелий, скорость потока газа — 1 мл/мин. Масс-спектрометр — квадруполь, способ ионизации — электронный удар (EI, энергия ионизации: 70 эВ). Для идентификации пиков метиловых эфиров ЖК использовали стандартные метиловые эфиры (Sigma, США) и метод масс-спектрометрии с использованием библиотеки масс-спектров NIST 05 [27].

Для оценки ненасыщенности ЖК в тканях листьев использовали индекс двойных связей (ИДС): $\text{ИДС} = \sum P_j n / 100$, где P_j — содержание ЖК (вес. %) и n — количество двойных связей в каждой кислоте [28]. Также использовали коэффициент ненасыщенности жирных кислот (КН) как отношение суммы ненасыщенных ЖК к сумме насыщенных. Расчетная активность ацил-липидных Δ^9 -, Δ^{12} - и ω^3 -десатураз, катализирующих введение двойных связей в алифатические углеводные цепи олеиновой ($C_{18:1}$), линолевой ($C_{18:2}$) и линоленовой ($C_{18:3}$) ЖК, определялась как стеариол-, олеил- и линолеил-десатуразные отношения (SDR, ODR, LDR соответственно), рассчитанные на основании содержания отдельных компонентов суммы C_{18} —ЖК [10]:

$$\text{SDR} = (C_{18:1}) / (C_{18:0} + C_{18:1}), \quad (1)$$

$$\text{ODR} = (C_{18:2} + C_{18:3}) / (C_{18:1} + C_{18:2} + C_{18:3}), \quad (2)$$

$$\text{LDR} = (C_{18:3}) / (C_{18:2} + C_{18:3}), \quad (3)$$

где $C_{18:0}$, $C_{18:1}$, $C_{18:2}$ и $C_{18:3}$ — процентное от суммы ЖК содержание стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот соответственно.

Полученные данные обрабатывались с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Excel. Эксперименты проводились не менее, чем в трехкратной повторности. Данные табл. 1 и 2 представлены в виде медианы, а разброс значений — в виде интерквартильной широты (25 и 75 перцентиль).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом хромато-масс-спектрометрии проанализирован жирнокислотный состав суммарных липидов вегетативных органов проростков яровой пшеницы *Triticum aestivum* L. (табл. 1).

Установлено, что внесение экзогенного ИУК (5–50 мкг/мл) приводит к повышению разнообразия ЖК в вегетативных органах проростков пшеницы. Отмечена зависимость повышения разнообразия ЖК не только от концентрации ИУК, а также от вегетативного органа (лист или корень) и наличия доноров оксида азота (N_2 , NO_3). Разнообразие ЖК в листьях и корнях контрольных образцов N-дефицитных вариантов было ниже (13 и 15 ЖК соответственно), чем в вегетативных органах NO_3 -вариантов (14 и 24 ЖК соответственно). При внесении ИУК (5–50 мкг/мл) количество ЖК увеличивалось и в NO_3 -вариантах достигало максимума в листьях 26 ЖК (25 мкг/мл ИУК), а в корнях — 34 ЖК (5 мкг/мл ИУК). Примечательно, что в листьях и корнях при 100 мкг/мл ИУК количество ЖК в N-дефицитных вариантах было выше (26 и 21 ЖК соответственно), чем в NO_3 -вариантах (22 и 10 ЖК соответственно). Установлено, что для синтеза максимального количества ЖК в корнях пшеницы необходима меньшая концентрация ИУК (5 мкг/мл), чем в листьях (25 мкг/мл). Таким образом, есть основания полагать, что сведения о разнообразии ЖК могут использоваться как для изучения влияния этих параметров на дифференцировку клеток и тканей, так и для ранней диагностики стрессоустойчивости вегетативных органов.

Из результатов, представленных в табл. 1, видно, что длина углеводных цепей ЖК варьирует от 12 до 24 атомов. Значительную часть составляют кислоты с длиной цепи 16 и 18 атомов углерода. В большинстве вариантов проростков с экзогенной ИУК зафиксировано снижение суммарного содержания этих ЖК в листьях и корнях.

Из табл. 1 видно, что пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$) среди насыщенных ЖК занимает доминирующее место, ее содержание в вегетативных органах (лист/корень) контрольных образцов в N-дефицитных вариантах соответствует 24.6/29.0%, а в NO_3 -вариантах — 25.5/24.5%. Распределение ненасыщенных ЖК в листьях и корнях значительно различается: в листьях доминируют суммарно полиеновые кислоты — α -линоленовая ($C_{18:3}$) и линолевая ($C_{18:2}$), а в корнях — моноеновые (олеиновая ($C_{18:1}$) и пальмитолеиновая ($C_{16:1}$). В листьях пшеницы отмечено отсутствие олеиновой кислоты, другие ненасыщенные ЖК располагаются в следующий ряд: α -линоленовая кислота, пальмитолеиновая кислота, линолевая кислота. При этом содержание этих ЖК в N-дефицитных вариантах (48.3, 5.1, 2.0%) и в NO_3 -вариантах (44.8, 3.3, 2.2%) отличается незначительно. В корнях проростков пшеницы отмечено снижение процесса десатурации ненасыщенных ЖК и полное отсутствие триеновой α -линоленовой кислоты в обоих вариантах. Суммарное содержание

Таблица 1. Состав жирных кислот с $m_C \leq 18$ из суммарных липидов вегетативных органов яровой пшеницы при абиотических стрессах, % от суммы всех ЖК

ЖК	ИУК, мкг/мл				
	0	5	25	50	100
N-дефицитные варианты					
$C_{16:0}$	24.6 [24.2; 25.4] 29.0 [27.2; 29.6]	35.5 [34.5; 37.7] 25.9 [25.4; 26.8]	23.7 [22.9; 24.5] 34.6 [32.5; 36.7]	28.2 [26.2; 29.0] 72.5 [71.4; 73.3]	22.3 [19.5; 23.1] 31.8 [29.6; 32.6]
$C_{18:0}$	9.9 [9.5; 10.1] н/о	15.5 [15.0; 16.0] 7.5 [7.1; 7.9]	11.4 [11.0; 11.6] 7.9 [7.2; 8.2]	17.4 [16.9; 17.7] н/о	10.4 [10.1; 10.9] 7.5 [7.2; 7.6]
$C_{16:1}$	5.1 [4.4; 5.4] 19.9 [19.0; 20.8]	4.9 [4.6; 5.2] 16.2 [15.3; 16.5]	3.7 [2.8; 4.0] 14.4 [14.1; 14.5]	3.0 [2.8; 3.7] н/о	5.1 [4.9; 5.3] 17.4 [16.3; 17.9]
$C_{18:1}$	н/о 18.8 [18.1; 19.5]	н/о 19.0 [17.9; 19.7]	н/о 18.3 [17.7; 18.6]	н/о н/о	н/о 18.8 [18.5; 19.3]
$C_{18:2}$	2.0 [1.4; 2.6] 16.9 [16.4; 17.4]	14.2 [13.4; 15.0] 10.4 [9.7; 11.1]	1.5 [1.1; 1.7] 10.2 [9.5; 10.9]	10.5 [10.0; 10.8] 26.2 [25.6; 26.4]	н/о 6.9 [6.8; 7.6]
$C_{18:3}$	48.3 [47.2; 49.7] н/о	8.7 [8.6; 8.8] н/о	40.7 [39.5; 41.7] н/о	25.7 [25.5; 25.9] н/о	30.6 [30.4; 31.8] н/о
Σ	89.9 [88.5; 91.4] 84.6 [83.1; 84.9]	78.8 [78.3; 80.5] 79.0 [77.6; 79.8]	81.0 [79.5; 81.3] 85.4 [83.7; 86.2]	84.8 [83.5; 85.0] 98.7 [97.8; 98.9]	68.4 [66.7; 69.3] 82.4 [80.0; 83.4]
NO ₃ -варианты					
$C_{16:0}$	25.5 [24.7; 26.1] 24.5 [23.8; 24.9]	31.3 [30.3; 31.6] 25.6 [24.2; 26.1]	32.1 [31.4; 32.6] 27.6 [27.0; 28.3]	28.7 [28.1; 29.5] 10.9 [10.3; 11.2]	32.6 [31.5; 33.4] 44.1 [43.5; 45.1]
$C_{18:0}$	11.5 [10.8; 11.9] 8.5 [8.3; 8.9]	14.7 [14.2; 15.3] 4.7 [4.4; 4.8]	10.4 [10.0; 10.6] 8.3 [7.7; 8.6]	11.3 [10.8; 11.6] 3.6 [3.5; 3.9]	14.4 [13.5; 14.7] н/о
$C_{16:1}$	3.3 [2.9; 3.6] 10.4 [9.4; 10.9]	3.1 [2.7; 3.2] 13.3 [12.6; 13.8]	2.3 [2.2; 2.5] 8.7 [8.0; 9.4]	2.6 [2.4; 2.7] 5.0 [4.5; 5.3]	1.9 [1.8; 2.1] н/о

Таблица 1. Окончание

ЖК	ИУК, мкг/мл				
	0	5	25	50	100
$C_{18:1}$	н/о 20.0 [18.9; 21.1]	н/о 5.6 [4.9; 6.1]	н/о 30.5 [29.9; 31.5]	н/о 17.8 [17.1; 18.9]	н/о 38.2 [37.7; 39.1]
$C_{18:2}$	2.2 [1.7; 2.6] 16.3 [15.9; 17.1]	16.7 [16.3; 17.1] 15.9 [15.0; 16.3]	21.3 [20.8; 22.2] 9.5 [9.1; 10.6]	10.6 [10.3; 11.1] 11.1 [10.6; 11.2]	18.9 [18.4; 19.7] 7.0 [6.3; 7.5]
$C_{18:3}$	44.8 [44.4; 45.8] н/о	13.3 [12.5; 13.9] н/о	15.5 [15.3; 15.9] н/о	24.4 [23.4; 24.9] н/о	н/о 2.8 [1.7; 2.9]
Σ	87.3 [86.1; 88.4] 79.7 [78.0; 81.2]	79.1 [77.1; 80.0] 65.1 [62.3; 65.9]	81.7 [80.3; 83.2] 84.5 [83.1; 87.0]	77.6 [76.1; 78.7] 48.4 [47.2; 49.3]	67.8 [66.8; 68.3] 92.1 [90.6; 93.2]

Примечание. В верхней строчке указаны ЖК листьев, в нижней — ЖК корней; н/о — отсутствие ЖК; $C_{16:0}$ — пальмитиновая, $C_{18:0}$ — стеариновая, $C_{16:1}$ — пальмитолеиновая кислота; $C_{18:1}$ — олеиновая кислота; $C_{18:2}$ — линолевая кислота; $C_{18:3}$ — α -линоленовая.

пальмитолеиновой и олеиновой кислот составило в N-дефицитных вариантах 38.7% и снижается в NO_3^- -вариантах до 30.4%. Содержание диеновой линолевой кислоты в корнях контрольных образцов при отсутствии и наличии минерального азота практически не различается и соответствует 16.9 и 16.3% (табл. 1).

Соотношение насыщенных и ненасыщенных ЖК изменялось при внесении разных концентраций ИУК (табл. 1). Если в контрольных образцах суммарное содержание полиеновых линолевой и α -линоленовой кислот в листьях в N-дефицитных/ NO_3^- -вариантах составляло 50.3/47.0%, то при концентрации ИУК 5 мкг/мл происходило резкое снижение до 22.9/30.0%. При концентрации ИУК 25 мкг/мл происходило увеличение суммарного содержания этих ЖК в листьях в N-дефицитных/ NO_3^- -вариантах до 42.2/36.8%. Примечательно, что если в отсутствие минерального азота это увеличение происходило в основном за счет возрастания α -линоленовой кислоты до 40.7%, то в присутствии нитратов доли линолевой и α -линоленовой кислоты соответствовали 21.3 и 15.5% (табл.1). В корнях в N-дефицитных и NO_3^- -вариантах при концентрации 5–50 мкг/мл ИУК происходило снижение содержания пальмитолеиновой кислоты. Известно, что обычно в клеточных мембранах при разных видах стресса увеличивается процентное содержание ненасы-

щенных ЖК, что делает мембрану более текучей. Исключение составляет солевой стресс, при котором защитные механизмы связаны с увеличением процентного содержания насыщенных ЖК [1]. Более жесткая мембранная структура значительно эффективнее препятствует проникновению солей внутрь клетки [29]. Увеличение суммы насыщенных ЖК в липидах вакуолярной мембраны и понижение показателя ИДС ранее уже были отмечены при окислительном стрессе [1]. Отмеченные изменения жирнокислотного состава, вызванные повышением концентрации ИУК, вероятно приводят к запуску биосинтеза ЖКОДЦ и других метаболитов липидного обмена. ЖКОДЦ, образующиеся в растениях, являются компонентами или предшественниками многочисленных специализированных метаболитов, синтезируемых в отдельных типах клеток [8]. Следует отметить, что к настоящему времени выявлена существенная роль длинноцепочечных жирных кислот в росте и развитии растений, например, показано их участие в контроле клеточного деления [30]. Установлено, что ткани морфогенных каллусов пшеницы имеют более высокое относительное содержание длинноцепочечных жирных кислот (6.8%) по сравнению с неморфогенными (4.4%) и колеоптилями (4.9%). Большая часть этих кислот в каллусах пшеницы сосредоточена во фракции нейтральных липидов. При этом выявлена только одна мононенасыщенная кислота —

Таблица 2. Состав ЖКОДЦ из суммарных липидов вегетативных органов яровой пшеницы при абиотических стрессах, % от суммы всех ЖК

ЖК	ИУК, мкг/мл				
	0	5	25	50	100
N-дефицитные варианты					
C _{20:0}	н/о	н/о	н/о	1.1 [1.0; 1.2]	н/о
	н/о	н/о	н/о	н/о	1.5 [1.4; 1.6]
C _{22:0}	н/о	1.2 [0.7; 1.7]	1.9 [1.6; 2.0]	3.0 [2.7; 3.3]	1.6 [1.5; 1.7]
	н/о	0.6 [0.5; 0.7]	1.6 [1.2; 2.0]	н/о	2.1 [2.0; 2.2]
C _{24:0}	н/о	1.2 [1.1; 1.5]	н/о	н/о	н/о
	н/о	н/о	н/о	н/о	1.0 [0.8; 1.2]
C _{24:1}	н/о	н/о	2.1 [1.6; 2.6]	1.1 [1.0; 1.4]	н/о
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
C _{22:2}	1.7 [1.6; 1.8]	1.8 [1.5; 1.9]	3.4 [2.8; 3.6]	3.2 [2.6; 3.6]	1.5 [1.3; 1.8]
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
КН	ННЖК —	0.75 [0.47; 1.06]	2.90 [2.20; 3.88]	1.05 [0.80; 1.35]	0.92 [0.87; 1.06]
		НЖК	НЖК	—	НЖК
Σ ЖКОДЦ	1.7 [1.6; 1.8]	4.2 [3.7; 4.7]	7.4 [6.4; 7.8]	8.4 [8.1; 8.7]	3.1 [2.8; 3.5]
	н/о	0.6 [0.5; 0.7]	1.6 [1.2; 2.0]	н/о	4.6 [4.2; 5.0]
NO ₃ -варианты					
C _{20:0}	н/о	2.3 [2.0; 2.5]	1.3 [1.2; 1.4]	3.0 [2.4; 3.6]	4.8 [4.2; 5.1]
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
C _{22:0}	н/о	1.4 [1.3; 1.6]	0.6 [0.5; 0.7]	1.3 [1.1; 1.6]	3.4 [3.3; 3.9]
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
C _{22:2}	2.1 [2.0; 2.2]	2.8 [2.5; 3.2]	1.9 [1.7; 2.2]	1.8 [1.6; 2.2]	4.1 [3.5; 4.4]
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
КН	ННЖК	0.76 [0.69; 0.84]	1.00 [0.90; 1.16]	0.42 [0.40; 0.47]	0.50 [0.43; 0.52]
	—	—	—	—	—
Σ ЖКОДЦ	2.1 [2.0; 2.2]	6.5 [6.1; 7.0]	3.8 [3.6; 4.1]	6.1 [5.6; 6.9]	12.3 [11.6; 12.8]
	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Примечание. В верхней строчке указаны ЖК листьев, в нижней — ЖК корней; КН — коэффициент ненасыщенности ННЖК/НЖК; C_{20:0} — арахидовая; C_{22:0} — бегеновая; C_{24:0} — лигноцеридовая; C_{22:1} — эруковая, C_{24:1} — нервоновая, C_{22:2} — докозадиеновая.

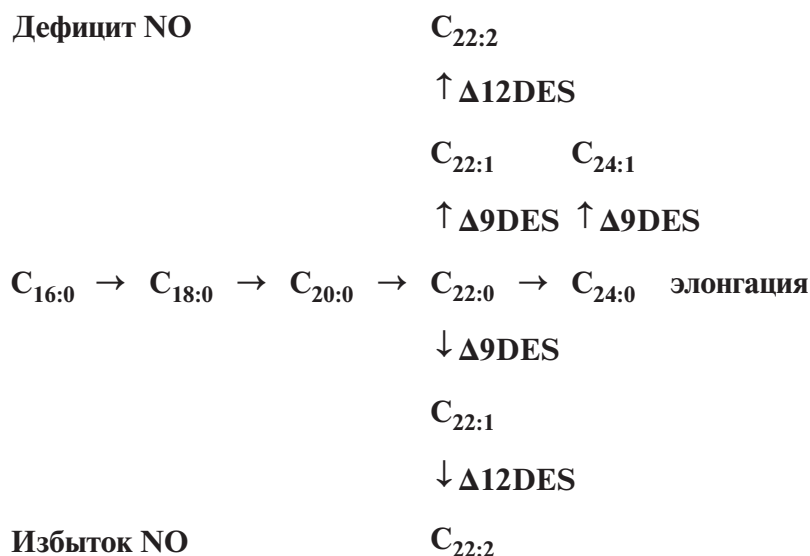


Рис. 1. Гипотетическая схема влияния уровня оксида азота (NO) на биосинтез ЖКОДЦ в вегетативных органах растений. $\Delta 9DES$ — $\Delta 9$ -десатурация; $\Delta 12DES$ — $\Delta 12$ -десатурация. Жирные кислоты: $C_{16:0}$ — пальмитиновая; $C_{18:0}$ — стеариновая; $C_{20:0}$ — арахидовая (эйкозеновая); $C_{22:0}$ — бегеновая (докозеновая); $C_{24:0}$ — лигноцереновая (тетракозеновая); $C_{22:1}$ — эруковая, $C_{24:1}$ — нервоновая, $C_{22:2}$ — докозодиеновая.

эйкозеновая ($C_{20:1}$), содержание которой повышается в тканях каллусов при формировании зон вторичной дифференцировки (от 0.2 до 1.7%) [31]. Представленные в табл. 2 данные показывают, что в контроле обоих вариантов в корнях отсутствовали ЖК с длинной цепи более 20 атомов углерода. Концентрация ЖКОДЦ в сумме ЖК липидов проростков пшеницы зависела не только от вегетативного органа (корень или лист), но и от уровня оксида азота. Примечательно, что в листьях контрольных проростков присутствовала только одна докозодиеновая кислота ($C_{22:2}$), концентрация которой в NO_3^- -вариантах была в 1.2 раза выше, чем в N-дефицитных вариантах. Насыщенные ЖКОДЦ ($C_{20:0}$, $C_{22:0}$, $C_{24:0}$), содержание которых возрастало (от 0.6 до 4.6) с увеличением концентрации ИУК (5–100 мкг/мл) были зафиксированы только в корнях проростков N-дефицитных вариантов. Ненасыщенные ЖКОДЦ в корнях проростков обоих вариантов не были обнаружены. На основании проведенных исследований предложена гипотетическая схема (рис. 1) влияния уровня оксида азота (NO) на биосинтез ЖКОДЦ в вегетативных органах растений. На схеме видно, что докозодиеновая ЖК ($C_{22:2}$) является конечным продуктом в биосинтезе ЖКОДЦ как при дефиците, так и при избытке оксида азота.

Выращивание растений в присутствии экзогенного ауксина вызывало изменения в активности ацил-липидных десатураз, степень изменения активности в большей степени зависела от вегетативного органа (табл. 3). Рассчитанные зна-

чения десатуразных SDR, ODR, LDR соотношений, характеризующих активность ацил-липидных $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\omega 3$ -десатураз, показали, что в опытных и контрольных вариантах наблюдалось отсутствие активности $\Delta 9$ -десатуразы в листьях и $\omega 3$ -десатуразы в корнях. Следует отметить, что величина олеатного десатуразного отношения в листьях проростков в контроле и опыте в N-дефицитных и NO_3^- -вариантах оставалась на одинаковом уровне (ODR = 1.0). Ранее было высказано предположение, что активность $\Delta 12$ -десатуразы может служить критерием устойчивости организма к воздействию стрессоров [2, 10]. Повышение концентрации экзогенного ИУК с 5 до 50 мкг/мл приводило к снижению активности $\Delta 12$ -десатуразы в корнях. При концентрации 100 мкг/мл ИУК в листьях и корнях было отмечено значительное снижение активности этой десатуразы как в N-дефицитном варианте (0.26), так и в NO_3^- -варианте (0.21). Из табл. 3 видно, что суммарная активность $\Delta 9$ -, $\Delta 12$ - и $\omega 3$ -десатураз (LDR + ODR + SDR) в корнях ниже, чем в листьях. Повышение концентрации экзогенного ауксина с 5 до 50 мкг/мл (табл. 3) приводит в основном к повышению суммарной активности десатураз в листьях. В NO_3^- -вариантах активность десатураз в листьях и корнях различается меньше, чем в N-дефицитных вариантах. Можно предположить, что нитраты в вегетативных органах растений через регуляцию концентрации ауксина в тканях контролируют активность ферментов липидного обмена (десатураз и элонгаз).

Таблица 3. Влияние ауксина на коэффициенты ненасыщенности жирных кислот (КН), индексы двойных связей (ИДС), стеарил-десатуразное (SDR), олеил-десатуразное (ODR) и линолеил-десатуразное (LDR) отношения в вегетативных органах яровой пшеницы

Орган	ИУК, мкг/мл	ΣSFA	ΣUFA	КН	ИДС	Десатуразные отношения			
						SDR	ODR	LDR	ΣSOL
N-дефицитные варианты									
Лист	0	42.94	57.06	1.33	1.57	—	1.0	0.96	1.96
Корень		44.44	55.56	1.25	0.72	—	0.47	—	0.47
Лист	5	70.37	29.63	0.42	0.63	—	1.0	0.38	1.38
Корень		54.47	45.53	0.84	0.56	0.72	0.36	—	1.08
Лист	25	48.60	51.40	1.06	1.38	—	1.0	0.96	1.96
Корень		57.18	42.82	0.75	0.53	0.70	0.36	—	1.06
Лист	50	56.63	43.37	0.77	1.08	—	1.0	0.71	1.71
Корень		73.78	26.22	0.36	0.52	—	—	—	—
Лист	100	62.75	37.25	0.60	1.00	—	—	—	—
Корень		56.91	43.09	0.76	0.50	0.71	0.26	—	0.98
NO ₃ -варианты									
Лист	0	47.62	52.38	1.10	1.46	—	1.0	0.95	1.95
Корень		53.29	46.71	0.88	0.63	0.7	0.45	—	1.15
Лист	5	64.12	35.88	0.56	0.82	—	1.0	0.44	1.44
Корень		65.24	34.76	0.53	0.51	0.55	0.74	—	1.29
Лист	25	59.07	40.93	0.70	0.95	—	1.0	0.42	1.42
Корень		51.39	48.61	0.95	0.58	0.79	0.24	—	1.23
Лист	50	60.51	39.49	0.65	1.01	—	1.0	0.70	1.70
Корень		66.20	33.80	0.51	0.45	0.83	0.43	—	1.26
Лист	100	75.19	24.81	0.33	0.48	—	0.20	—	0.20
Корень		51.97	48.03	0.92	0.61	—	0.21	—	0.21

Примечание. Σ SFA — сумма насыщенных ЖК, Σ UFA — сумма ненасыщенных ЖК, Σ SOL — сумма индексов десатуразных SDR, ODR, LDR соотношений; “—” — десатуразной активности не зафиксировано.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разных видах стрессового воздействия на клетки проростков пшеницы, согласованное функционирование мембранных систем и транспортных механизмов помогает не только поддерживать гомеостаз клеток, но и быстро реагировать на изменения внешней среды. Закономерности изменений в жирнокислотном составе мембран различных вегетативных органов проростков пшеницы при внесении экзогенного фитогормона ауксина имеют сходные черты, выявлено снижение содержания насыщенных и увеличение содержания ненасыщенных жирных кислот. Под воздействием экзогенного ауксина в листьях и корнях проростков происходит снижение индекса ненасыщенности жирных кислот. Распределение ненасыщенных ЖК в листьях и корнях значительно различается: в листьях доминируют полиеновые кислоты (линолевая, α -линоленовая),

а в корнях — моноеновые (олеиновая, пальмитолеиновая). При возрастании концентрации экзогенного ауксина до 100 мкг/мл, в клеточных мембранах одновременно происходит снижение суммарного содержания жирных кислот с длиной цепи 16 и 18 атомов углерода и увеличение концентрации жирных кислот с длиной цепи более 20 атомов углерода (ЖКОДЦ). Повышение уровня оксида азота (NO₃-варианты) влияет не только на полярное распределение ауксина, но и на повышение содержания ЖКОДЦ в листьях проростков пшеницы (до 12.3%). Наибольшая активность $\Delta 9$ - и $\Delta 12$ -десатураз при синтезе ненасыщенных ЖКОДЦ в листьях отмечена при 25 мкг/мл ИУК. Таким образом, можно сделать заключение о том, что оксид азота координирует распределение в вегетативных органах фитогормона ауксина, который контролирует активность десатураз и жирнокислотный состав клеточных мембран рас-

тений. Вероятно, что биосинтез докозодиеновой кислоты ($C_{22:2}$) в листьях является одним из ключевых этапов в формировании адаптивного ответа клеточных мембран на воздействие абиотических стрессов при онтогенезе растений.

Благодарности. Автор признательна сотрудникам аналитической лаборатории ИЭГМ УрО РАН В.А. Гусеву, Н.П. Шерстобитовой, М.А. Шишкину за идентификацию метиловых эфиров жирных кислот.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания (№ госрегистрации темы НИОКТР АААА-А19-119112290008-4) с использованием оборудования ЦКП “Исследование материалов и веществ” ПФИЦ УрО РАН (г. Пермь).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Озолина Н.В., Гурина В.В., Нестеркина И.С., Дударева Л.В., Катышев А.И., Нурминский В.Н. 2017. Жирнокислотный состав общих липидов вакуолярной мембраны при абиотическом стрессе. *Биол. мембраны*. **34** (1), 63–69.
2. Дёмин И.Н., Нарайкина Н.В., Цыдендамбаев В.Д., Мошков И.Е., Трунова Т.И. 2008. Введение гена *desA* $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы цианобактерий повышают устойчивость растений картофеля к окислительному стрессу, вызванному гипотермией. *Физиол. растений*. **55** (5), 710–720.
3. Макаренко С.П., Дударева Л.В., Катышев А.И., Коненкина Т.А., Назарова А.В., Рудиковская Е.Г., Соколова Н.А., Черникова В.В., Константинов Ю.М. 2010. Влияние низких температур на жирнокислотный состав контрастных по холодоустойчивости видов злаков. *Биол. мембраны*. **27** (6), 482–488.
4. Zemanova V., Pavlik M., Kyjakova P., Pavlikova D. 2015. Fatty acid profiles of ecotypes of hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* growing under cadmium stress. *J. Plant Physiol.* **180**, 27–34.
5. Dat J., Vandenabeele S., Vranjva E., van Montagu M., Inze D., van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol. Life Sci.* **57**, 779–795.
6. He M., Ding N.-Z. 2020. Plant unsaturated fatty acids: Multiple roles in stress response. *Front. Plant Sci.* **11**, 562785.
7. Лось Д.А. 2014. Десатуразы жирных кислот. М.: Научный мир, 372 с.
8. Берестовой М.А., Павленко О.С., Голденкова-Павлова И.В. 2019. Десатуразы жирных кислот растений: роль в жизнедеятельности растений и биотехнологический потенциал. *Успехи соврем. биологии*. **139** (4), 338–351.
9. Лось Д.А. 1997. Десатуразы жирных кислот: адаптивная экспрессия и принципы регуляции. *Физиол. растений*. **44** (4), 528–540.
10. Нарайкина Н.В., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д., Трунова Т.И. 2020. Изменения в жирнокислотном составе и в содержании липидов листьев картофеля при низкотемпературном закаливании: роль $\Delta 12$ -ацил-липидной десатуразы. *Физиол. растений*. **67** (2), 149–156.
11. Corpas F.J., del Río L.A., Barroso J.B. 2007. Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *Trends in Plant Science*. **12**, 436–438.
12. Gupta K.J., Mur L.A.J., Wany A., Kumari A., Fernie A.R., Ratcliffe R.G. 2020. The role of nitrite and nitric oxide under low oxygen conditions in plants. *New Phytologist*. **225** (3), 1143–1151.
13. Gupta K.J., Hancock J.T., Petrivalsky M., Kolbert Z., Lindermayr C., Durner J., Barroso J.B., Palma J.M., Brouquisse R., Wendehenne D., Corpas F.J., Loake G.J. 2020. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. *New Phytologist*. **225** (5), 1828–1834.
14. Hancock J.T., Veal D. 2021. Nitric oxide, other reactive signalling compounds, redox, and reductive stress. *J. Experim. Botany*. **72**(3), 819–829.
15. Викторова Л.В., Максюткова Н.Н., Трифонова Т.В., Андрианов В.В. 2010. Образование пероксида водорода и оксида азота при введении нитрата и нитрита в апопласт листьев пшеницы. *Биохимия*. **75** (1), 117–124.
16. Никерова К.М., Галибина Н.А. 2017. Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin). *Сибирский лесной журнал*. **1**, 15–24.
17. Freschi L. 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: Current status and perspectives. *Front. Plant Sci.* **4**, 398.
18. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б. Мишарина Т.А., Теренина М.Б., Крикунова Н.И., Генерозова И.П., Шугаев А.Г., Фаттохов С.Г. 2013. Жирнокислотный состав липидов мембран и энергетика митохондрий проростков гороха в условиях дефицита воды. *Физиол. растений*. **60** (2), 205–213.
19. Жуков А.В. 2018. Жирные кислоты с очень длинной цепью в составе мембранных липидов растений. *Физиол. растений*. **65** (6), 418–437.
20. Попов В.Н., Антипина О.В., Пчелкин В.П., Цыдендамбаев В.Д. 2012. Изменения содержания и жирнокислотного состава липидов листьев и корней табака при низкотемпературном закаливании. *Физиол. растений*. **59** (2), 203–208.
21. Макаренко С.П., Коненкина Т.А., Хотимченко С.В. 2007. Жирнокислотный состав липидов вакуолярных мембран корнеплодов. *Физиол. растений*. **54** (2), 223–228.
22. Zheng H., Rowland O., Kunst L. 2005. Disruptions of the *Arabidopsis* *Enoil-CoA* reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *Plant Cell*. **17** (5), 1467–1481.

23. Roudier F., Gissot L., Beaudoin F., Haslam R., Michaelsen L., Marion J., Molino D., Lima A., Bach L., Morin H., Tellier F., Palauqui J.-C., Bellec Y., Renne C., Miquel M., DaCosta M., Vignard J., Rochat C., Markham J.E., Moreau P., Napier J., Faure J.-D. 2010. Very-long-chain fatty acids involved in polar auxin transport and developmental patterning in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. **22** (2), 364–375.
24. Petrášek J., Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development*. **136** (16), 2675–2688.
25. Krouk G. 2016. Hormones and nitrate: A two-way connection. *Plant Mol. Biol.* **91** (6), 599–606.
26. Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н., Котова И.Б., Семенова Е.В., Татаринова Н.Ю., Уголькова Н.В., Цавкелова Е.А., Бобкова А.Ф., Богданов А.Г., Данилова И.В., Динареева Т.Ю., Зинченко В.В., Исмаилов А.Д., Кураков А.В., Максимов В.Н., Милько Е.С., Никитина Е.П., Рыжкова Е.П., Семенов А.М., Хомякова Д.В., Чердынцева Т.А., Юдина Т.Г. 2005. Практикум по микробиологии. М.: Издательский центр “Академия”, 608 с.
27. Dobson G., Christie W.W. 2002. Mass spectrometry of fatty acid derivatives. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* **104**, 36–43.
28. Christie W.W. 1988. Equivalent chain lengths of methyl ester derivatives of fatty acids on gas chromatography: A reappraisal. *J. Chromatogr.* **447**, 305–314.
29. Wu J., Seliskar D., Gallagher J. 2005. The response of plasma membrane lipid composition in callus of the halophyte *Spartina patens* (Poaceae) to salinity stress. *Am. J. Bot.* **92** (5), 852–858.
30. Nobusawa T., Umeda M. 2012. Very-long-chain fatty acids have an essential role in plastid division by controlling Z-ring formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Cells*. **17** (8), 709–719.
31. Дударева Л.В., Рудиковская Е.Г., Ланкевич С.В. 2016. Липидный и жирнокислотный состав морфогенных и неморфогенных каллусов пшеницы *Triticum aestivum* L. *Биол. мембраны*. **33** (2), 133–139.

Effect of Auxin on Fatty Acid Composition and Activity of Acyl-Lipid Desaturases in Sprouts of Spring Wheat *Triticum aestivum* L.

N. P. Kovalevskaya*

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, 614081 Russia

*e-mail: nina_kov@mail.ru

The effect of exogenous auxin on the fatty acid composition of total lipids in leaves and roots of spring wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.) was studied. It has been established that the diversity of fatty acids in vegetative organs (leaf or root) depends not only on the concentration of auxin, but also on the nitric oxide donor (N_2 , NO_3). It was noted that increasing the concentration of exogenous auxin increased microviscosity and decreased the permeability of the membranes of the vegetative organ in wheat, which was accompanied by a decrease in the double bond index. At the same time, there is an increase in the concentration of saturated fatty acids (palmitic and stearic), which are used as precursors for the formation of fatty acids with a very long chain (VLCFA). It was shown that exogenous auxin leads to an increase in the total content of VLCFAs in leaves with a deficiency (8.4%) and an excess of NO donors (12.3%). The introduction of exogenous auxin eliminates significant differences in the activity of desaturases in wheat roots at different levels of nitric oxide donors. It is suggested that the biosynthesis of docosadienoic acid ($C_{22:2}$) in leaves is one of the key stages in the formation of an adaptive response of cell membranes to abiotic stresses during plant ontogenesis. An increase in the level of NO promotes the movement of auxin from roots to shoots, which can serve as a regulator of the activity of elongases and desaturases during the synthesis of VLCFAs.

Keywords: *Triticum aestivum* L., fatty acids, desaturase, auxin, nitric oxide