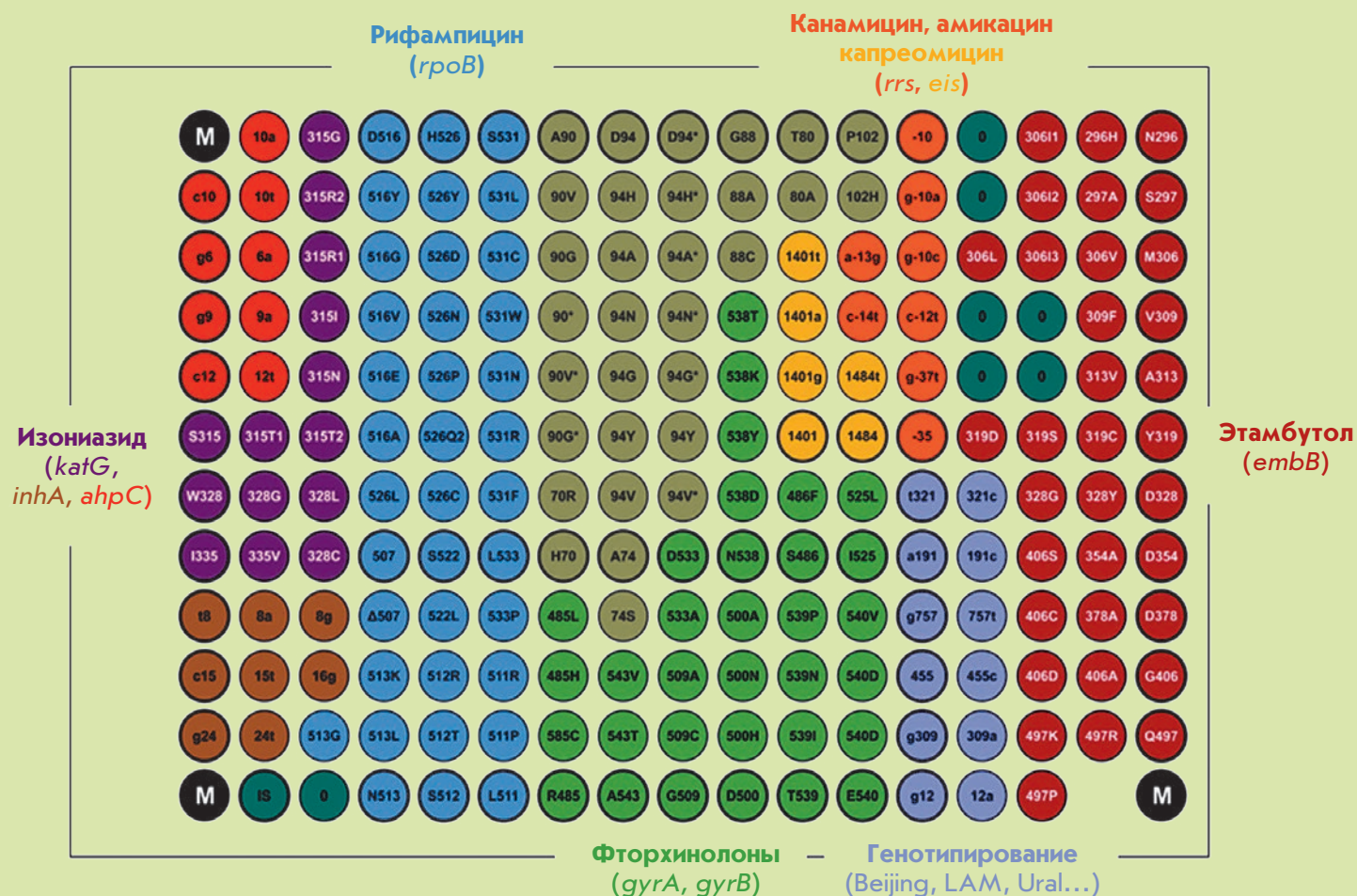


Acta Naturae

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя



БЕЛОК CG9890 С ДОМЕНАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ENY2-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЗОФИЛЫ
СТР. 110

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКОМ AIF
СТР. 100

MERCK

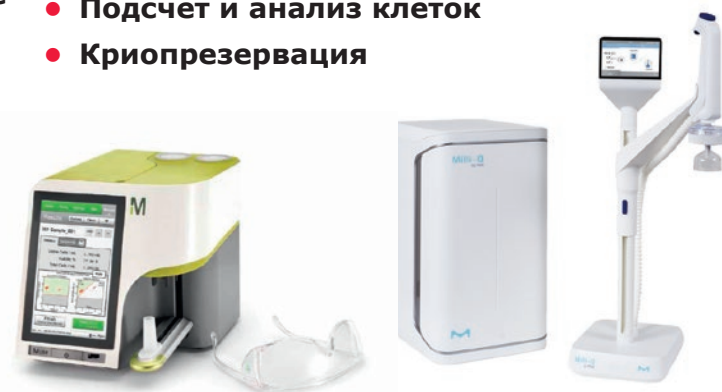
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация



- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):

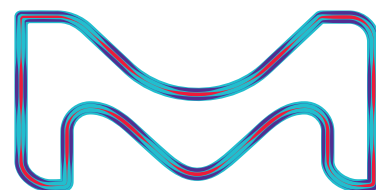
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com, ruorder@sial.com

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

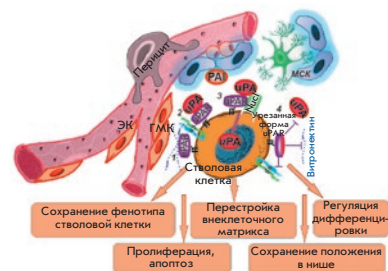


SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

Роль урокиназной системы в многоуровневой регуляции ниш стволовых клеток

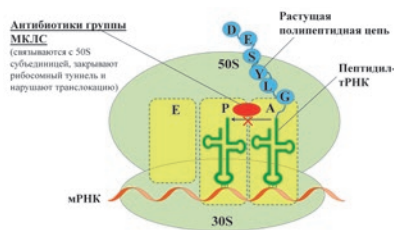
К. В. Дергилев, В. В. Степанова, И. Б. Белоглазова, З. И. Цоколаева, Е. В. Парфенова

Одной из важнейших протеолитических систем, участвующих в регуляции клеточной миграции и пролиферации, является урокиназная система, представленная урокиназным активатором плазминогена (uPA, урокиназа), его рецептором (uPAR) и ингибиторами. В обзоре рассмотрены данные об участии урокиназной системы в регуляции состояния ниш стволовых клеток в различных тканях, проанализированы возможные способы влияния этой системы на сигнальные пути, ответственные за пролиферацию, программируемую клеточную гибель, модуляцию фенотипа и миграционных свойств стволовых клеток.



Урокиназная система модулирует состояние стволовых клеток в «клеточных нишах»

Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам



Взаимодействие антибиотиков группы МКЛС с рибосомой и их влияние на синтез белка

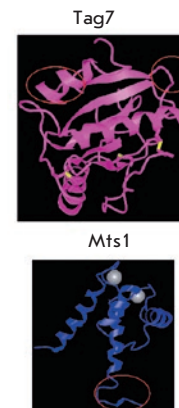
А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова

Резистентность к антибиотикам развивается уже более 2 млрд лет и широко распространена среди микроорганизмов. Основные механизмы развития резистентности связаны с эволюцией суперсемейств бактериальных ферментов, обусловленной изменчивостью кодирующих их генов, совокупность которых получила название «резистом». Десятки тысяч ферментов и их мутантов, реализующих различные механизмы резистентности, образуют новое сообщество, названное «энзистом». Анализ структуры и функциональных особенностей ферментов – мишеней разных классов антибиотиков, позволит выработать новые стратегии преодоления резистентности.

Комплекс Tag7–Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов, взаимодействуя с рецепторами CCR5 и CXCR3

Т. Н. Шарапова, Е. А. Романова, Л. П. Сащенко, Д. В. Яшин

Обнаружение новых хемокинов, индуцирующих миграцию лимфоцитов к очагу поражения, важно для направленного поиска средств для иммунотерапии. В работе изучена миграция мононуклеарных клеток периферической крови человека под действием комплекса Tag7–Mts1. Установлено, что движение мононуклеарных клеток периферической крови по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1 индуцируется классическими хемотаксическими рецепторами CCR5 и CXCR3. Комплекс Tag7–Mts1 можно рассматривать как новый лиганд классических хемотаксических рецепторов CCR5 и CXCR3.



Пространственные структуры белков Tag7 и Mts1

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректура: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

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

© ACTA NATURAE, 2018

Номер подписан в печать 27 декабря 2018 г.

Тираж 300 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии «МИГ ПРИНТ»

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

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

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.00

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Д. А. Грядунов, Б. Л. Шаскольский, Т. В. Наседкина,
А. Ю. Рубина, А. С. Заседателей

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН:
30 лет спустя 4

К. В. Дергилев, В. В. Степанова, И. Б. Белоглазова,
З. И. Цоколаева, Е. В. Парфенова

Роль урокиназной системы в многоуровневой
регуляции ниш стволовых клеток 19

А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова

Бактериальные ферменты и резистентность
к антибиотикам 33

М. В. Калякин, А. П. Серегин, А. Е. Соловченко,
П. А. Каменский, В. А. Садовничий

Проект «Ноев ковчег»: промежуточные
итоги и перспективы развития классических
коллекций 49

В. И. Скворцова, С. О. Бачурин, А. А. Устюгов,
М. С. Кухарский, А. В. Дейкин, В. Л. Бухман,
Н. Н. Нинкина

Перспективы использования гамма-карболинов
для разработки патогенетической
терапии протеинопатий 59

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- И. В. Гордейчук, А. И. Тухватулин, С. П. Петков, М. А. Абакумов, С. А. Гуляев, Н. М. Тухватулина, Т. В. Гуляева, М. И. Михайлов, Д. Ю. Логунов, М. Г. Исагулянц
Определение параметров адаптивного клеточного иммунитета у обыкновенных мармозет (*Callithrix jacchus*) 63
- М. В. Игotti, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов
Сверхэкспрессия аденовирусного E1A сенсibiliзирует клетки, трансформированные E1A+Ras, к действию ингибиторов гистоновых деацетилаз 70
- М. С. Козин, О. Г. Кулакова, И. С. Киселёв, О. П. Балановский, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова
Варианты митохондриального генома и риск развития рассеянного склероза у русских 79
- Е. О. Кузичкина, О. Н. Шилова, С. М. Деев
Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2 87
- А. А. Никонова, А. В. Пичугин, М. М. Чулкина, Е. С. Лебедева, А. Р. Гайсина, И. П. Шиповский, Р. И. Атауллаханов, М. Р. Хаитов, Р. М. Хаитов
Иммуномакс — агонист TLR4 — влияет на фенотип легочных макрофагов при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей 95
- Н. П. Фадеева, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, К. С. Ануфриева, Г. А. Степанов, С. Бастола, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков
Определение белков наружной мембраны митохондрий, взаимодействующих с белком AIF 100
- Н. А. Фурсова, Ю. В. Николенко, Н. В. Сошникова, М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева, А. Н. Краснов
Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев — новый компонент ENY2-содержащих комплексов дрозофилы 110

Т. Н. Шаропова, Е. А. Романова, Л. П. Сащенко, Д. В. Яшин

- Комплекс Tag7—Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов, взаимодействуя с рецепторами CCR5 и CXCR3** 115

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А. С. Злобин, А. О. Залевский, Ю. А. Мокрушина, О. В. Карцева, А. В. Головин, И. В. Смирнов

- Предпочтительная конформация связывания канонических субстратов бутирилхолинэстеразы непродуктивна для экзитофата** 121

В. А. Паликов, С. С. Терехов, Ю. А. Паликова, О. Н. Хохлова, В. А. Казаков, И. А. Дьяченко, С. В. Пантелеев, Ю. А. Мокрушина, В. Д. Кнорре, О. Г. Шамборант, И. В. Смирнов, А. Г. Габиров

- Мышиная модель для оценки субхронической токсичности фосфорорганических пестицидов** 125

А. Mathlouthi, E. Pennacchietti, D. De Biase

- Effect of Temperature, pH and Plasmids on *In Vitro* Biofilm Formation in *Escherichia coli*** 129

- Правила для авторов** 133

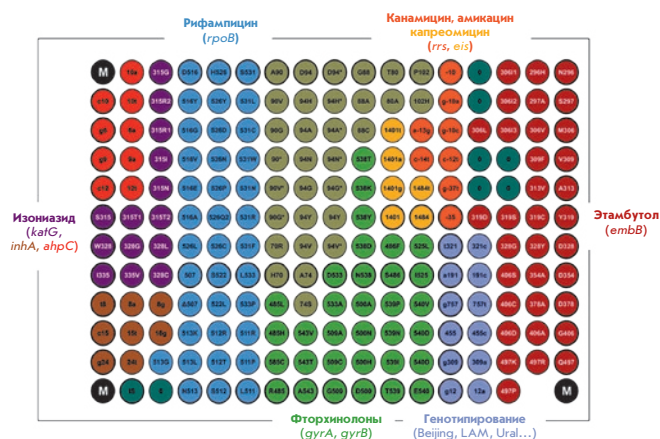


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
 (см. статью Грядунова и др.)

УДК 577.21; 57.088.7

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя

Д. А. Грядунов*, Б. Л. Шаскольский, Т. В. Наседкина, А. Ю. Рубина, А. С. Заседателев

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: grad@biochip.ru

Поступила в редакцию 13.09.2018

Принята к печати 24.09.2018

РЕФЕРАТ Биологические микрочипы являются аналитическим инструментом, позволяющим реализовать в доступной форме сложные интегративные подходы геномики и протеомики, решать задачи персонализированной медицины – проводить обследование пациента для выявления заболевания задолго до проявлений клинических симптомов, прогнозировать тяжесть протекания патологических и инфекционных процессов, выбирать эффективные и рациональные режимы терапии. Эффективность биочипов обусловлена возможностью параллельного проведения множества специфических реакций и исследования взаимодействий молекул биополимеров, таких, как ДНК, белки, гликаны. Одним из пионеров технологии биологических микрочипов стал Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), предложив иммобилизацию молекулярных зондов в трехмерной структуре гидрофильного геля. С момента первых экспериментов по секвенированию с помощью гибридизации на олигонуклеотидных микроматрицах, проведенных 30 лет назад, гидрогелевые биочипы ИМБ РАН прошли долгий и успешный путь от фундаментальных исследований до клинической лабораторной диагностики. Настоящий обзор посвящен обсуждению ключевых аспектов технологии гидрогелевых биочипов и ряду актуальных приложений к мультиплексному анализу ДНК и белковых биомаркеров социально значимых заболеваний, включая молекулярно-генетические, иммунологические и эпидемиологические аспекты патогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гидрогелевые биочипы, гибридизация нуклеиновых кислот, генотипирование, лекарственная устойчивость микроорганизмов, мультиплексный иммуноанализ, онкомаркеры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НК – нуклеиновые кислоты; МТВ – возбудитель туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*; NTM – non-tuberculous mycobacteria, возбудители микобактериозов; ВГС – вирус гепатита С; РМР – рифампицин; ИН – изониазид; ЭМВ – этамбутол; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость; ИРТ – инфекции репродуктивного тракта; АМП – антимикробные препараты; КРР – колоректальный рак; РЭА – раково-эмбриональный антиген; СА – карбогидратный антиген.

ВВЕДЕНИЕ

В последнее десятилетие накоплено большое количество знаний о молекулярных механизмах биохимических процессов, лежащих в основе функционирования живых систем и позволяющих оценивать вероятность возникновения заболевания до проявления у пациента клинических симптомов, прогнозировать тяжесть протекания патологических или инфекционных процессов, выбирать эффективные и рациональные режимы терапии. Решение задач персонализированной медицины должно включать как масштабный анализ нуклеотидных последовательностей геномов, так и мультиплексные методы количественного определения маркеров патологических состояний.

Для одновременного количественного определения последовательностей нуклеиновых кислот (НК) разработано немало методов и технологий, одной из которых, успешно зарекомендовавшей себя в транскрипционном профилировании, сравнительной

геномной гибридизации, при одновременной идентификации множества мишеней в геномах человека, растений, микроорганизмов и вирусов, является технология биологических микрочипов (биочипов) [1]. Ключевой элемент биочипа – матрица ячеек, каждая из которых содержит зонд, последовательность которого специфична к фрагменту анализируемого генома. Одновременно проводимые в каждом из элементов биочипа реакции гибридизации и/или амплификации НК обеспечивают параллельную идентификацию разных геномных мишеней, тем самым реализуя принцип многопараметрического анализа биологического образца, что позволяет использовать ДНК-чипы в качестве эффективного молекулярного инструмента выявления клинически значимых маркеров возбудителей и причин социально значимых заболеваний.

Биочипы могут также содержать ячейки с иммобилизованными белками или олигосахаридами,

причем в каждой отдельной ячейке может быть иммобилизован как индивидуальный зонд, так и их комбинации в зависимости от целей эксперимента. Взаимодействие между различными классами молекул может происходить по типу «рецептор–лиганд», «антиген–антитело», «фермент–субстрат» и т.д. Иммобилизованный лиганд при инкубации с образцом, содержащим анализируемые молекулы, образует специфический комплекс. На этой стадии происходит разделение анализируемых соединений из смеси по их способности к специфическому связыванию с иммобилизованными лигандами, что позволяет анализировать одновременно несколько биологических объектов на одном биочипе, реализуя принцип мультиплексного иммуноанализа. Такой тест необходим для исследований в области протеомики, для диагностики заболеваний, характеризующихся изменением большого числа показателей в сыворотке крови пациента.

КЛЮЧЕВЫЕ АСПЕКТЫ АНАЛИЗА НА БИОЧИПАХ

В основе проведения анализа на ДНК-микрочипах лежит гибридизация НК. Преимуществами гибридизации являются простота, мультиплексность и воспроизводимость. В отличие от ферментативных реакций, гибридизацию можно проводить в широком диапазоне температур и композиций буферов. В то же время гибридизация не обеспечивает непосредственной амплификации НК и должна сочетаться с технологиями усиления сигналов либо с высокочувствительными инструментами для регистрации дуплексов НК. Поэтому микрочипы используют для прямой количественной детекции РНК, выделенной из больших объемов образца, или для регистрации гибридизационных комплексов, образованных иммобилизованными зондами и фрагментами НК, полученными на предварительной стадии амплификации. Таким образом, чувствительность анализа на ДНК-чипах определяется исходным количеством НК, эффективностью амплификации и способом регистрации комплексов. В случае наиболее распространенной флуоресцентной детекции взаимодействий в элементах биочипа чувствительность метода зависит от анализатора флуоресценции.

Теоретически ДНК-чипы должны обеспечивать количественное определение НК [2]. Реальные эксперименты показывают значительные количественные отклонения при оценке экспрессии генов разными платформами микрочипов и даже разными микрочипами одного и того же производителя [3]. Во-первых, кинетика гибридизации нелинейно определяется плотностью зондов на поверхности матрицы, поскольку олигонуклеотиды, иммобилизованные или синтезированные на подложках чипов высокой

плотности, неспецифично гибридизуются друг с другом в зависимости от степени гомологии. Во-вторых, на кинетику гибридизации влияют длина и нуклеотидная последовательность целевых молекул ДНК. В-третьих, квантовый выход используемого для регистрации флуорофора зависит как от последовательности прилегающей НК, так и от близости других флуорофоров. В связи с этим экспрессионные микрочипы чаще используются для воспроизводимого анализа относительного содержания НК, чем для точного определения концентрации [4].

Один из ключевых параметров, характеризующих микрочипы – тип субстрата матрицы, – подложки с гидрогелевым покрытием, например, из полиакриламида или агарозы, а также матрицы с функциональными группами, такими, как альдегиды, эпокси- или аминогруппы и др. [5]. В силу гидрофильных свойств полимерные гидрогели являются приоритетным субстратом для иммобилизации биомолекул. Традиционным подходом к изготовлению микрочипов считается покрытие подложки однородным слоем гидрогеля с последующим нанесением зондов либо синтезом олигонуклеотидов *in situ*. В качестве сшивающих агентов для формирования гидрогелевых подложек используют как синтетические поли-2-гидроксиэтилметакрилат, полиакриламиды, так и несинтетический полимер коллаген [6]. В результате емкость иммобилизации зондов на биочипах возрастает на несколько порядков [7], что позволяет регистрировать сигналы в элементах чипа, в 10–100 раз превышающие сигналы при иммобилизации на планарных матрицах.

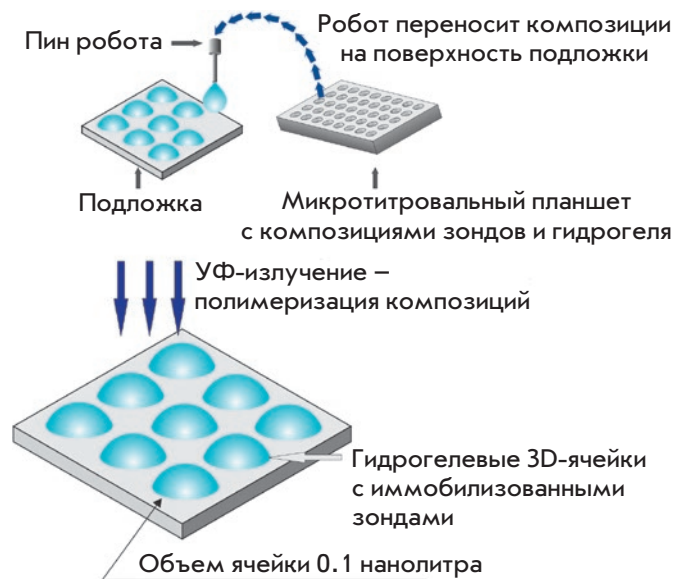


Рис. 1. Создание матрицы 3D-элементов, содержащих композиции гидрогеля и молекулярных зондов

Принципиальное отличие технологии биочипов, созданной в ИМБ РАН под руководством академика Андрея Дарьевича Мирзабекова (1937–2003), – иммобилизация молекулярных зондов в трехмерных элементах гидрогеля, закрепленных на плоской подложке [8, 9]. Молекулярные зонды – олигонуклеотиды и олигосахариды – модифицируют посредством присоединения amino- или сульфогрупп, используемых далее для ковалентного присоединения в ходе роста полимерной цепи. В то же время зонды белковой природы не нуждаются в специальной модификации, поскольку имеют в своей структуре соответствующие функциональные группы аминокислот. Макропористая структура гидрогелевых элементов формируется за счет сополимеризации мономера – производного метакриловой кислоты, непредельного производного O- или N-замещенного сахара, бифункционального кросс-сшивающего агента и молекулярного зонда. Композиции полимеризационной смеси объемом 0.1 нл наносят на подложку с помощью пинов механического робота (рис. 1). В качестве подложки могут использоваться практически любые носители. Далее под действием ультрафиолетового

излучения происходит совместная полимеризация молекулярных зондов с основными компонентами гидрогеля и равномерное встраивание иммобилизуемых соединений в растущую полимерную структуру. Необходимо отметить, что подобраны условия полимеризации молекулярных зондов, позволяющие максимально сохранить их исходную биологическую активность. По завершении полимеризации ячейки гидрогеля, сформировавшиеся на подложке, отмывают и подготавливают к проведению исследований. Эффективность такой иммобилизации составляет 50–80% в зависимости от молекулярного зонда.

В зависимости от типа биочипа диаметры гелевых ячеек варьируют от 50 до 300 мкм, а расстояния между ячейками – от 100 до 500 мкм. Количество ячеек на биочипе зависит от задачи и составляет от нескольких десятков до нескольких тысяч. Контроль качества нанесения осуществляется посредством специализированного аппаратно-программного комплекса. Биочипы с отклонением геометрических параметров элементов, не превышающим 10%, а также с отклонениями параметров чипов между сериями, составляющими не более 20%, используют в дальней-

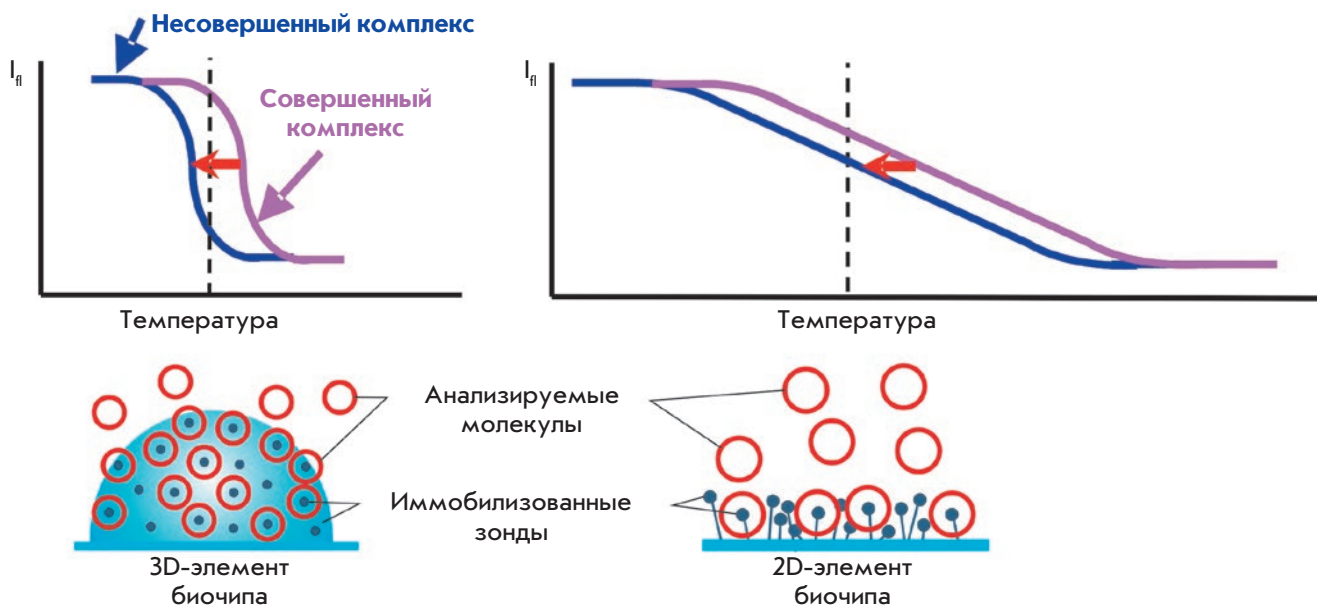


Рис. 2. Преимущества объемных гидрогелевых 3D-ячеек биочипов в сравнении с поверхностными 2D-ячейками. Образовавшиеся в 3D-элементах молекулярные комплексы, равномерно распределенные по объему, находятся в однородном водно-подобном окружении гидрогеля и обладают одинаковой энергией образования. Диссоциация таких комплексов происходит в узком интервале температур и всегда можно подобрать такую температуру, при которой совершенный комплекс стабилен, в то время как несовершенный комплекс будет в существенной степени диссоциирован. Поэтому в случае 3D-ячеек совершенные комплексы можно регистрировать по сигналам, в разы превышающим сигналы несовершенных комплексов. В 2D-элементах на энергию образования комплексов накладываются различные по величине энергии взаимодействия комплексов с поверхностью подложки. В результате кривые диссоциации комплексов оказываются более пологими и температурный сдвиг (обычно 3–4°C) между кривыми, характеризующими совершенный и несовершенный комплексы, недостаточен для обеспечения существенного различия соответствующих интенсивностей сигналов

ших экспериментах [10]. Данные характеристики соответствуют критериям, применяемым для лучших коммерческих микроматриц, производимых компаниями ArrayIt (США) и Schott AG (Германия).

С момента первых экспериментов по секвенированию с помощью гибридизации на олигонуклеотидных микроматрицах 30 лет назад [11] гидрогелевые биочипы прошли долгий путь от фундаментальных исследований к клинической лабораторной диагностике. Исследование кинетики и термодинамики гибридизации фрагментов ДНК показало, что использование коротких (до 25 нуклеотидов) зондов обеспечивает эффективную дискриминацию точечных нуклеотидных замен, а иммобилизация в трехмерных гелевых элементах позволяет значительно увеличить интенсивность положительных сигналов и уменьшить статистический разброс по сравнению с двумерными микрочипами [12, 13] (рис. 2).

Экспериментально подобраны условия гибридизации, концентрации иммобилизованных зондов, предложены алгоритмы расчета последовательностей зондов, обеспечивающие высокие значения положительного сигнала и дискриминационных отношений [14]. Достигнут значительный прогресс в аналитической чувствительности анализа за счет создания процедуры мультиплексной ПЦР, обеспечивающей одновременную амплификацию десятков фрагментов геномов [15, 16], а также благодаря синтезу новых красителей и оптимизации флуоресцентного маркирования [17, 18].

Впервые были разработаны способы эффективной иммобилизации белковых и гликановых молекул в гидрогеле, предложены методы мультиплексного количественного анализа различных белков в сыворотке крови [19]. Создано несколько поколений универсальных флуоресцентных анализаторов, последнее из которых обеспечивает измерение интенсивности сигналов элементов биочипа при длинах волн от 380 до 850 нм, позволяя проводить качественный и количественный анализ с точностью $\pm 5\%$ [20].

Созданная в ИМБ РАН универсальная платформа гидрогелевых биочипов позволила разработать, валидировать и внедрить в практику ряд актуальных приложений для многопараметрического анализа биомаркеров социально значимых заболеваний, которые будут детально рассмотрены ниже.

АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И ВИРУСНЫХ ГЕНОМОВ

Необходимость исследования геномов бактерий и вирусов определяется прежде всего высокой социальной значимостью патогенов, к которым зачастую относятся лекарственно-устойчивые возбудители

туберкулеза (МТВ) и микобактериозов (НТМ), вирус гепатита С (ВГС), микроорганизмы группы инфекционно-воспалительных заболеваний репродуктивных органов. Применительно к данным объектам технология гидрогелевых ДНК-биочипов зарекомендовала себя как эффективный инструмент определения профиля детерминант антибиотикорезистентности, внутри- и межвидового генотипирования микроорганизмов и вирусов, необходимого для выбора рациональной терапии и осуществления эпидемиологического надзора.

Биочипы в лабораторной диагностике туберкулеза

Первой в мире методикой на основе биочипов, разработанной и разрешенной к применению в лабораторной диагностике *in vitro*, стал набор реагентов «ТБ-Биочип-1» для идентификации 48 мутаций в геноме *Mycobacterium tuberculosis*, ответственных за устойчивость к рифампицину (RMP) и изониазиду (INH) [21]. Диагностические характеристики метода были оценены на основании результатов десятилетнего (2005–2015 гг.) применения набора «ТБ-Биочип-1» в учреждениях противотуберкулезной службы РФ, Кыргызстана, Азербайджана. Метаанализ 16 публикаций, содержащих данные исследования более 5000 клинических образцов и изолятов с использованием набора «ТБ-Биочип-1» и микробиологических тестов, показал, что диагностическая чувствительность метода при идентификации устойчивого к RMP фенотипа МТВ находится в диапазоне 88.8–96.9%, специфичность – 90.3–99.4%; при анализе INH-устойчивых штаммов чувствительность составляет 85.7–96.9%, специфичность – 85.3–98.2%. Совпадение результатов, полученных с помощью набора «ТБ-Биочип-1» и рекомендованных ВОЗ молекулярных тестов Xpert MTB/RIF (Cepheid, США) и Genotype MTBRDplus (Hain Lifescence, Германия), составило 80–90% [22, 23].

Важным результатом применения набора «ТБ-Биочип-1» стала подтвержденная главным внештатным фтизиатром Минздрава РФ оценка клинической эффективности этого набора при лечении пациентов с деструктивным легочным туберкулезом в зависимости от времени коррекции схемы терапии [24]. При ранней диагностике МЛУ-форм МТВ с помощью биочипов число излеченных больных увеличилось по меньшей мере в 3 раза, в отличие от диагностики традиционными методами культивирования [14, 25]. В настоящее время набор «ТБ-Биочип-1» продолжает активно применяться в лабораторной диагностике туберкулеза, оперативно выявляя МЛУ-изоляты и позволяя переводить таких пациентов на другие режимы терапии.

Вместе с тем, последовательное накопление мутаций, ассоциированных с резистентностью, при-

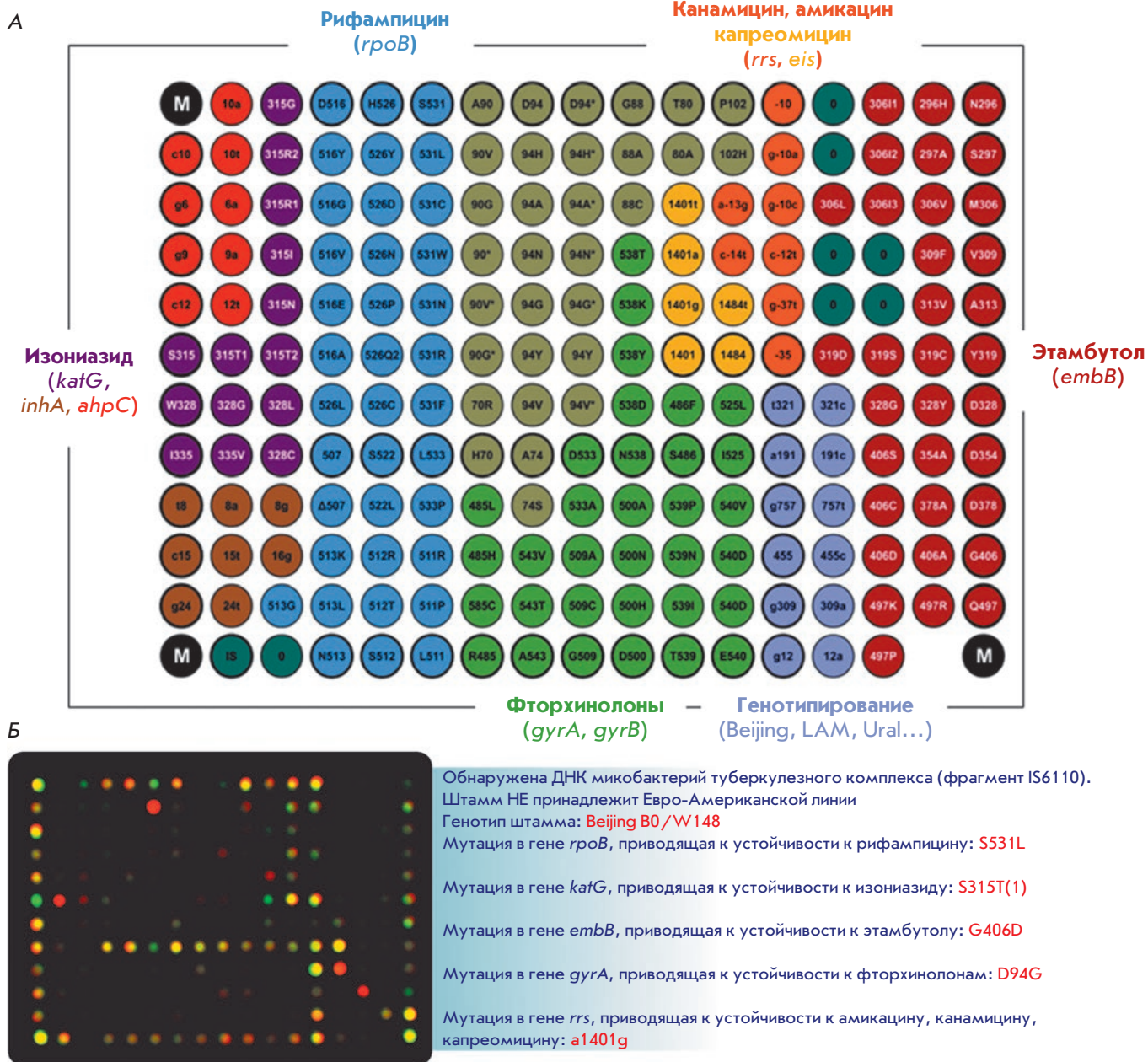


Рис. 3. Биочип для определения генотипа МТВ и идентификации генетических детерминант МЛУ и ШЛУ (А), флуоресцентная картина биочипа и результат интерпретации при анализе ДНК изолята ШЛУ-МТВ, имеющего генотип Beijing B0/W148 (Б). Различными цветами на схеме биочипа показаны группы ячеек с иммобилизованными зондами, специфичными к последовательностям дикого типа и мутантным вариантам генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью к разным противотуберкулезным препаратам

вело не только к росту впервые выявленных больных с МЛУ-формами туберкулеза (с ~15% в 2005 г. [21] до ~50% в 2015 г. [26]), но и к появлению изолятов с широкой (ШЛУ) и тотальной устойчивостью ко всем противотуберкулезным препаратам. Для решения данных задач нами разработан метод выявления ДНК МТВ с одновременным установлением генотипа эндемичных для РФ штаммов и определением

генетических детерминант МЛУ и ШЛУ. Процедура анализа включала мультиплексную ПЦР с адаптерными праймерами и циклической элонгацией с целью одновременной амплификации и флуоресцентного маркирования 17 локусов генома *M. tuberculosis* с последующей гибридизацией. Биочип, являющийся ключевым компонентом разработанного подхода, позволяет идентифицировать ДНК МТВ, определять

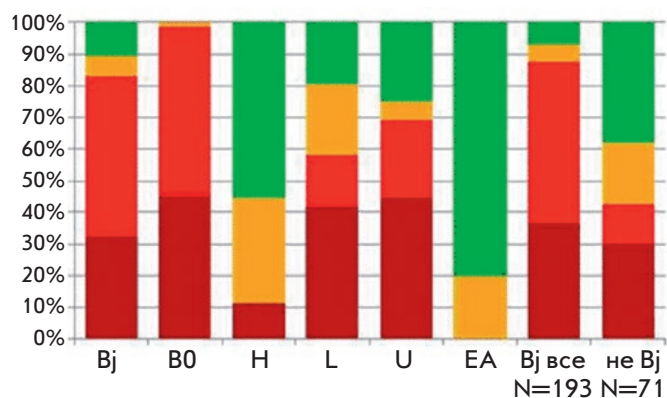


Рис. 4. Ассоциация выявленных семейств МТВ с лекарственной устойчивостью. Профиль лекарственной устойчивости отмечен цветами: бордовый – ШЛУ, красный – МЛУ, желтый – моно- или полирезистентный штамм, зеленый – чувствительные изоляты. Обозначения семейств: Bj – Beijing; B0 – Beijing B0/W148; H – Haarlem; L – LAM; U – Ural; EA – Евро-Американская линия

эндемичные для РФ семейства возбудителя и выявлять суммарно 116 генетических детерминант лекарственной устойчивости к рифампицину, изониазиду, фторхинолонам, инъекционным препаратам (амикацину, канамицину, капреомицину), этамбутолу (ЕМВ) (рис. 3).

Клинические испытания метода, проведенные в Санкт-Петербургском НИИ фтизиопульмонологии Минздрава РФ, показали, что значения диагностической чувствительности и специфичности созданной методики по всем препаратам составили 90% и более, за исключением этамбутола [15], чувствительность по которому, равная 89.9%, существенно превосходила опубликованное ранее значение (58%) [27].

Исследование семейств МТВ выявило преобладание штаммов генотипа Beijing (73.1%); в меньшей степени были представлены семейства LAM (12.1%), Ural (~7%) и штаммы, относящиеся к Евро-Американской линии (7.2%) (рис. 4). Из всех изолятов, принадлежащих к генотипу Beijing, более 30% составил кластер B0/W148. Установление принадлежности изолята к данному генотипу в 100% означало выявление МЛУ- или ШЛУ-фенотипа, подтверждая клиническую значимость обнаружения данного семейства. Наоборот, изоляты Евро-Американской линии, не входящие в семейства LAM и Ural, были преимущественно ассоциированы с чувствительным фенотипом [15].

Совместно с Московским научно-практическим центром борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения г. Москвы были установлены корреляции между генетическими детерминантами

резистентности и значениями минимальных ингибирующих концентраций, характеризующими уровень устойчивости к противотуберкулезному препарату [28]. Крайне важной представляется возможность дифференцированного назначения различных доз противотуберкулезных препаратов, входящих в чрезвычайно ограниченный спектр средств специфической терапии, по результатам анализа детерминант, ассоциированных с разным уровнем устойчивости.

На основе созданного метода разработан, испытан, зарегистрирован в Росздравнадзоре и внедрен в клиническую практику набор реагентов «ТБ-ТЕСТ», в настоящее время приходящий на смену наборам серии «ТБ-Биочип». Спектр анализируемых набором «ТБ-ТЕСТ» геномных мишеней по препаратам первого и второго ряда охватывает, как минимум, режимы I–IV химиотерапии больных туберкулезом в соответствии с Приказом Минздрава РФ № 951 от 29.12.2014 г. При этом скорость и возможность анализа респираторного материала позволяет применять набор «ТБ-ТЕСТ» для быстрого скрининга образцов от пациентов с последующей коррекцией режимов терапии и переводом на новейшие противотуберкулезные препараты [29].

С целью рутинного внутривидового генотипирования штаммов микобактерий туберкулезного комплекса разработан набор «СПОЛИГО-БИОЧИП», позволяющий составить генетический профиль каждого изолята МТВ, отнести его к определенному генотипу [30]. Разработанный подход используется также для дифференциации МТВ от вакцинного штамма *M. bovis* BCG в содержимом холодных абсцессов у детей с поствакцинальными осложнениями.

Видоспецифичный полиморфизм гена *gyrB* микроорганизмов, принадлежащих роду *Mycobacterium*, позволил сконструировать биочип, обеспечивающий идентификацию 35 различных видов микобактерий [31]. Исследование популяции микобактерий Центрального и Северо-Западного регионов РФ выявило преобладающие в Европейской части РФ виды NTM, такие, как комплекс *M. avium* (39%), *M. fortuitum* (17%) и *M. xenopi* (13%), проявляющие себя при иммуносупрессии, хронической обструктивной болезни легких и ВИЧ-инфекции [31].

Таким образом, совокупность тест-систем для анализа возбудителей туберкулеза и микобактериозов позволяет проводить комплексное исследование материала от больных в рамках универсальной диагностической платформы биочипов в условиях клинической лаборатории. Единый формат анализа, отвечающий современным требованиям, автоматизированная обработка результатов и их интерпретация в виде выдачи конкретных рекомендаций являются

основой совершенствования схем терапии туберкулеза, вызываемого лекарственно-устойчивыми формами.

Анализ генетических детерминант резистентности возбудителей инфекций репродуктивного тракта (ИРТ) к антимикробным препаратам (АМП)

Разнообразие ИРТ, их частое развитие по типу смешанных и лекарственно-устойчивых форм, включающих как облигатные патогены, передающиеся половым путем, так и ряд возбудителей оппортунистических инфекций, существенно затрудняет диагностику данных заболеваний и осложняет выбор стратегии персонализированной терапии. Среди возбудителей ИРТ особое место занимает *Neisseria gonorrhoeae*. Как и возбудитель туберкулеза, гонококки характеризуются экстраординарной способностью развивать лекарственную устойчивость. В отличие от МТВ, *N. gonorrhoeae* приобретает новые резистентные свойства не только посредством хромосомных мутаций, но и активно использует разнообразные мобильные элементы, а также горизонтальный перенос генов от других видов. Особенно эффективно возбудитель гонореи использует мута-

ции, влияющие на проницаемость мембран и увеличивающие активность эффлюксных помп, поскольку эти системы обладают свойством формировать резистентность одновременно ко многим АМП [32].

Разработан биочип (рис. 5А) и метод на его основе для идентификации ДНК 12 различных облигатных и условно-патогенных микроорганизмов с одновременным дифференцированным анализом 39 генетических детерминант устойчивости к β-лактамам, макролидам, аминогликозидам, тетрациклину, спектиномицину, фторхинолонам и нитроимидазолу [33].

Анализ более 500 клинических образцов и изолятов, выделенных в Государственном научном центре дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, продемонстрировал высокую чувствительность и специфичность созданного метода при обнаружении ДНК возбудителей ИРТ, а также предсказательную эффективность идентификации маркеров их резистентности к АМП.

Исследование тетрациклин-устойчивых штаммов гонококка, выделенных в 2015–2017 гг. в России, показало, что долговременный (с 2003 г.) отказ от использования тетрациклина для лечения гонореи

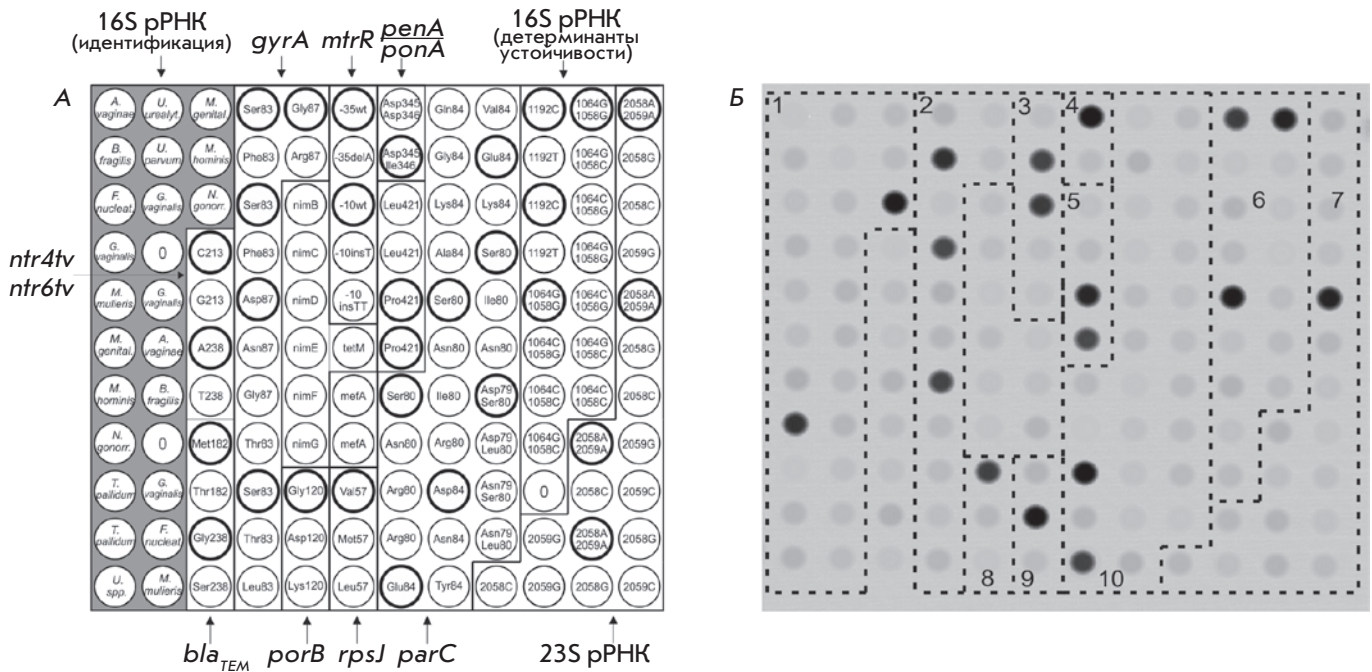


Рис. 5. Биочип для анализа резистентности возбудителей ИРТ, содержащий зонды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК для идентификации возбудителей ИРТ, а также зонды, специфичные к последовательностям генов *rrs*, *rrl*, *gyrA*, *parC*, *mefA*, *mtrR*, *nimB-G*, *penA*, *ponA*, *porB*, *rpsJ*, *ntr4tv*, *ntr6tv*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *tetM*, являющихся детерминантами резистентности к АМП. Элементы, содержащие олигонуклеотиды дикого типа, выделены толстым контуром (А). Гибридационная картина анализа образца ДНК изолята *N. gonorrhoeae*, содержащего мутации: S91F+D95G в гене *gyrA* (группа 2), -35delA в промоторе гена *mtrR* (группа 3), insD345 в гене *penA* (группа 4), S87R в гене *parC* (группа 10) (Б)

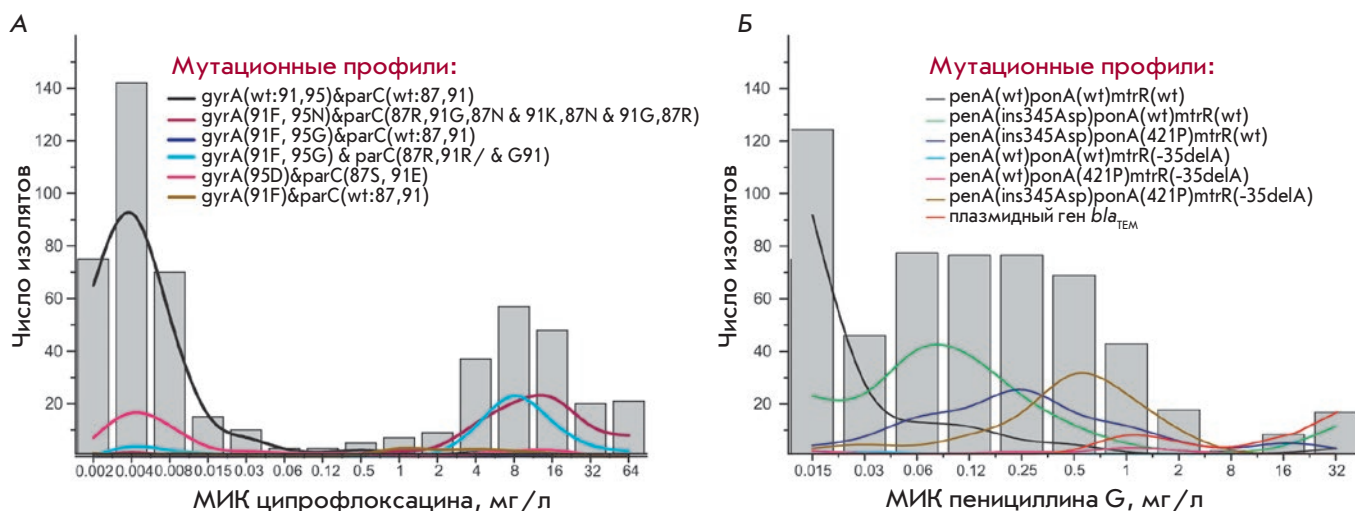


Рис. 6. Распределение изолятов *N. gonorrhoeae* с различными мутационными профилями по минимальным ингибирующим концентрациям (МИК) ципрофлоксацина и пенициллина G. Мутационные профили генов *gyrA* и *parC*, приводящие к устойчивости к ципрофлоксацину (А). Мутационные профили генов *penA*, *ponA*, *mtrR*, ассоциированные с устойчивостью к пенициллину G (Б). Отдельно показан профиль изолятов, несущих плазмидный ген *bla*_{TEM}. wt – дикий тип

привел к снижению доли резистентных штаммов в РФ с 75 до 42,6%, что, однако, не позволяет рекомендовать тетрациклины к возвращению в спектр актуальных препаратов для терапии гонококковой инфекции. Впервые в России был охарактеризован тип плазмидного гена *tetM*, продукт которого приводил к высокому уровню устойчивости к тетрациклину, независимо от присутствия детерминант резистентности хромосомной локализации [34].

Штаммы *N. gonorrhoeae* содержали множественные мутации в генах *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA*, *parC*, *mtrR* и др. (рис. 5Б), прогностическое значение которых в отношении фенотипической устойчивости существенно возросло при обнаружении сочетаний генетических детерминант резистентности (рис. 6) [35, 36].

Это обстоятельство вступает в определенное противоречие с тем фактом, что современная терапия гонококковой инфекции основана на преимущественном использовании цефалоспоринов третьего поколения и формально не ведет к «селекционному давлению» по генетическим детерминантам, контролирующим устойчивость к ранее использованным препаратам (пенициллинам, фторхинолонам). Тем самым можно было ожидать элиминации таких мутаций из генома современной популяции *N. gonorrhoeae*. Возможным объяснением присутствия мутаций представляется многофакторный характер феномена антибиотикорезистентности, в котором ряд ранее мутировавших генов служит основой

для следующего витка молекулярной эволюции *N. gonorrhoeae*. В частности, это относится к генам *penA* и *ponA*, мутации в которых оказываются значимыми и в развивающейся устойчивости к цефалоспорином. Тем самым мы вправе ожидать возникновения устойчивости к современным АМП, в первую очередь, среди мультирезистентных штаммов *N. gonorrhoeae*, как это имеет место в странах ЕС [37]. Указанное обстоятельство свидетельствует в пользу актуальности непрерывного мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя гонореи, одним из инструментов которого сегодня становится технология гидрогелевых биочипов.

Определение генотипа и подтипа вируса гепатита С (ВГС) на основе анализа области NS5B вирусного генома

Согласно современной классификации, ВГС предложено подразделять на семь основных генотипов и 67 подтипов [38]. Генотип и подтип ВГС являются ключевыми детерминантами при выборе режимов терапии препаратами прямого противовирусного действия (ПППД), действующими на основные мишени жизненного цикла вируса [39]. Точная идентификация генотипа и подтипа ВГС определяет показания к терапии посредством выбора ПППД, продолжительности курса и необходимости назначения рибавирина.

Совместно с лабораторией вирусологии госпиталя Университета г. Тулузы (Франция) предложен ме-

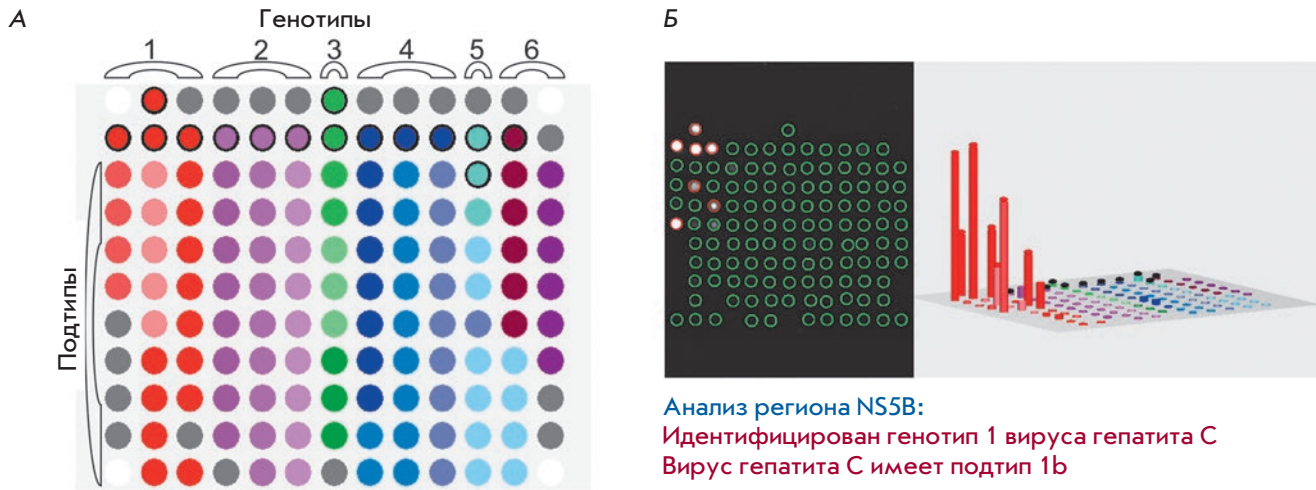


Рис. 7. Схема биочипа со 110 иммобилизованными зондами для идентификации генотипов и подтипов ВГС (А). Элементы, содержащие генотипспецифичные зонды в верхних рядах, выделены толстым контуром. Гибридационная картина РНК ВГС подтипа 1b, гистограмма сигналов элементов биочипа и результат интерпретации (Б)

тод идентификации шести генотипов и 36 подтипов ВГС посредством анализа генотип- и подтипспецифичных последовательностей области NS5B генома ВГС на гидрогелевом биочипе (рис. 7А). Процедура анализа включала амплификацию и флуоресцентное маркирование области NS5B с последующей гибридизацией на биочипе, регистрацией сигналов и их интерпретацией. Пример анализа образца РНК ВГС подтипа 1b с иллюстрацией интерпретации результата приведен на рис. 7Б.

С использованием разработанного метода исследованы 345 образцов ВГС в сравнении с «золотым стандартом» генотипирования – секвенированием области NS5B с последующим филогенетическим анализом. Обоими методами был успешно определен генотип всех образцов РНК при 100% корреляции. Совпадение результатов идентификации подтипов получено для 329 из 330 образцов [40].

По своим характеристикам разработанный набор «НСV-Биочип» не уступает технологиям секвенирования, являясь эффективным инструментом рутинного генотипирования, он актуален для оценки ответа на терапиюПППД в зависимости от подтипа ВГС [41, 42].

БИОЧИПЫ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Молекулярно-генетический анализ химерных генов при лейкозах

Выявление структурных перестроек генома с образованием химерных генов в опухолевых клетках костного мозга, особенно у детей, используется в боль-

шинстве современных протоколов для разделения пациентов на группы риска и выбора терапии.

Тест-система «ЛК-БИОЧИП» разработана и зарегистрирована в Росздравнадзоре для анализа 13 клинически наиболее значимых хромосомных транслокаций при лейкозах [43]. «ЛК-БИОЧИП» применяли для диагностики хромосомных транслокаций у детей в мультицентровых исследованиях по лечению острого лимфобластного лейкоза («ОЛЛ МВ-2002» и «ОЛЛ МВ-2008») в РФ с 2005 по 2015 г. [44]. В следующей генерации биочипов для диагностики лейкозов представлен расширенный спектр хромосомных транслокаций, включающий еще 9 клинически значимых перестроек t(1;11) MLL/MLLT11, t(1;11) MLL/EPS15, Del11 SIL/TAL1, t(2;5) NPM1/ALK, t(16;21) FUS/ERG, t(1;22) RBM15-MKL1, t(10;11) CALM/AF10, t(17;19) E2A/HLF, t(6;9) DEK/CAN (рис. 8). Тест-система позволяет выявлять в клиническом образце одну опухолевую клетку среди 1000 нормальных со специфичностью не менее 95% [45].

Биочипы для анализа соматических мутаций

Выявление соматических мутаций в опухолевой ткани позволяет отобрать для терапии препараты, направленно действующие на данные молекулярные мишени. Доля мутантной ДНК в анализируемом материале зачастую незначительна в силу гетерогенности опухоли или загрязнения образца нормальной тканью. Материалом для молекулярно-генетического исследования обычно служит опухолевая ткань, фиксированная в парафиновых блоках. В результате такого способа хранения опухолевая ДНК подвергается частичной деградации и фрагментации, что на-

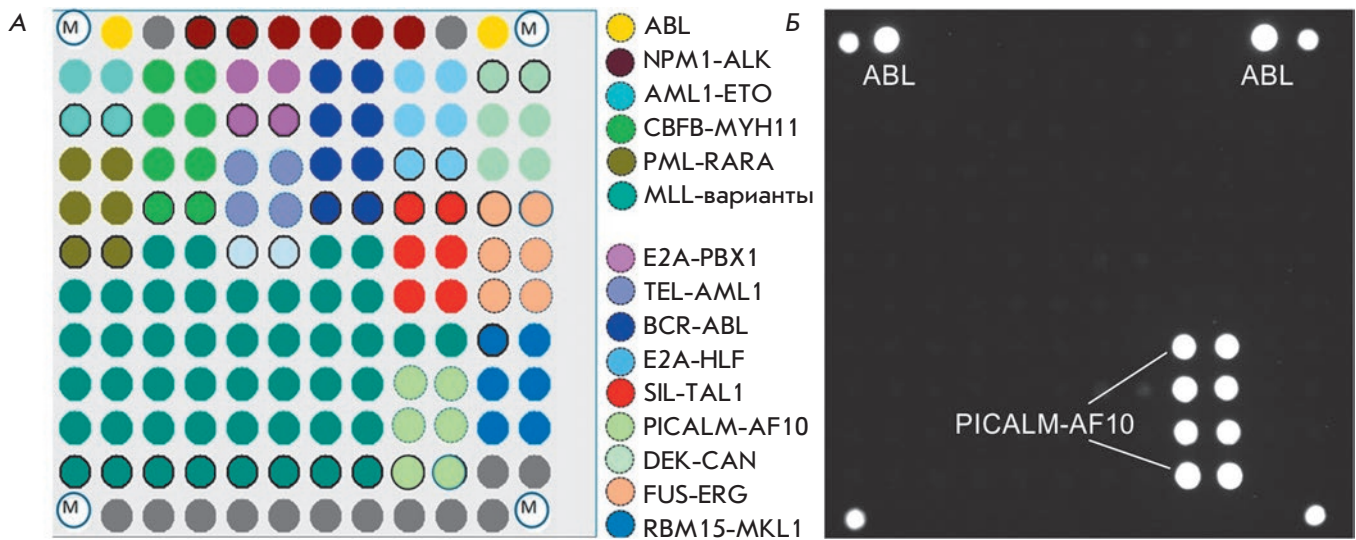


Рис. 8. Биочип для идентификации хромосомных перестроек, приводящих к развитию лейкозов различного типа (А), и гибридационная картина при анализе образца РНК, содержащего химерный транскрипт PICALM-AF10, ассоциированный с плохим прогнозом течения лейкоза, при котором требуется трансплантация костного мозга (Б). Элементы с зондами, специфичными к последовательностям различных химерных генов, показаны разным цветом

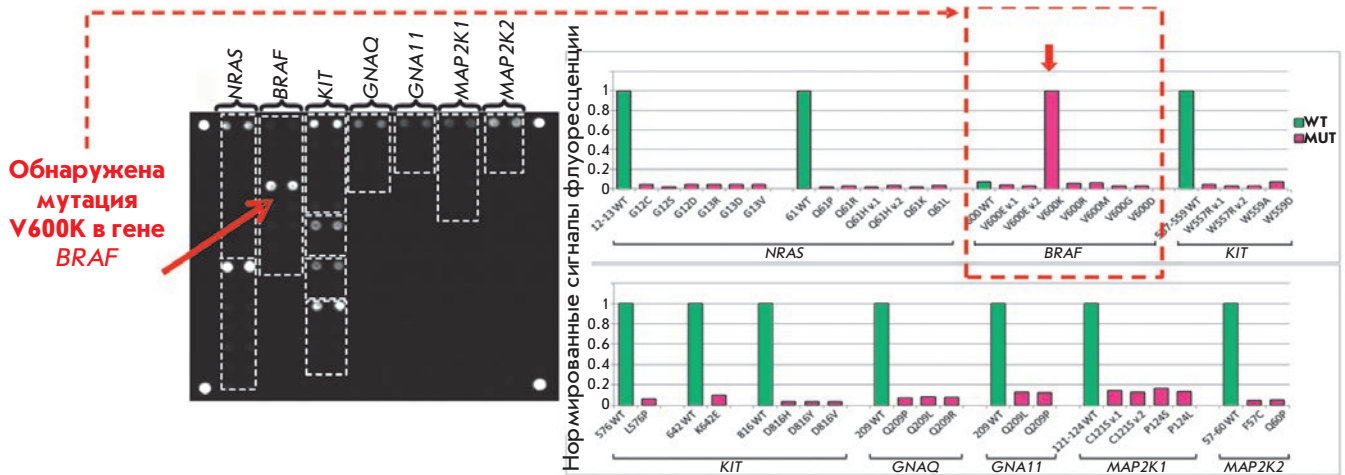


Рис. 9. Гибридационная картина и гистограммы нормированных сигналов элементов биочипа при определении соматических мутаций в образцах ДНК меланомы кожи. По результатам идентификации замены V600K возможно назначение ингибиторов BRAF вемурафениба и дабрафениба

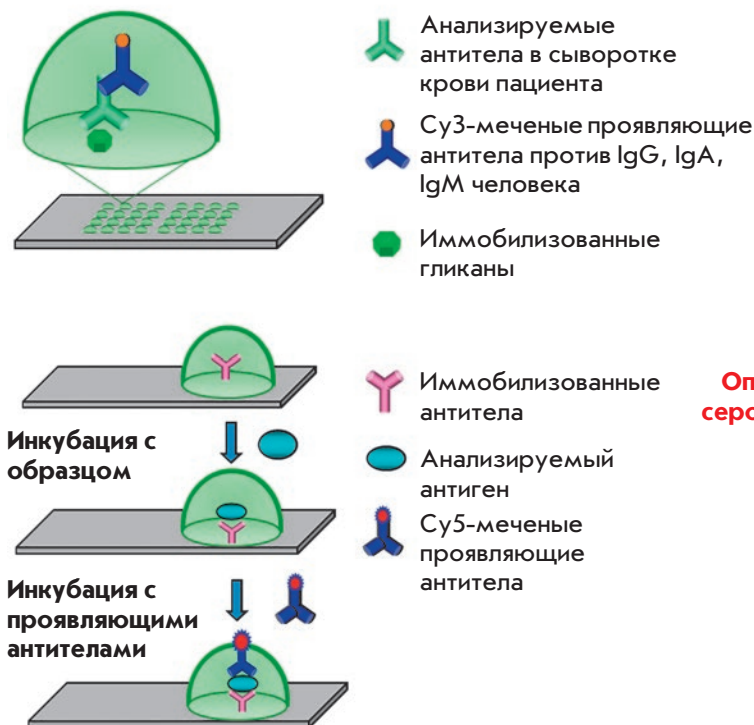
кладывает определенные ограничения на использование молекулярно-генетических методов.

Емельяновой и соавт. разработан метод анализа соматических мутаций на биочипе с пределом чувствительности выявления мутантной ДНК до 0.5% [46]. С использованием этого подхода были проанализированы соматические мутации при меланоме кожи, прорыв в лечении которой в последние годы связан с применением таргетных препаратов, действующих на специфические молекулярные мишени, и иммунотерапии, эффективность которой во многом зависит от генотипа опухоли. Основой

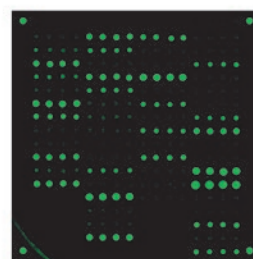
этого метода является биочип для определения 39 клинически значимых соматических мутаций в генах *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *GNAQ*, *GNA11*, *MAP2K1* и *MAP2K2* (рис. 9).

Разработанным методом было протестировано 253 клинических образца меланомы. Выявлены разнообразные мутации в генах *BRAF* (51.0%), *NRAS* (17.8%), *KIT* (2.4%), *GNAQ* (1.6%), *GNA11* (0.8%), *MAP2K1* (0.8%). Подход позволяет эффективно выявлять клинически значимые соматические мутации и делать выбор в пользу определенного таргетного препарата у 70% больных меланомой [47].

Рис. 10. Одновременное определение уровней антител к опухолеассоциированным гликанам и концентраций онкомаркеров. Схема иммуноанализа и пример флуоресцентных изображений биочипа после проведения анализа



Определение уровней антител к гликанам



Определение концентраций серологических онкомаркеров



МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ НА БИОЧИПАХ

В зависимости от клинической задачи выделяют два основных типа мультиплексного иммуноанализа: определение различных индивидуальных антигенов в образце или выявление антител, циркулирующих в сыворотке крови. В первом случае биочип содержит панель иммобилизованных антител, каждое из которых специфично взаимодействует с конкретным определяемым антигеном. Во втором, в структуру биочипа включены иммобилизованные лиганды белковой или иной природы, специфично связывающиеся с иммуноглобулинами в составе образца. Примером разработанного в ИМБ РАН метода первого типа может служить разработанная совместно с сотрудниками ИБХ РАН под руководством академика Е.В. Гришина тест-система для количественного определения ряда биотоксинов [48].

Мультиплексный анализ онкомаркеров на биочипах

Поиску клинически значимых биомаркеров, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью в отношении опухолей конкретного вида, посвящено огромное число исследований. Повысить диагностическую эффективность позволяет одновременное определение нескольких онкомаркеров.

Вместе с тем, такой подход не обеспечивает своевременного выявления некоторых опухолей. Так,

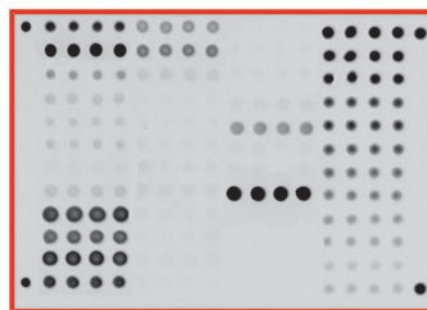
для диагностики колоректального рака (КРР) *in vitro* рекомендовано исследование сывороточных онкомаркеров РЭА и СА 19-9. В то же время результаты масштабных клинических исследований свидетельствуют, что данные биомаркеры выявляют заболевание в основном на поздних стадиях (III и IV) и обладают клинической значимостью только для мониторинга терапии [49]. Большинство КРР-ассоциированных маркеров являются гликопротеинами или карбогидратными антигенами, они содержат O- либо N-гликосайты [50]. Изменения в гликозилировании данных маркеров приводят к изменению уровней соответствующих антител, что можно детектировать с помощью мультиплексного анализа на биочипах.

Совместно с сотрудниками лаборатории углеводов ИБХ РАН разработан подход, основанный на одновременном анализе белковых серологических онкомаркеров и антител различных классов к онкоассоциированным гликанам. Сконструирован комбинированный биочип, элементы которого содержали гликаны, а также антитела к онкомаркерам КРР. Содержание антител к гликанам в сыворотке крови определяли с помощью флуоресцентного анализа на биочипах (рис. 10).

В результате исследований, проведенных совместно с МНИОИ им. П.А. Герцена, выявлены комбинации (сигнатуры), состоящие из уровней антител к некоторым опухолеассоциированным гликанам и значений

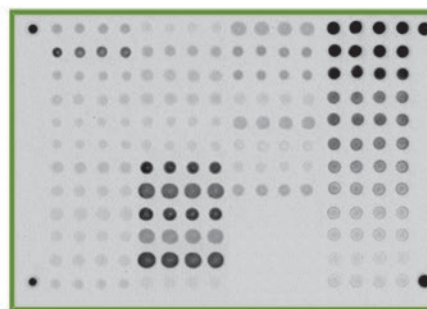


sIgE



проявляющие антитела anti-IgE-Cy5 и anti-IgG4-Cy3, возбуждение: 655 нм, регистрация 716±22 нм

sIgG4



проявляющие антитела anti-IgE-Cy5 и anti-IgG4-Cy3, возбуждение: 532 нм, регистрация 607±35 нм

Рис. 11. Мультиплексный анализ панелей sIgE и sIgG4 для диагностики и мониторинга терапии аллергических заболеваний. Представлены флуоресцентные изображения одного и того же биочипа после анализа сыворотки крови

концентраций основных онкомаркеров, позволяющие достоверно отличить больных КРР и здоровых доноров [51]. Показано, что одновременное использование белковой и гликановой сигнатур позволяет выявлять КРР у пациентов надежнее, чем традиционная пара онкомаркеров РЭА + СА 19-9. Чувствительность метода составила 88%, специфичность – 98%, в то время как комбинация РЭА и СА 19-9 позволила выявить КРР в 80% случаев с чувствительностью 21%.

Анализ аллергенспецифических иммуноглобулинов (Ig) на биочипе

Основными маркерами аллергии на сегодняшний день являются специфические иммуноглобулины класса E, которые определяют протекание аллергической реакции по механизму первого типа (анафилаксия, отек Квинке). Иммуноглобулины других классов также могут принимать участие в аллергических реакциях. Так, специфические иммуноглобулины класса IgG4 (sIgG4) играют определенную роль в развитии толерантности – отсутствии клинических проявлений на определенные аллергены при наличии сенсibilизации к этим аллергенам. Несмотря на то что sIgG4 не относится к диагностическим маркерам, определение этого параметра важно для оценки соотношения sIgE/sIgG4, которое показывает

эффективность проведения специфической иммунотерапии. sIgG4 играют роль блокирующих антител, которые препятствуют развитию аллергических реакций по первому типу [52].

Разработанная в ИМБ РАН совместно с компанией DR. FOOKE Laboratorien GmbH (Германия) тест-система «Аллергобиочип» (рис. 11) предназначена для проведения параллельного анализа панелей sIgE и sIgG4 к аллергенам следующих классов: пыльцевые (деревья и кустарники), пыльцевые (сорные травы и цветы), пыльцевые (травы и злаки), эпидермальные, яды насекомых, клещевые, пищевые, грибковые. Тест-система представляет собой адаптацию твердофазного иммунохимического анализа с флуоресцентной регистрацией сигналов в формате биочипа. Тестирование метода с использованием более 2000 образцов сывороток крови пациентов с аллергией и здоровых доноров показало эффективность аллергобиочипа для выявления гиперчувствительности типа I. Определены пороги детекции для sIgE и sIgG4, чувствительность и специфичность анализа, диапазон измерения, составивший 0.35–100 МЕ/мл для sIgE и 100–2500 нг/мл для sIgG4 [53, 54].

Проведено эпидемиологическое исследование модельной популяции детей средней полосы России (800 пациентов ДГКБ им. Филатова в возрасте от 0

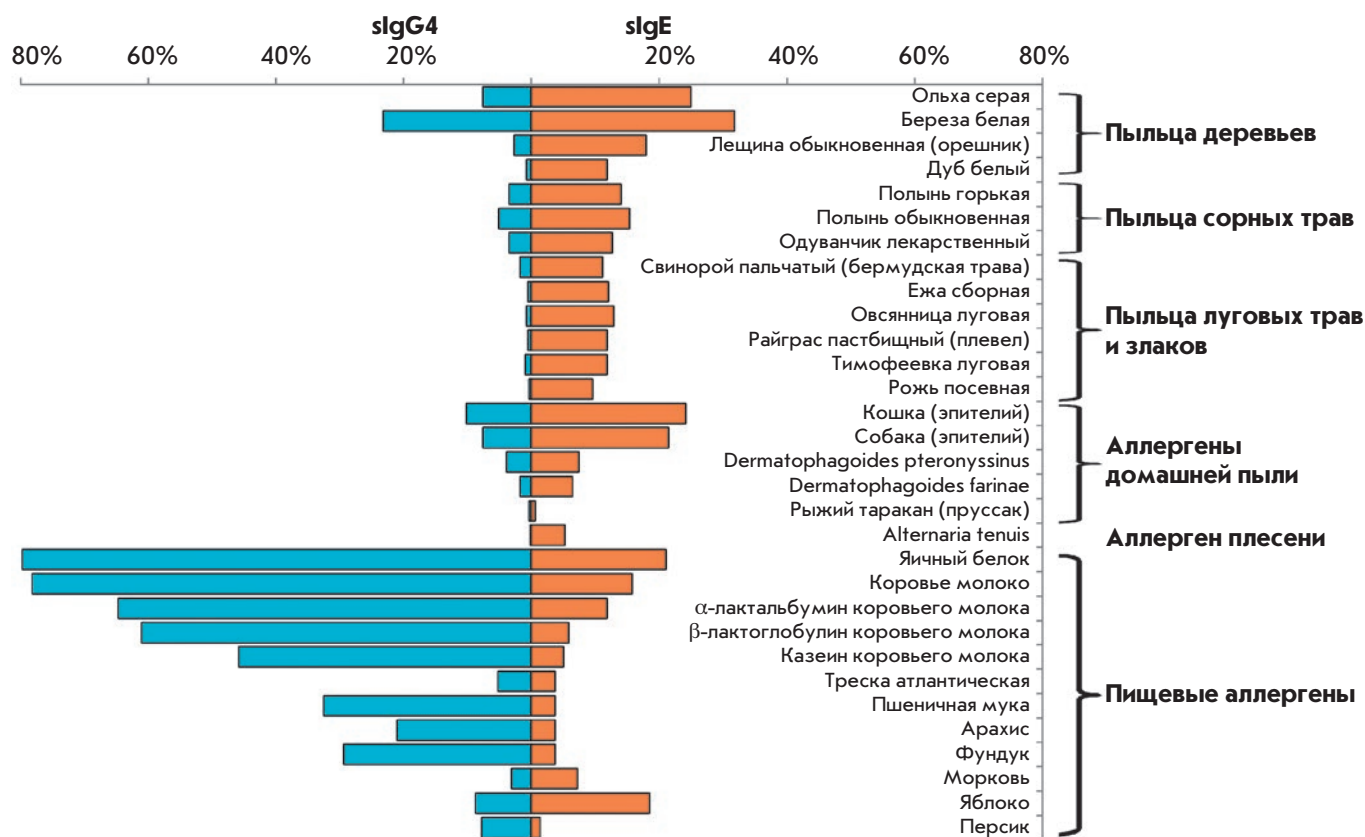


Рис. 12. Анализ частот встречаемости сенсibilизации к аллeргeнам различных групп при аллeргических заболеваниях. Представлены доли пациентов (%) из Московского региона в возрасте от 0 до 16 лет с аллeргическими симптомами и повышенной концентрацией sIgE (≥ 0.35 МЕ/мл) и концентрацией sIgG4 (≥ 100 нг/мл) к каждому из 31 аллeргeна

до 16 лет и 50 здоровых доноров) с целью оценки частот встречаемости сенсibilизации к аллeргeнам различных классов в зависимости от возраста [55]. Получены профили уровней аллeргeнспецифических sIgE и sIgG4 в каждом из образцов. Обнаружено, что среди ингаляционных аллeргeнов сенсibilизацию наиболее часто вызывают пыльца березы и эпителий кошки, в то время как среди пищевых аллeргeнов sIgE-ответ чаще всего связан с аллeргeнами куриного яйца и молока (рис. 12). Продукцию sIgG4 в основном вызывают пищевые аллeргeны, особенно яичный белок. С возрастом доля пациентов с повышенным уровнем sIgE к ингаляционным аллeргeнам увеличивается, при снижении доли пациентов, сенсibilизированных к большинству пищевых аллeргeнов, за исключением аллeргeнов моркови, яблока и персика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента первой публикации по секвенированию посредством гибридизации с иммобилизованными октануклеотидными зондами [56] прошло 30 лет.

За этот период сотрудниками лаборатории биологических микрочипов ИМБ РАН выстроена универсальная методология многопараметрического анализа белковых и ДНК-маркеров при статистических и клинических исследованиях больших серий биологических образцов различной природы. Создана и сертифицирована по международному стандарту ISO 13485 производственная линия по изготовлению гидрогелевых биочипов мощностью до 1 млн в год. ИМБ РАН получено 12 регистрационных удостоверений Росздравнадзора на разработанные медицинские изделия – наборы реагентов и оборудование для диагностики *in vitro* с использованием гидрогелевых биочипов.

В свете стремительного развития технологий ПЦР и платформ секвенирования следующего поколения ДНК-микрочипы столкнулись с серьезной конкуренцией. Сегодня они занимают промежуточную нишу, подпираемую снизу разнообразными тестами на основе амплификации НК, и испытывают все большее давление сверху со стороны высокопроизводительных технологий секвенирования. В нашем случае иммоби-

лизация любых типов биомолекул в гидрогеле и возможность проведения в нем ферментативных реакций [57], в том числе и изотермических [58], делает возможным создание портативных биосенсоров нового поколения. Так, гидрогелевые элементы могут стать платформой для совместной иммобилизации геномных редакторов – нуклеаз Cas13 и Cas12a, вместе с направляющими и детектирующими молекулами РНК/ДНК [59]. «Программируемая» работа нуклеаз, дополненная при необходимости изотермической амплификацией, в сочетании с созданными микрофлюидными системами для выделения НК [60], позволит создать высокочувствительные CRISPR-биосенсоры, применение которых будет возможно в полевых условиях. Такие комплексные автономные системы, содержащие платформу гидрогелевых биочипов и согласованные с ней поддерживающие модули, позволяют получать результаты быстрее, информативнее и точнее, чем в настоящее время, и будут играть ключевую роль в персонализированной медицине будущего.

В настоящее время более 2000 пациентов ДГКБ им. Филатова обследованы с использованием аллергобиочипов. Помимо выраженного экономического эффекта, обусловленного форматом «один образец – один анализ на чипе», предлагаемый под-

ход позволяет использовать всего 100 мкл сыворотки крови для выявления аллергена, вызывающего у ребенка выраженную реакцию. При обследовании детей раннего возраста (несколько месяцев) такое минимальное количество образца представляется существенным преимуществом. Перспективным представляется создание белковых биочипов для дифференциальной диагностики ревматологических заболеваний и других нарушений в работе иммунной системы. Многообещающим выглядит также расширение биочипа для анализа предиктивных маркеров онкозаболеваний. Мы надеемся, что развитие нового подхода на основе комплексного анализа сигнатур позволит решить эту непростую задачу.

Таким образом, технология гидрогелевых биочипов уже сегодня является эффективным инструментом персонализированной медицины, выполняя молекулярное профилирование множества клинически значимых маркеров возбудителей и причин социально значимых заболеваний, спасая жизнь сотням больных и обеспечивая экономию бюджетных средств при лечении. ●

Работа поддержана грантами РФФ № 14-50-00060 и 17-75-20039.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Marzancola M.G., Sedighi A., Li P.C. // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1368. P. 161–178.
- Rosenfeld S. // *Gene Regul. Syst. Bio.* 2010. V. 4. P. 61–73.
- Eklund A.C., Szallasi Z. // *Genome Biol.* 2008. V. 9. № 2. P. R26.
- Salazar R., Roepman P., Capella G., Moreno V., Simon I., Drazzen C., Lopez-Doriga A., Santos C., Marijnen C., Westerga J., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2011. V. 29. № 1. P. 17–24.
- Damin F., Galbiati S., Ferrari M., Chiari M. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 78. P. 367–373.
- Le Goff G.C., Srinivas R.L., Hill W.A., Doyle P.S. // *Eur. Polym. J.* 2015. V. 72. P. 386–412.
- Beyer A., Pollok S., Berg A., Weber K., Popp J. // *Macromol. Biosci.* 2014. V. 14. № 6. P. 889–898.
- Yershov G., Barsky V., Belgovskiy A., Kirillov E., Kreindlin E., Ivanov I., Parinov S., Guschin D., Drobishev A., Dubiley S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 10. P. 4913–4918.
- Rubina A.Y., Pan'kov S.V., Dementieva E.I., Pen'kov D.N., Butygin A.V., Vasiliskov V.A., Chudinov A.V., Mikheikin A.L., Mikhailovich V.M., Mirzabekov A.D. // *Anal. Biochem.* 2004. V. 325. № 1. P. 92–106.
- Rubina A.Y., Kolchinsky A., Makarov A.A., Zasedatelev A.S. // *Proteomics.* 2008. V. 8. № 4. P. 817–831.
- Khrapko K.R., Lysov Yu P., Khorlyn A.A., Shick V.V., Florentiev V.L., Mirzabekov A.D. // *FEBS Lett.* 1989. V. 256. № 1–2. P. 118–122.
- Sorokin N.V., Chechetkin V.R., Livshits M.A., Pan'kov S.V., Donnikov M.Y., Gryadunov D.A., Lapa S.A., Zasedatelev A.S. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. V. 22. № 6. P. 725–734.
- Pan'kov S.V., Chechetkin V.R., Somova O.G., Antonova O.V., Moiseeva O.V., Prokopenko D.V., Yurasov R.A., Gryadunov D.A., Chudinov A.V. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2009. V. 27. № 2. P. 235–244.
- Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2005. V. 11. № 7. P. 531–539.
- Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2016. V. 71. № 6. P. 1520–1531.
- Zimenkov D.V., Antonova O.V., Kuz'min A.V., Isaeva Y.D., Krylova L.Y., Popov S.A., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M., Gryadunov D.A. // *BMC Infect. Dis.* 2013. V. 13. P. 240.
- Shershov V.E., Lapa S.A., Kuznetsova V.E., Spitsyn M.A., Guseinov T.O., Polyakov S.A., Stomahin A.A., Zasedatelev A.S., Chudinov A.V. // *J. Fluoresc.* 2017. V. 27. № 6. P. 2001–2016.
- Zasedateleva O.A., Vasiliskov V.A., Surzhikov S.A., Kuznetsova V.E., Shershov V.E., Guseinov T.O., Smirnov I.P., Yurasov R.A., Spitsyn M.A., Chudinov A.V. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 12. P. e73.
- Rubina A.Y., Dementieva E.I., Stomakhin A.A., Darii E.L., Pan'kov S.V., Barsky V.E., Ivanov S.M., Konovalova E.V., Mirzabekov A.D. // *Biotechniques.* 2003. V. 34. № 5. P. 1008–1022.
- Lysov Y., Barsky V., Urasov D., Urasov R., Cherepanov A., Mamaev D., Yegorov Y., Chudinov A., Surzhikov S., Rubina A., et al. // *Biomed. Opt. Express.* 2017. V. 8. № 11. P. 4798–4810.
- Gryadunov D., Mikhailovich V., Lapa S., Roudinskii N., Donnikov M., Pan'kov S., Markova O., Kuz'min A., Chernousova L., Skotnikova O., et al. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2005. V. 11. № 7. P. 531–539.
- Kurbatova E.V., Kaminski D.A., Erokhin V.V., Volchenkov G.V., Andreevskaya S.N., Chernousova L.N., Demikhova O.V., Ershova J.V., Kaunetis N.V., Kuznetsova T.A., et al. // *Eur. J.*

- Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2013. V. 32. № 6. P. 735–743.
23. Nosova E., Krasnova M.A., Galkina K., Makarova M.V., Litvinov V.I., Moroz A.M. // Mol. Biol. (Mosk.). 2013. V. 47. № 2. P. 267–274.
24. Vasil'eva I.A., Samoilova A.G., Ergeshov A.E., Bagdasarian T.R., Chernousova L.N. // Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 2012. V. 67. № 11. P. 9–14.
25. Daurov R.B., Vasilyeva I.A., Perfilyev A.V., Chernousova L.N., Kuzmin A.V., Glazkova N.A. // Tuberk. Bolezni Legkih. 2010. V. 87. № 4. P. 10–13.
26. Mokrousov I., Vyazovaya A., Solovieva N., Sunchalina T., Markelov Y., Chernyaeva E., Melnikova N., Dogonadze M., Starkova D., Vasilieva N., et al. // BMC Microbiol. 2015. V. 15. P. 279.
27. Koser C.U., Bryant J.M., Comas I., Feuerriegel S., Niemann S., Gagneux S., Parkhill J., Peacock S.J. // J. Antimicrob. Chemother. 2014. V. 69. № 8. P. 2298–2299.
28. Nosova E.Y., Zimenkov D.V., Khakhalina A.A., Isakova A.I., Krylova L.Y., Makarova M.V., Galkina K.Y., Krasnova M.A., Safonova S.G., Litvinov V.I., et al. // PLoS One. 2016. V. 11. № 11. P. e0167093.
29. Zimenkov D.V., Nosova E.Y., Kulagina E.V., Antonova O.V., Arslanbaeva L.R., Isakova A.I., Krylova L.Y., Peretokina I.V., Makarova M.V., Safonova S.G., et al. // J. Antimicrob. Chemother. 2017. V. 72. № 7. P. 1901–1906.
30. Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N., Govorun V.M. // Infect. Genet. Evol. 2014. V. 26. P. 41–46.
31. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Krasnova M.A., Chernyaeva E.N., Zhuravlev V.Y., Kuz'min A.V., Popov S.A., Zasedatelev A.S., Gryadunov D.A. // J. Clin. Microbiol. 2015. V. 53. № 4. P. 1103–1114.
32. Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Runina A., Vorobyev D., Plakhova X., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. // Front. Microbiol. 2016. V. 7. P. 747.
33. Leinsoo A.T., Shaskol'skii B.L., Dement'eva E.I., Gryadunov D.A., Kubanov A.A., Chestkov A.V., Obratsova O.A., Shpilevaya M.V., Deryabin D.G. // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 164. № 1. P. 54–60.
34. Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Petrova N., Chestkov A., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. // Infect. Genet. Evol. 2018. V. 63. P. 236–242.
35. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. // BMC Infect. Dis. 2016. V. 16. P. 389.
36. Kubanov A.A., Leinsoo A.T., Chestkov A.V., Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Solomka V.S., Gryadunov D.A., Deryabin D.G. // Mol. Biol. (Mosk.). 2017. V. 51. № 3. P. 431–441.
37. Harris S.R., Cole M.J., Spiteri G., Sanchez-Buso L., Golparian D., Jacobsson S., Goater R., Abudahab K., Yeats C.A., Bercot B., et al. // Lancet. Infect. Dis. 2018. V. 18. № 7. P. 758–768.
38. Welzel T.M., Bhardwaj N., Hedskog C., Chodavarapu K., Camus G., McNally J., Brainard D., Miller M.D., Mo H., Svarovskaia E., et al. // J. Hepatol. 2017. V. 67. № 2. P. 224–236.
39. Manns M.P., Buti M., Gane E., Pawlotsky J.M., Razavi H., Terrault N., Younossi Z. // Nat. Rev. Dis. Primers. 2017. V. 3. P. 17006.
40. Gryadunov D., Nicot F., Dubois M., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Izopet J. // J. Clin. Microbiol. 2010. V. 48. № 11. P. 3910–3917.
41. Rodriguez-Frias F., Nieto-Aponte L., Gregori J., Garcia-Cehic D., Casillas R., Taberner D., Homs M., Blasi M., Vila M., Chen Q., et al. // Clin. Microbiol. Infect. 2017. V. 23. № 10. doi: 10.1016/j.cmi.2017.02.007
42. Soria M.E., Gregori J., Chen Q., Garcia-Cehic D., Llorens M., de Avila A.I., Beach N.M., Domingo E., Rodriguez-Frias F., Buti M., et al. // BMC Infect. Dis. 2018. V. 18. № 1. P. 446.
43. Nasedkina T.V., Guseva N.A., Gra O.A., Mityaeva O.N., Chudinov A.V., Zasedatelev A.S. // Mol. Diagn. Ther. 2009. V. 13. № 2. P. 91–102.
44. Nasedkina T.V., Ikonnikova A.Y., Tsaurov G.A., Karateeva A.V., Ammour Y.I., Avdonina M.A., Karachunskii A.I., Zasedatelev A.S. // Mol. Biol. (Mosk.). 2016. V. 50. № 6. P. 968–977.
45. Иконникова А.Ю., Фесенко Д.О., Каратеева А.В., Заседатель А.С., Наседкина Т.В. Патент 2639513. Россия. С12N 15/00. 2017.
46. Emelyanova M., Arkhipova K., Mazurenko N., Chudinov A., Demidova I., Zborovskaya I., Lyubchenko L., Zasedatelev A., Nasedkina T. // Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2015. V. 23. № 4. P. 255–265.
47. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I., Ryabaya O., Stepanova E., Kudryavtseva A., Sadritdinova A., Dzhumakova C., Belysheva T., Surzhikov S., et al. // Oncotarget. 2017. V. 8. № 32. P. 52304–52320.
48. Rubina A.Y., Filippova M.A., Feizkhanova G.U., Shepeliakovskaya A.O., Sidina E.I., Boziev Kh.M., Laman A.G., Brovko F.A., Vertiev Y.V., Zasedatelev A.S., et al. // Anal. Chem. 2010. V. 82. № 21. P. 8881–8889.
49. Duffy M.J., Lamerz R., Haglund C., Nicolini A., Kalousova M., Holubec L., Sturgeon C. // Int. J. Cancer. 2014. V. 134. № 11. P. 2513–2522.
50. Kufe D.W. // Nat. Rev. Cancer. 2009. V. 9. № 12. P. 874–885.
51. Butvilovskaya V.I., Popletaeva S.B., Chechetkin V.R., Zubitsova Z.I., Tsybul'skaya M.V., Samokhina L.O., Vinnitskii L.I., Ragimov A.A., Pozharitskaya E.I., Grigoreva G.A., et al. // Cancer. Med. 2016. V. 5. № 7. P. 1361–1372.
52. Vazquez-Ortiz M., Pascal M., Jimenez-Fejoo R., Lozano J., Giner M.T., Alsina L., Martin-Mateos M.A., Plaza A.M. // Clin. Exp. Allergy. 2014. V. 44. № 4. P. 579–588.
53. Feyzkhanova G.U., Filippova M.A., Talibov V.O., Dementieva E.I., Maslennikov V.V., Reznikov Y.P., Offermann N., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y., Fooke-Achterrath M. // J. Immunol. Methods. 2014. V. 406. P. 51–57.
54. Feyzkhanova G., Voloshin S., Smoldovskaya O., Arefieva A., Filippova M., Barsky V., Pavlushkina L., Butvilovskaya V., Tikhonov A., Reznikov Y., et al. // Clin. Proteomics. 2017. V. 14. P. 1.
55. Voloshin S., Smoldovskaya O., Feyzkhanova G., Arefieva A., Pavlushkina L., Filatova T., Butvilovskaya V., Filippova M., Lysov Y., Shcherbo S., et al. // PLoS One. 2018. V. 13. № 3. P. e0194775.
56. Lysov Iu P., Florent'ev V.L., Khorlin A.A., Khrapko K.R., Shik V.V. // Dokl. Akad. Nauk SSSR. 1988. V. 303. № 6. P. 1508–1511.
57. Khodakov D.A., Zakharova N.V., Gryadunov D.A., Filatov F.P., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M. // Biotechniques. 2008. V. 44. № 2. P. 241–248.
58. Kashkin K.N., Strizhkov B.N., Griadunov D.A., Surzhikov S.A., Grechishnikova I.V., Kreindlin E., Chupeeva V.V., Evseev K.B., Turygin A., Mirzabekov A.D. // Mol. Biol. (Mosk.). 2005. V. 39. № 1. P. 30–39.
59. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Kellner M.J., Joung J., Collins J.J., Zhang F. // Science. 2018. V. 360. № 6387. P. 439–444.
60. Mamaev D., Shaskolskiy B., Dementieva E., Khodakov D., Yurasov R., Yurasov R., Zimenkov D., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Gryadunov D. // Biomed. Microdevices. 2015. V. 17. P. 18.

УДК 576

Роль урокиназной системы в многоуровневой регуляции ниш стволовых клеток

К. В. Дергилев^{1*}, В. В. Степанова², И. Б. Белоглазова^{1,3}, З. И. Цоколаева¹, Е. В. Парфенова^{1,3}

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии МЗ РФ, лаборатория ангиогенеза, 121552, Москва, 3-я Черепковская, 15А, Россия

²Департамент патологии и лабораторной медицины, Медицинский факультет университета Пенсильвании, Филадельфия, США

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, лаборатория постгеномных технологий в медицине, 119991, Москва, Ломоносовский просп., 27, корп. 1, Россия

*E-mail: doctorkote@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2018

Принята к печати 06.11.2018

РЕФЕРАТ Важными процессами, определяющими участие стволовых/прогениторных клеток в регенерации тканей, являются пролиферация, последующая направленная миграция в область повреждения, дифференцировка в соответствующие клеточные типы, секреция биологически активных молекул и внеклеточных везикул. Регуляция всех этих функций осуществляется через взаимодействие стволовых клеток с микроокружением в тканевых клеточных нишах, контролирующим эти процессы через прямые межклеточные контакты, продукцию межклеточного матрикса, высвобождение внеклеточных везикул и секрецию факторов роста, цитокинов, хемокинов и протеаз. Одной из важнейших протеолитических систем, участвующих в регуляции клеточной миграции и пролиферации, является урокиназная система, представленная активатором плазминогена урокиназного типа (uPA, урокиназа), его рецептором (uPAR) и ингибиторами. В обзоре рассмотрены данные об участии урокиназной системы в регуляции состояния ниш стволовых клеток в различных тканях, проанализированы возможные способы влияния этой системы на сигнальные пути, ответственные за пролиферацию, программируемую клеточную гибель, модуляцию фенотипа и миграционных свойств стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ингибиторы активаторов плазминогена, клеточные ниши, регенерация, стволовые клетки, урокиназа, урокиназный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время стволовые клетки (СК) рассматриваются как важный регулятор клеточного гомеостаза и участник регенерации/репарации всех тканей организма. СК уже применяют в практической медицине, однако получение биомедицинских продуктов с определенными характеристиками остается нерешенной задачей в связи со сложными, не до конца изученными путями регуляции, определяющими их уникальные свойства. Регуляция функций СК в тканях осуществляется при участии определенного микроокружения, образующего специализированные структуры – «клеточные ниши» [1, 2]. Это микроокружение формируется на основе взаимодействий между стволовыми и соседними дифференцированными клетками, а также компонентами внеклеточно-

го матрикса (ВКМ) за счет активации/ингибирования различных сигнальных путей (Notch, Wnt, TGF- β , Sonic Hedgehog и др.) посредством прямых межклеточных взаимодействий, высвобождения внеклеточных везикул и секреции факторов роста, цитокинов, хемокинов и различных протеаз [3]. Важным звеном этой сложной регуляции является урокиназная система, представленная активатором плазминогена урокиназного типа, или урокиназой (uPA), ее рецептором (uPAR/CD87) и двумя ингибиторами (PAI-1 и PAI-2). Уникальность этой системы заключается в наличии урокиназного рецептора, закрепленного на мембране клетки посредством гликозилфосфатидилинозитола, что позволяет ему быть подвижным в мембранном бислое и локально концентрировать протеолитическую активность урокиназы в направ-

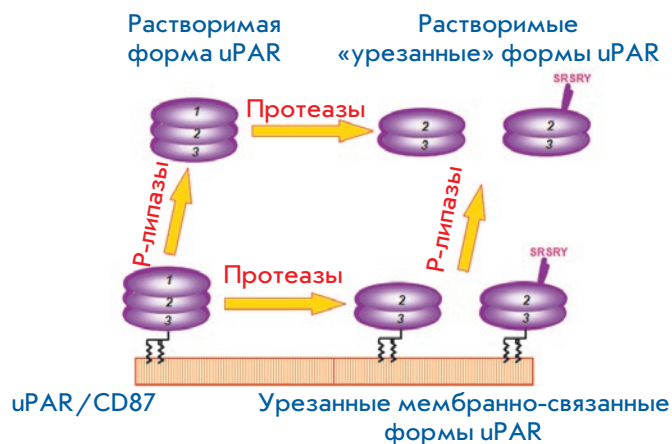


Рис. 2. Действие протеаз и фосфолипаз приводит к образованию «урезанных» мембранно-связанных и растворимых форм урокиназного рецептора

протеаз или фосфолипазы С, специфичной к гликозилфосфатидилинозитолу [47–52]. При этом образуются «растворимые» формы рецептора – полноразмерная (su-uPAR) и расщепленная/урезанная (su-c-uPAR), которые циркулируют в плазме крови и служат маркерами некоторых воспалительных или иммунологических заболеваний. Важно отметить, что «растворимая» расщепленная/урезанная форма урокиназного рецептора является сильным хемоаттрактантом для клеток (нейтрофилов, моноцитов, макрофагов), экспрессирующих рецепторы к бактериальному пептиду N-формил-метионил-лейцил-фенилаланину (fMLP) [53, 54].

Высокий уровень протеолитической активности урокиназы может оказаться губительным для клеток. В качестве механизмов, регулирующих уровень внеклеточного протеолиза, клетки синтезируют специфические белковые ингибиторы активаторов пламиногена – PAI-1, PAI-2, протеазный нексин-1 и инактиватор белка С [55–58]. Они относятся к группе аргинин-серпиновых ингибиторов. Суть их взаимодействия с ферментом заключается в имитации субстрата, что приводит к стабильному связыванию с двухцепочечной формой фермента путем образования ковалентного комплекса фермент–ингибитор в стехиометрии 1 : 1 и его инактивации [59]. Взаимодействие с одноцепочечной формой урокиназы не приводит к формированию ковалентного комплекса. PAI-1 представляет собой одноцепочечный гликопротеин массой около 45–50 кДа. После секреции PAI-1 быстро инактивируется в результате конформационных перестроек и становится неспособным связываться с урокиназой. Для активации ингибитора необходимо взаимодействие неактивной молекулы PAI-1 с физиологическими кофактора-

ми – белком внеклеточного матрикса витронектином или гепарином [60]. Иммуобилизованный на матриксе PAI-1, в отличие от его свободной формы, может долгое время оставаться активным [61]. Активная форма PAI-1 взаимодействует как со свободной урокиназой, так и со связанной со своим рецептором, ингибируя процессы внеклеточного протеолиза [62]. Одноцепочечная неактивная форма урокиназы, обладающая незначительной протеолитической активностью, также ингибируется PAI-1, но с гораздо меньшей скоростью [63]. Активность PAI-1 может регулироваться несколькими способами. Урокиназа способна расщеплять и инактивировать PAI-1 [64]. Кроме того, при связывании PAI-1 с uPA/uPAR образуется тройной комплекс, который немедленно интернализируется клетками [65, 66]. Этот процесс запускается при взаимодействии тройного комплекса с эндцитирующими рецепторами семейства рецептора липопротеинов низкой плотности. В образовавшихся эндосомах урокиназа и PAI-1 деградируют в лизосомах, а uPAR и эндцитирующий рецептор возвращаются на поверхность клетки, при этом инициируется внутриклеточная сигнализация и перестройка цитоскелета. Таким образом, помимо способности регулировать протеолитическую активность, PAI-1 вовлечен в регуляцию процессов миграции и адгезии клеток.

Ингибитор урокиназы PAI-2 представляет собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой 47 кДа [67]. Его способность ингибировать урокиназу намного меньше, чем у PAI-1. Так, константа связывания урокиназы, взаимодействующей с рецептором, с PAI-1 в 15 раз больше, чем с PAI-2 [63]. Долгое время считалось, что ингибирование урокиназы является основной функцией PAI-2. Однако оказалось, что только небольшое количество вновь синтезированного ингибитора секретируется в виде гликозилированного полипептида во внеклеточное пространство [68]. Основная часть остается внутри клеток и выполняет функцию защиты от апоптоза, индуцированного фактором некроза опухоли- α (TNF- α) [69, 70], а также регулирует уровень секреции интерферона- α/β [71]. Секретируемая форма PAI-2 участвует в регуляции процессов фибринолиза и перестройки тканей. Цитозольная форма PAI-2 играет важную роль во внутриклеточном протеолизе, вовлеченном в регуляцию процессов апоптоза и воспаления.

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА

Костный мозг содержит популяцию гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), способных к самообновлению и дифференцировке во все форменные элемен-

ты крови и некоторые клетки других типов. В костном мозге ГСК экспрессируют на своей поверхности uPAR и локализуются в «клеточных нишах», основу которых составляют остеобласты, эндотелиальные клетки и мезенхимальные стволовые клетки [72, 73]. Эти клетки являются малодифференцированными и характеризуются низким уровнем пролиферации/апоптоза за счет остановки клеточного цикла в фазе G0/G1. Однако у мышей, лишенных uPAR, ГСК активно вступают в клеточный цикл, дифференцируются и выходят в системный кровоток, что приводит к сокращению их пула и указывает на роль рецептора урокиназы в поддержании низкодифференцированного состояния ГСК [74]. Наряду с этим, uPAR определяет посттрансплантационную выживаемость ГСК и эффективность восстановления гемопоэза [74]. ГСК, полученные от трансгенных мышей uPAR^{-/-} и трансплантированные спленэктомизированным мышам дикого типа после радиационного облучения (9.5 Гр), имели сниженные показатели интеграции в костный мозг и выживаемости на протяжении 2 недель наблюдения в сравнении с ГСК мышей дикого типа. Одним из возможных молекулярных механизмов указанных эффектов может быть взаимодействие uPAR с интегринами, в частности с $\alpha 4\beta 1$ -интегрином, который регулирует миграцию и адгезию ГСК к фибронектину и VCAM-1 во время их хоуминга и приживления в костном мозге [74–78]. Известно, что функция интегрин $\alpha 4\beta 1$ зависит от интактного uPAR, так как только интактный урокиназный рецептор взаимодействует с интегринами [79, 80]. Протеолитическое расщепление uPAR с удалением D1-домена снижает $\alpha 4\beta 1$ -опосредованную клеточную адгезию [81]. При отсутствии урокиназного рецептора у трансгенных мышей нарушается опосредованная интегрином $\alpha 4\beta 1$ адгезия ГСК в костном мозге, что, вероятно, приводит к нарушению их интеграции в ткань костного мозга. Определенную роль в процессе высвобождения ГСК из костного мозга могут играть растворимые формы урокиназного рецептора (su-uPAR), уровень которых значительно возрастает в плазме крови во время мобилизации ГСК гранулоцитарно-колониестимулирующим фактором (G-CSF) [82, 83]. su-uPAR может способствовать миграции ГСК в кровоток как напрямую, так и косвенно, путем подавления активности рецептора CXCR4, отвечающего за удержание клеток в нише костного мозга. В экспериментах *in vivo* показано, что пептиды, разработанные на основе «расщепленной/урезанной» формы su-c-uPAR, способны индуцировать выход мышинных CD34⁺ ГСК из костномозговых депо в той же степени, что и G-CSF [82].

Таким образом, урокиназный рецептор обеспечивает как поддержание ГСК в состоянии покоя в нише

костного мозга, так и регулирует их высвобождение из ниши, вероятно, посредством нескольких механизмов, включающих взаимодействие с интегринными и прямое хемотактическое действие.

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ

В основе патогенеза многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит дисфункция и повреждение эндотелиального слоя сосудистой стенки, выполняющего важную роль в регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы. Репарация эндотелиального слоя и постнатальный васкулогенез [84] обеспечиваются за счет циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток (ЭПК), высвобождающихся из костномозговых ниш.

При повреждении сосуда активируются синтез и секреция широкого спектра цитокинов и хемокинов (VEGF, IGF2, MCP-1 IL-8, брадикинин, MIF, SDF-1 и др.), создающих градиент внутри сосудистой стенки и способствующих хоумингу ЭПК в область повреждения за счет механизмов адгезии и трансэндотелиальной миграции. Известно, что урокиназная система участвует в регуляции процессов ангио-артериогенеза при ишемии и воспалении [85–87], в частности, регулируя направленную миграцию ЭПК [88, 89], экспрессирующих высокие уровни uPA и uPAR [90]. Причем в отсутствие стимуляции рецептор урокиназы в ЭПК локализуется на липидных рафтах и отсутствует в кавеолах, но при стимуляции VEGF в них повышается экспрессия кавеолина-1 и uPAR, происходит сборка кавеол и интернализация в них uPAR [91]. Нарушение сборки кавеол в ЭПК путем обработки метил-бета-циклодекстрином (β -MCD) или ингибированием кавеолина-1 не вызывает перераспределения uPAR на клеточной мембране, в то же время подавление экспрессии uPAR нарушает нормальную организацию кавеолы. Эти данные указывают на участие uPAR в организации сборки кавеолярных рафтов в ЭПК, что может определять поведение этих клеток в сосудистой стенке [92]. Так, инициирующим событием в миграции/дифференцировке ЭПК является стимуляция кавеолинзависимого фосфорилирования ERK1/2 под действием VEGF, а целостность кавеолы влияет на ангиогенные свойства ЭПК [93]. VEGF повышает экспрессию кавеолина-1 и uPAR в ЭПК и запускает перераспределение uPAR в кавеолах, что увеличивает инвазию ЭПК и способствует морфогенезу капилляров. Подавление экспрессии uPAR с помощью антисмысловых олигонуклеотидов нарушает образование кавеолы, подавляет инвазию ЭПК и капиллярогенез [93]. Таким образом, образование кавеолярного uPAR считается крити-

ческим шагом в реализации ангиогенных свойств ЭПК. Секретия uPA и предшественника матриксной металлопротеазы-2 (про-MMP-2) также возрастает в ЭПК при стимуляции VEGF или TNF- α [93], а ингибирование uPA или uPAR моноклональными антителами значительно уменьшает пролиферацию, миграцию и формирование этими клетками капиллярноподобных структур *in vitro* [93, 94]. Недавно было показано, что определенная роль в регуляции миграции ЭПК принадлежит аутофагии [95], которая через сигнальный путь mTOR-P70S6K регулирует экспрессию uPA и матриксных металлопротеаз, осуществляющих протеолиз белков внеклеточного матрикса, необходимый для миграции ЭПК в зону повреждения. Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о crucialной роли урокиназы и ее рецептора в обеспечении хоуминга в поврежденный сосуд и ангиогенных свойств циркулирующих эндотелиальных прогениторных клеток.

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА И ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ ПОПЕРЕЧНО-ПОЛОСАТОЙ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

Сателлитные клетки (СТК) формируют стабильный самообновляющийся пул в скелетных мышцах взрослого организма. Более четырех десятилетий назад с помощью электронной микроскопии было показано, что стволовые клетки поперечно-полосатой мышцы представляют собой одноядерные клетки, расположенные между сарколеммой мышечного волокна и базальной пластинкой, которая окружает это волокно [96]. Такое анатомическое расположение выступает в качестве основы «клеточной ниши», в которой сателлитные клетки могут поддерживаться в состоянии покоя или активироваться, делиться и дифференцироваться в ответ на внешние стимулы, связанные с ростом и восстановлением мышц. Активированные СТК вступают в деление и дают начало миогенным клеткам-предшественникам – скелетным миообластам [97]. Миообласты начинают экспрессировать миогенные транскрипционные факторы – MyoD, Myf5, MRF4, миогенин и другие мышечные белки, секретируют uPA, PAI-1 и экспонируют на поверхности uPAR, сливаясь, образуют «мышечные трубки» – будущие мышечные волокна [98, 99]. Урокиназная система вовлечена в регенерацию поперечно-полосатой мускулатуры путем регуляции функций СТК и скелетных миообластов. Показано, что для инициации миграции СТК, их дифференцировки и слияния с предсуществующими миотубами необходимо связывание uPA с рецептором. Блокирование этого связывания антителами ингибирует миграцию культивированных миообластов G8-1 и подавляет их способность к миогенной диф-

ференцировке [100]. Последнее может быть обусловлено подавлением экспрессии миогенина и MyoD, наблюдаемом при блокировании связывания uPA с uPAR [101].

Процесс регенерации скелетных мышц регулируется балансом между uPA и PAI-1, который может влиять на этот процесс при помощи нескольких механизмов, включающих запуск внутриклеточной сигнализации при связывании урокиназы с рецептором [99] и модуляцию эффектов факторов роста, в частности, FGF-2 [102]. Наконец, uPA необходима для обеспечения процесса слияния миообластов, при котором ее экспрессия в этих клетках многократно возрастает. Антитела, блокирующие каталитическую активность uPA или взаимодействие uPA с uPAR, полностью ингибируют процесс слияния и образование мышечных трубок [103, 104]. Таким образом, uPA регулирует пролиферацию, миграцию и слияние миообластов. Механизмы, лежащие в основе этой регуляции, не могут быть объяснены только протеолитической функцией uPA и требуют дополнительных исследований.

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обнаружены практически во всех органах и тканях. Вместе с белками внеклеточного матрикса МСК формируют микроокружение резидентных стволовых клеток в тканевых клеточных нишах [105]. Они регулируют репарацию тканей, модулируя свойства стволовых и иммунных клеток, их хоуминг, за счет секреции широкого спектра биологически активных факторов и высвобождения внеклеточных везикул, переносящих в клетки-реципиенты не только белковые факторы, но и регуляторные микроРНК [106]. Одним из важнейших свойств МСК является способность стимулировать ангиогенное поведение эндотелиальных клеток (ЭК) как посредством паракринных эффектов, так и через прямые контакты в составе сосудистой клеточной ниши [107, 108]. В большинстве тканей МСК располагаются в стенке сосудов в периваскулярном и супраадвентициальном компартментах [109]. Расположенные периваскулярно МСК способны через поры в базальной мембране прямо взаимодействовать с эндотелиальными клетками, регулируя их функции посредством прямых контактов и секреторных механизмов. Определенная роль в этой регуляции принадлежит урокиназной системе. МСК, выделенные из костного мозга и жировой ткани, экспрессируют uPAR и секретируют uPA и PAI-1 [110, 111]. Однако в зависимости от тканевой принадлежности МСК их роль в ремоделировании ВКМ в процессе формирования сосудистой сети

различна. В наших исследованиях и работах других научных групп показано, что МСК костного мозга и жировой ткани при сокультивировании с эндотелиальными клетками стимулируют формирование ими сосудоподобных структур за счет разных механизмов [111, 112]. МСК из костного мозга ремоделируют матрикс в процессе ангиогенеза через мембранно-связанные металлопротеазы, а МСК из жировой ткани (МСК ЖТ) – через активацию плазминогена урокиназой [111, 112]. Исследуя в модельных экспериментах *in vitro* роль урокиназной системы в обеспечении регуляторных эффектов МСК ЖТ на формирование сосудистой сети клетками эндотелия, мы показали, что для стимуляции формирования сосудистых структур ЭК в отсутствие экзогенного ВКМ необходимы прямые контакты с МСК, а также обнаружили значительное возрастание экспрессии рецептора урокиназы на поверхности ЭК при сокультивировании с МСК ЖТ. Последнее оказалось crucialным для стимулированного МСК ангиогенеза, так как ингибирующие uPAR антитела дозозависимо подавляли капиллярогенез [111]. Другие компоненты урокиназной системы также играли существенную роль в регуляции ангиогенного поведения клеток эндотелия мезенхимальными стволовыми клетками, так как ингибиторы компонентов урокиназной системы (амилорид, белок RAP – антагонист LRP) также подавляли ангиогенез, стимулированный МСК ЖТ [113]. Эти результаты позволяют предполагать, что в сосудистой клеточной нише урокиназная система играет важную роль в регуляции ангиогенного поведения эндотелиальных клеток. Кроме того, в процессе формирования сосудистой сети и особенно в процессе ее стабилизации важная роль принадлежит перипитам, которые рассматриваются как сосудистые МСК [114]. Урокиназная система регулирует направленную миграцию муральных клеток сосудов [115, 116] и МСК. В модельных экспериментах *in vitro* uPA повышала спонтанную миграцию МСК, индуцируя секрецию ими матриксной металлопротеазы 9, а также опосредовала миграцию на PDGF-BB, так как блокада взаимодействия uPA с антителами к uPAR полностью подавляла индуцированную PDGF-BB миграцию МСК [117]. Помимо этого, система uPA/uPAR абсолютно необходима для запуска внутриклеточной сигнализации при индукции миграции МСК костного мозга и жировой ткани PDGF-AB [118], что свидетельствует о важной роли этой системы в регуляции направленного движения МСК, необходимого для их участия как в процессах роста сосудов, так и в других физиологических и патологических процессах [109]. Другой важный эффект активации урокиназной системы – регуляция дифференцировки МСК. Показано, что внутриклеточные

сигналы, поступающие от uPAR, регулируют дифференцировку МСК в адипогенном направлении [119] путем активации пути PI3K/Akt и в остеогенном направлении [120] – через опосредованные NF- κ B механизмы.

Важным механизмом, регулирующим свойства клеток в тканевых нишах, является взаимодействие с белками внеклеточного матрикса. Синтезируя и ремоделируя матрикс посредством протеолитических механизмов, МСК способны регулировать поведение клеток в тканевой нише и собственные функции. Эти эффекты объясняются изменением плотности матрикса за счет его ремоделирования МСК, что имеет решающее значение для выбора направления дифференцировки [121]. Можно предполагать, что, ремоделируя внеклеточный матрикс в тканевых нишах, МСК могут регулировать дифференцировочные свойства резидентных стволовых клеток, и эта регуляция осуществляется сигналами, влияющими на экспрессию рецептора урокиназы в МСК [73]. Кроме того, МСК секретируют урокиназу, которая запускает протеолитический каскад на поверхности клеток, что способствует высвобождению факторов роста, секвестрированных в матриксе, окружающем клетки, и вносящих свой вклад в регуляцию функций как самих МСК, так и других клеток микроокружения. Таким образом, при помощи различных механизмов урокиназная система участвует в регуляции не только собственных функций МСК, но и других клеток микроокружения, что может рассматриваться в качестве перспективной мишени для воздействия на «клеточные ниши».

УРОКИНАЗНАЯ СИСТЕМА И ОПУХОЛЕВЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Проведенные в последние годы исследования показали, что в опухолевой ткани присутствует популяция опухолевых стволовых клеток (ОСК), которые отвечают за инициацию, распространение (метастазирование) и рецидивирование опухолевого процесса. Первоначально ОСК выявили в костном мозге при остром миелоидном лейкозе [122], а впоследствии и в большинстве солидных злокачественных опухолей яичников [123], предстательной железы [124], поджелудочной железы [125], толстого кишечника [126], головного мозга [127] и др. ОСК обладают основными свойствами стволовых клеток, устойчивостью к лучевой и химиотерапии, способностью в короткие сроки формировать основные популяции опухолевых клеток и восстанавливать клеточное микроокружение даже после проведенного лечения. Роль урокиназной системы в развитии и метастазировании опухолей исследуется в течение нескольких десяти-

летий, однако работ, посвященных именно стволовым клеткам опухоли, немного. Имеющиеся данные позволяют рассматривать урокиназную систему в качестве важного регулятора состояния и образования ОСК. Так, плазмидная сверхэкспрессия uPAR в линиях клеток MCF-7 и MDA-MB-468 рака молочной железы человека вызывала образование ОСК, имеющих характерный иммунофенотип CD24^{low}/CD44^{high} и содержащих маркеры «стволового фенотипа» – интегрин $\beta 1$ /CD29 и $\alpha 6$ /CD49f [128]. Трансплантация суспензии таких клеток в жировую ткань молочной железы мышей SCID с иммунодефицитом приводила к выраженной интеграции трансплантата в ткани животного-реципиента и способствовала более высокой частоте формирования первичных опухолевых очагов больших размеров, чем при трансплантации клеток, трансфицированных контрольными «пустыми» плазмидами [128]. Это указывает на участие uPAR в формировании стволового фенотипа опухолевых клеток. Другой механизм регуляции пластичности ОСК при участии uPAR – активация эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП). Результаты многочисленных исследований подтверждают, что запуск программы ЭМП в эпителиальных ОСК способствует приобретению ими промиграционного мезенхимального фенотипа, повышению экспрессии маркеров «стволового фенотипа», способствующих инициации опухолеобразования и метастазирования [129–131]. В условиях гипоксии uPAR способствует инициации ЭМП в культуре клеток рака молочной железы человека (MDA-MB-468), имеющих эпителиальный фенотип, за счет активации различных сигнальных механизмов, включая ERK1/2, PI3K/Akt, Src и Rac1 [132, 133]. Сохранение приобретенного мезенхимального фенотипа ОСК требует высокого уровня экспрессии uPAR и полностью обратимо при подавлении его экспрессии, ингибировании взаимодействия uPA–uPAR и блокировании сигнализации PI3K, Src и ERK1/2 [132, 133]. Сформированные ОСК, экспрессирующие uPAR, могут находиться в тканях в состоянии покоя (в фазе G0/G1) в течение длительного времени, и восстановление пролиферации/роста дормантного опухолевого очага может произойти через многие годы. Другой механизм участия урокиназной системы в развитии опухолей – прямая или опосредованная плазмином активация митогенов. Так, урокиназа активирует HGF, который секретируется фибробластами в виде одноцепочечного биологически неактивного предшественника и накапливается в межклеточном матриксе. При расщеплении HGF урокиназой образуется активный белковый гетеродимер [134] – митоген, активирующий пролиферацию многих клеток, включая ОСК. Другими промитогенными факторами, высвобождае-

мыми из матрикса и активируемыми с помощью урокиназы, являются FGF-2, VEGF189 и IGF-1 и TGF- β [135–138]. Активность uPA/uPAR в ОСК регулируется ингибиторами активаторов плазминогена – PAI-1/PAI-2 [139, 140]. Однако их действие на ОСК обусловлено не только способностью ингибировать активность урокиназы, но и возможностью взаимодействовать с витронектином, обеспечивающим «закрепление» клеток в опухолевых нишах. Связываясь с витронектином, PAI-1 предотвращает взаимодействие последнего с интегринами на поверхности ОСК и тем самым способствует выходу ОСК из опухолевых ниш, регулируя их адгезию и миграцию.

Несколько лет назад мы нашли принципиально новый сигнальный путь, посредством которого урокиназа регулирует приобретение «стволового фенотипа» опухолевыми клетками и их устойчивость к действию цитотоксических агентов. В частности, мы впервые показали, что урокиназа транспортируется в ядро [28], где связывается с транскрипционными факторами (НОХА5, ННХХ, Lhx-2), участвующими в регуляции «стволового фенотипа» и выживаемости опухолевых [141] и эндотелиальных [28] клеток. С помощью флуоресцентной иммуногистохимии мы выявили локализацию урокиназы в ядрах опухолевых клеток и эндотелиальных клеток, ассоциированных с опухолью [142]. Механизм транспорта uPA в ядро изучен не до конца, но мы показали, что крингл-домен урокиназы необходим для ее транспорта в ядро. В осуществлении транспортировки урокиназы в ядро участвует нуклеолин (Nuc1), который связывается с ее крингл-доменом [28]. Нуклеолин, несмотря на свою преимущественную локализацию в ядре и ядрышках, способен циркулировать между клеточной мембраной, цитоплазмой и ядром и связывать различные классы белков. В частности, он участвует в транспортировке ряда секретируемых белков, таких, как FGF-1, FGF-2, мидкин, ламинин [143]. Нуклеолин признан одной из перспективных мишеней для противоопухолевой терапии [144], а ингибирование транспорта урокиназы в ядро может быть одним из механизмов такого эффекта [28]. Наши данные свидетельствуют о том, что урокиназный рецептор тормозит транспорт урокиназы в ядро, задерживая ее на поверхности клетки (В. Степанова, неопубликованные данные). Мы предполагаем, что в опухолевых стволовых клетках, уровень урокиназы в которых значительно повышен [142], урокиназа транспортируется преимущественно в ядро, чему способствует удаление первого домена или полноразмерного урокиназного рецептора с поверхности опухолевых клеток под действием протеаз или фосфолипазы С, специфичной к гликозилфосфатидилинозитолу [47–52].

Дальнейшие исследования должны быть направлены на получение ответа на следующие вопросы: 1) какая форма урокиназного рецептора (полноразмерная или расщепленная между первым и вторым доменами) превалирует на поверхности опухолевых клеток, имеющих преимущественно «стволовой» фенотип; 2) повышена ли скорость удаления урокиназного рецептора с поверхности ОСК; 3) повышена ли аккумуляция урокиназы в ядрах клеток, имеющих преимущественно «стволовой» фенотип. Эти исследования позволят, на наш взгляд, расширить представления о роли урокиназной системы в регуляции функционирования опухолевых стволовых клеток и наметить мишени и способы влияния на их функции.

РОЛЬ КОМПОНЕНТОВ ФИБРИНОЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА

Роль урокиназы в регуляции функций стволовых/прогениторных клеток сердца начали изучать только в самые последние годы. Показано, что эта система, как и в опухолевых стволовых клетках, может контролировать эпителиально-мезенхимальный переход [145, 146], в результате которого образуются мультипотентные прогениторные клетки эпикарда, представляющие собой один из подтипов резидентных прогениторных клеток сердца, участвующих в регенеративных процессах путем дифференцировки в клетки сосудов и миокарда, паракринной секреции ростовых факторов, цитокинов, экзосом [147–150]. Опубликованы лишь единичные работы, посвященные роли урокиназной системы в репаративных процессах в миокарде. Ранее мы показали, что экспрессия урокиназы значительно возрастает сразу после моделирования инфаркта у крыс, но через несколько дней опускается ниже исходного уровня в неповрежденном миокарде (неопубликованные данные). Это позволило предположить, что увеличение экспрессии урокиназы в сердце после инфаркта может стимулировать репаративные процессы за счет активации факторов роста. Для проверки этого предположения мы использовали плазмидную экспрессию урокиназы в перинфарктной зоне сердца крысы, которая способствовала значительной стимуляции репаративных/регенеративных процессов в сердце: неоваскуляризации, уменьшению размера инфаркта и постинфарктного фиброза [151]. Эти результаты косвенно указывали на участие урокиназы в процессах постинфарктного восстановления сердца, однако, механизмы этого участия пока не идентифицированы.

Как известно, основным триггером, запускающим процесс постинфарктного ремоделирования,

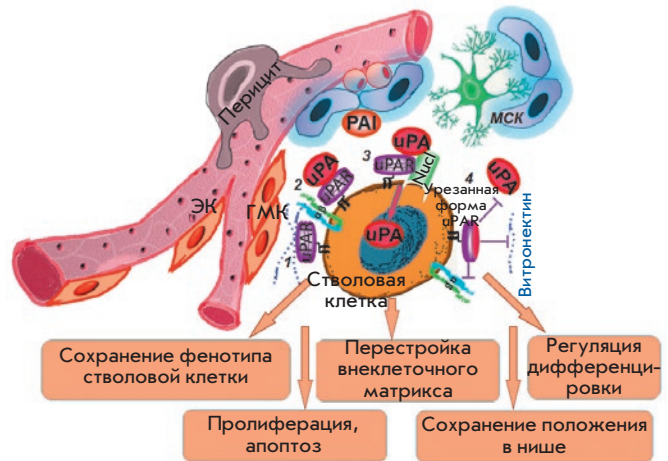


Рис. 3. Урокиназная система модулирует состояние стволовых клеток в «клеточных нишах». Взаимодействие урокиназы с урокиназным рецептором способствует локализации протеолитической активности на поверхности клетки, что, в свою очередь, приводит к ремоделированию внеклеточного матрикса, необходимому для поддержания микроокружения «клеточной ниши». Помимо активного участия в протеолизе, комплекс урокиназа–рецептор (1, 2) взаимодействует с важным белком внеклеточного матрикса – витронектином, и способен локализоваться внутри сигнального комплекса с интегринными рецепторами факторов роста и другими молекулами, что приводит к активации внутриклеточной сигнализации и, как следствие, к сохранению фенотипа стволовой клетки, а также к регуляции пролиферации/апоптоза и дифференцировки. Протеолитическая активность урокиназы регулируется ингибиторами активаторов плазминогена PAI-1 и PAI-2. При участии нуклеолина урокиназа может транспортироваться в ядро (3), что может приводить к запуску уникальной программы «самоподдержания» или, наоборот, приводить к ослаблению адгезии, «выходу» клеток из ниши и запуску миграции в зону повреждения. Урокиназный рецептор может протеолитически расщепляться различными молекулами (4), что лишает его способности связывать лиганды (uPA и витронектин), а также осуществлять взаимодействие с интегринными и активировать соответствующие сигнальные механизмы

является гибель кардиомиоцитов, которая сопровождается развитием асептической воспалительной реакции, перераспределением белков внеклеточного матрикса и привлечением стволовых/прогениторных клеток в зону повреждения. В этом процессе наряду с другими компонентами внеклеточного матрикса участвует витронектин. Однако, в отличие от большинства таких белков, синтезируемых клетками сердца, витронектин образуется, главным об-

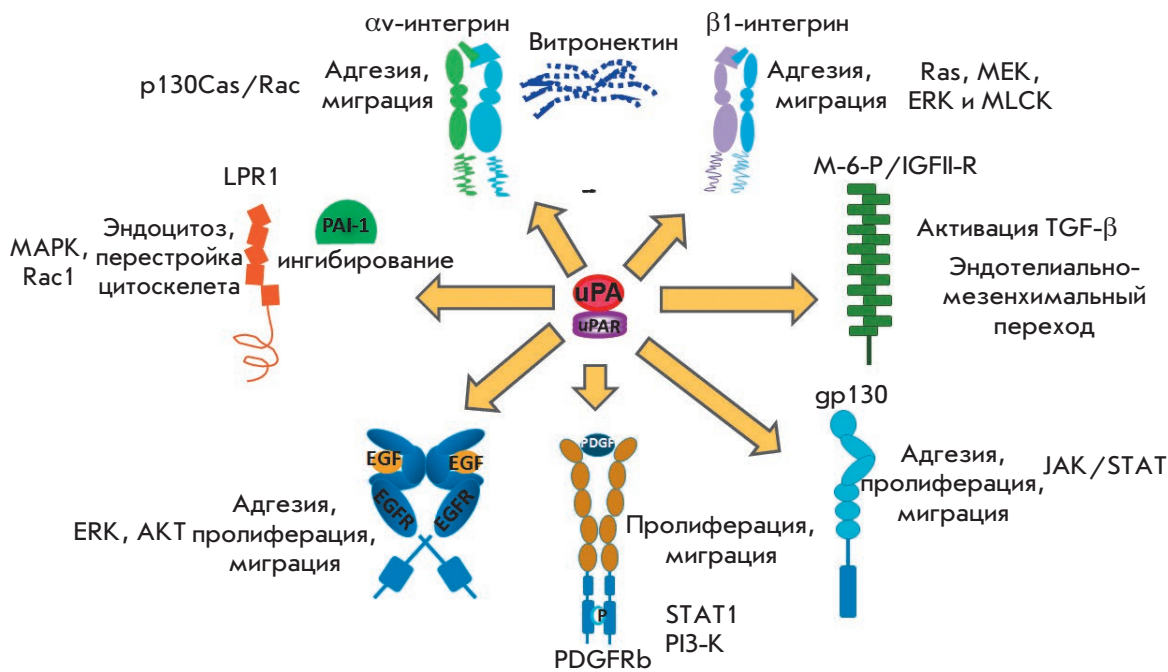


Рис. 4. Основные сигнальные молекулы, участвующие в реализации эффектов урокиназной системы

разом, в печени, откуда попадает непосредственно в системный кровоток, а далее накапливается в зоне повреждения. Нами показано, что при практически полном отсутствии белка внеклеточного матрикса витронектина в неповрежденном миокарде его количество после инфаркта значительно увеличивается, а динамика накопления коррелирует с аккумуляцией в зоне инфаркта и периинфарктной зоне прогениторных клеток сердца (ПКС). Ранее с помощью иммуногистохимического окрашивания мы выявили, что на поверхности ПКС в миокарде присутствует урокиназный рецептор, который сохраняется при культивировании ПКС *in vitro* и может специфически связываться с витронектином [152, 153]. Причем ПКС, выделенные из миокарда мышей с нокаутом гена *uPAR*, значительно хуже адгезировали на витронектин, чем такие же клетки, полученные из сердца мышей дикого типа (ПКС^{WT}). Кроме того, ингибирование урокиназного рецептора специфическими антителами на поверхности ПКС^{WT} приводило к снижению их способности к адгезии и распластыванию на витронектиновом матриксе [152]. Это позволило нам предположить, что *uPAR* может выступать в качестве регулятора адгезионных свойств ПКС, что может быть определяющим фактором их накопления и интеграции в зоне повреждения. Взаимодействие *uPAR* и витронектина может быть как независимым от интегринов, так и быть следствием активации различных интегринов [154], тем самым модулируя выбор матрикса для взаимодействия [155–157]. Выяснение роли *uPAR* и других компонентов урокиназной си-

стемы в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода клеток эпикарда и механизмов их участия в регуляции взаимодействия ПКС с различными белками внеклеточного матрикса, их миграции, а также пролиферативных и дифференцировочных свойств составляет предмет наших дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стволовые клетки взрослого организма существуют в определенном микроокружении, контролирующем их способность к самообновлению, уровень пролиферации и дифференцировки, в так называемых «клеточных нишах». В «нишах» стволовые клетки находятся в тесной связи с коммитированными клетками-предшественниками, со стромальными клетками, белками внеклеточного матрикса, взаимодействие с которыми регулирует поддержание состояния покоя, оптимального метаболического профиля, низкодифференцированного состояния, а также процессы дифференцировки и выхода стволовых клеток из «ниши» после получения соответствующего стимула. Анализ результатов многочисленных исследований позволяет утверждать, что урокиназная система выполняет координирующую функцию, реализуя специфические сигналы, поступающие от компонентов внеклеточного матрикса и окружающих клеток (рис. 3). Основные ее компоненты (*uPAR* и *uPA*) широко представлены в клетках, образующих тканевые клеточные ниши, включая стволовые клетки и клетки микроокружения, а их подавление

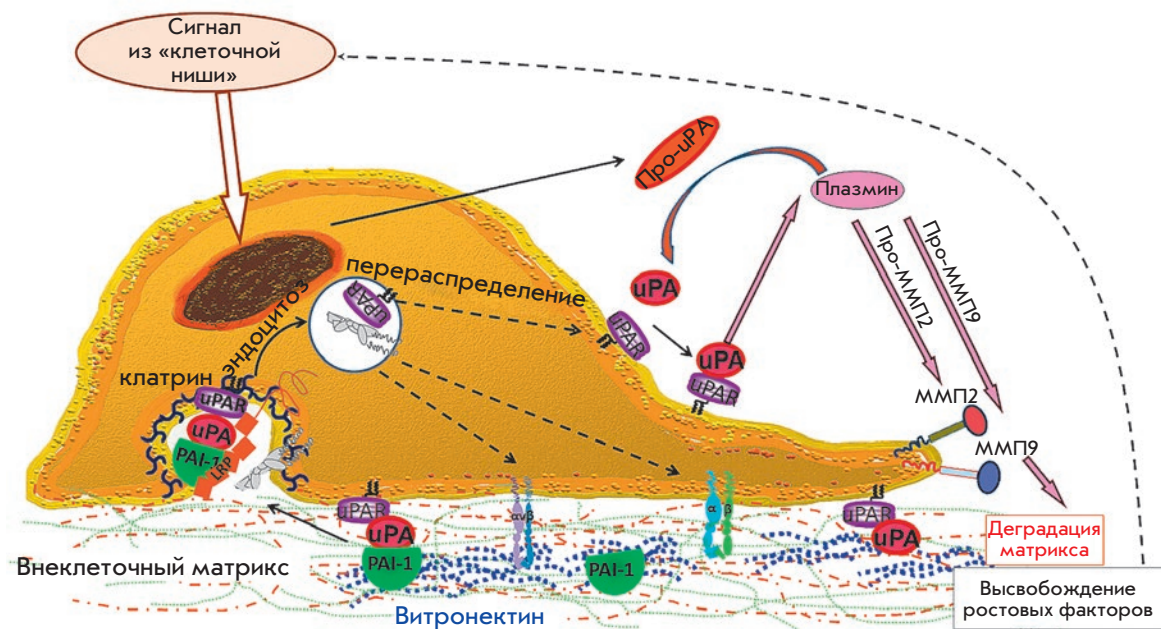


Рис. 5. Участие урокиназной системы в регуляции миграции прогениторных клеток. Под воздействием специфических сигналов, возникающих в «клеточной нише», происходит формирование промиграционного фенотипа прогениторной клетки, увеличивается продукция урокиназы, ее рецептора и ряда других факторов, необходимых для клеточной миграции

приводит в большинстве случаев к снижению пролиферации, переходу стволовых клеток в состояние покоя, индукции апоптоза, а также к ингибированию инвазии, миграции и дифференцировки. Ингибиторы активаторов плазминогена, поддерживая оптимальный уровень их активности, выполняют регуляторные функции в отношении стволовых/прогениторных клеток: ограничивают внеклеточный протеолиз, обеспечивают выполнение специализированных функций прогениторных клеток путем ингибирования активности uPA, а также поддержание уровня конкурентного взаимодействия витронектина с интегринами, uPAR и рециркуляцию uPAR на поверхности клеток. Влияние компонентов урокиназной системы на функции стволовых клеток обусловлено как дифференциальной регуляцией активности множества различных сигнальных молекул (рис. 4), так и прямым действием урокиназы в ядре, что может приводить к запуску уникальной программы «самоподдержания» стволовых клеток или, наоборот, приводить к ослаблению адгезии, «выходу» клеток из ниши и активации их миграции в зону повреждения (рис. 5). Главенствующую роль в этом процессе, по-видимому, играет рецептор урокиназы, входящий в состав большого сигнального комплекса, состоя-

щего из множества белков как снаружи, так и внутри клетки, активация которого приводит к запуску внутриклеточной сигнализации. Возможно, именно состояние uPAR может быть эволюционно консервативным ключом, определяющим молекулярные черты и удержание стволовых клеток в составе «клеточной ниши». Этот феномен может реализоваться за счет протеолитического разрезания рецептора, что приводит к образованию «расщепленных/урезанных» мембранно-связанных форм uPAR (с-uPAR), а также растворимых форм урокиназного рецептора (su-uPAR). с-uPAR, лишенный D1-домена, не способен связывать лиганды (uPA и витронектин), а также взаимодействовать с интегринами и активировать соответствующие сигнальные механизмы. В дополнение к этому растворимая форма su-uPAR может конкурировать с мембранно-связанной формой uPAR за связывание с лигандами, тем самым ограничивая поступление сигналов в клетку, внеклеточный протеолиз и адгезию. Такая высокоточная система регуляции стволовых клеток в составе «клеточных ниш» открывает новые возможности для разработки подходов к высокоспецифичному воздействию на эту систему. Выяснение механизмов, поддерживающих баланс пролиферации/апоптоза,

миграции и дифференцировки стволовых клеток, контролируемых компонентами урокиназной системы, представляет собой важную биологическую и медицинскую задачу, требующую скорейшего решения. Комбинированное таргетное воздействие, которое может включать в себя воздействие на систему uPA/PAI/uPAR в отдельности или в сочетании с воздействием на мишени упомянутой системы, может иметь большие шансы на успех в плане повышения тера-

певтического потенциала стволовых/прогениторных клеток или воздействия на опухолевые стволовые клетки при злокачественных новообразованиях. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ № 17-15-01368, РФФИ № 18-015-00430 (участие МСК в формировании «клеточных ниш» и регуляция их свойств с помощью компонентов урокиназной системы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tay J., Levesque J.P., Winkler I.G. // *Internat. J. Hematol.* 2017. V. 105. № 2. P. 129–140.
- Dergilev K.V., Rubina K.A., Parfenova E.V. // *Kardiologiya.* 2011. V. 51. № 4. P. 84–92.
- Méndez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., MacArthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N., Frenette P.S. // *Nature.* 2010. V. 466. № 7308. P. 829–834.
- Stepanova V.V., Tkachuk V.A. // *Biochemistry (Moscow).* 2002. V. 67. № 1. P. 109–118.
- Parfenova E.V., Plekhanova V.V., Stepanova V.V., Men'shikov M.I., Tsokaleva Z.I., Talitskiy K.A., Rakhmat-zade T.M., Traktuev D.O., Torosian N.A., Rogunova N.I., et al. // *Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 2004. V. 90. № 5. P. 547–568.
- Blasi F. // *Bioessays.* 1993. V. 15. № 2. P. 105–111.
- Tkachuk V.A., Stepanova V.V., Volynskaia E.A. // *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk.* 1998. V. 8. P. 36–41.
- Heissig B., Lund L.R., Akiyama H., Ohki M., Morita Y., Römer J., Nakauchi H., Okumura K., Ogawa H., Werb Z. // *Cell Stem Cell.* 2007. V. 1. № 6. P. 658–670.
- Philippou A., Maridaki M., Koutsilieris M. // *In Vivo.* 2008. V. 22. № 6. P. 735–750.
- Gutova M., Najbauer J., Frank R.T., Kendall S.E., Gevorgyan A., Metz M.Z., Guevorkian M., Edmiston M., Zhao D., Glackin C.A., et al. // *Cell Stem Cells.* 2008. V. 26. № 6. P. 1406–1413.
- Breznik B., Motaln H., Lah Turnšek T. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 398. № 7. P. 709–719.
- Saksela O., Hovi T., Vaheri A. // *J. Cell. Physiol.* 1985. V. 122. № 1. P. 125–132.
- Arefi'eva T.I., Mukhina S.A., Poliakov A.A., Stepanova V.V., Minashkin M.M., Gurskiy I.A.G., Domogatskiy S.P., Krasnikova T.L. // *Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 1998. V. 84. № 12. P. 1432–1437.
- Stump D.C., Thienpont M., Collen D. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 27. P. 12759–12766.
- Stepanova V., Dergilev K.V., Holman K.R., Parfyonova Y.V., Tsokolaeva Z.I., Teter M., Atochina-Vasserman E.N., Volgina A., Zaitsev S.V., Lewis S.P., et al. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 50. P. 20528–20543.
- Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T., Holterman A.L., Estes N., Cines D.B., Rao J.S., Gondi C.S. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 17. P. 2620–2632.
- Eaton D.L., Scott R.W., Baker J.B. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 10. P. 6241–6247.
- Plekhanova O.S., Stepanova V.V., Ratner E.I., Bobik A., Tkachuk V.A., Parfyonova Y.V. // *J. Vasc. Res.* 2006. V. 43. № 5. P. 437–446.
- Clowes A.W., Clowes M.M., Au Y.P., Reidy M.A., Belin D. // *Circ. Res.* 1990. V. 67. № 1. P. 61–67.
- Goncharova E.A., Vorotnikov A.V., Gracheva E.O., Wang C.L., Panettieri R.A. Jr, Stepanova V.V., Tkachuk V.A. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. № 1. P. 115–126.
- Pepper M.S., Vassalli J.D., Montesano R., Orci L. // *J. Cell Biol.* 1987. V. 105. № 1. P. 2535–2541.
- Parfenova E.V., Plekhanova O.S., Men'shikov M.I., Stepanova V.V., Tkachuk V.A. // *Ross. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova.* 2009. V. 95. № 5. P. 442–464.
- Günzler W.A., Steffens G.J., Otting F., Buse G., Flohé L. // *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiol. Chemie.* 1982. V. 363. № 2. P. 133–141.
- Apella E., Robinson E.A., Ullrich S.J., Stoppelli M.P., Corti A., Cassani G., Blasi F. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 10. P. 4437–4440.
- Blasi F., Sidenius N. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. № 9. P. 1923–1930.
- Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D., Poliakov A., Beabealashvily R., Gursky Y., Minashkin M., Shevelev A., Tkachuk V. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 16450–16458.
- Bdeir K., Kuo A., Sachais B.S., Rux A.H., Bdeir Y., Mazar A., Higazi A.A., Cines D.B. // *Blood.* 2003. V. 102. № 10. P. 3600–3608.
- Stepanova V., Lebedeva T., Kuo A., Yarovoi S., Tkachuk S., Zaitsev S., Bdeir K., Dumler I., Marks M.S., Parfyonova Y., et al. // *Blood.* 2008. V. 112. № 1. P. 100–110.
- Vassalli J.D., Baccino D., Belin D. // *J. Cell Biol.* 1985. V. 100. № 1. P. 86–92.
- Barnathan E.S., Kuo A., Kariko K., Rosenfeld L., Murray S.C., Behrendt N., Ronne E., Weiner D., Henkin J., Cines D.B. // *Blood.* 1990. V. 76. № 9. P. 1795–1806.
- Cao D., Mizukami I.F., Garni-Wagner B.A., Kindzelskii A.L., Todd R.F. 3rd, Boxer L.A., Petty H.R. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. № 4. P. 1817–1829.
- Okada S.S., Tomaszewski J.E., Barnathan E.S. // *Exp. Cell Res.* 1995. V. 217. № 3. P. 180–187.
- Zini J.M., Murray S.C., Graham C.H., Lala P.K., Kariko K., Barnathan E.S., Mazar A., Henkin J., Cines D.B., McCrae K.R. // *Blood.* 1992. V. 79. № 11. P. 2917–2929.
- Cubellis M.V., Noll M.L., Cassani G., Blasi F. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 34. P. 15819–15822.
- Estreicher A., Wohlwend A., Belin D., Schleuning W.D., Vassalli J.D. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 2. P. 1180–1189.
- Stoppelli M.P., Corti A., Soffientini A., Cassani G., Blasi F., Assoian R.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 15. P. 4939–4943.
- Hoyer-Hansen G., Ronne E., Solberg H., Behrendt N., Ploug M., Lund L.R., Ellis V., Danø K. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 25. P. 18224–18229.
- Danø K., Behrendt N., Brunner N., Ellis V., Ploug M., Pyke C. // *Fibrinolysis.* 1994. V. 8. P. 189–203.

39. Todd R.F. 3rd, Mizukami I.F., Vinjamuri S.D., Trochelman R.D., Hancock W.W., Liu D.Y. // *Blood Cells*. 1990. V. 16. № 1. P. 167–179.
40. Wang Y., Dang J., Johnson L.K., Selhamer J.J., Doe W.F. // *Eur. J. Biochem*. 1995. V. 227. № 1–2. P. 116–122.
41. Roldan A.L., Cubellis M.V., Masucci M.T., Behrendt N., Lund L.R., Danø K., Appella E., Blasi F. // *EMBO J*. 1990. V. 9. № 2. P. 467–474.
42. Ploug M., Rønne E., Behrendt N., Jensen A.L., Blasi F., Danø K. // *J. Biol. Chem*. 1991. V. 266. № 3. P. 1926–1933.
43. Behrendt N., Ronne E., Ploug M., Petri T., Lober D., Nielsen L.S. // *J. Biol. Chem*. 1990. V. 265. № 11. P. 6453–6460.
44. Montuori N., Visconte V., Rossi G., Ragno P. // *Thromb. Haemost.* 2005. V. 93. P. 192–198.
45. Leduc D., Beaufort N., de Bentzmann S., Rousselle J.C., Namane A., Chignard M., Pidard D. // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. P. 3848–3858.
46. Resnati M., Guttinger M., Valcamonica S., Sidenius N., Blasi F., Fazioli F. // *EMBO J*. 1996. V. 15. P. 1572–1582.
47. Hoyer-Hansen G., Rønne E., Solberg H., Behrendt N., Ploug M., Lund L.R., Ellis V., Danø K. // *J. Biol. Chem*. 1992. V. 267. P. 18224–18229.
48. Beaufort N., Leduc D., Rousselle J.C., Magdolen V., Luther T., Namane A., Chignard M., Pidard D. // *J. Immunol*. 2004. V. 172. P. 540–549.
49. Montuori N., Rossi G., Ragno P. // *FEBS Lett*. 1999. V. 460. P. 32–36.
50. Andolfo A., English W.R., Resnati M., Murphy G., Blasi F., Sidenius N. // *Thromb. Haemost.* 2002. V. 88. P. 298–306.
51. Ragno P., Montuori N., Covelli B., Hoyer-Hansen G., Rossi G. // *Cancer Res*. 1998. V. 58. № 6. P. 1315–1319.
52. Mustjoki S., Sidenius N., Sier C.F., Blasi F., Elonen E., Alitalo R., Vaheri A. // *Cancer Res*. 2000. V. 60. P. 7126–7132.
53. Montuori N., Bifulco K., Carriero M.V., La Penna C., Visconte V., Alfano D., Pesapane A., Rossi F.W., Salzano S., Rossi G., Ragno P. // *Cell Mol. Life Sci*. 2011. V. 68. № 14. P. 2453–2467.
54. Barinka C., Parry G., Callahan J., Shaw D.E., Kuo A., Bdeir K., Cines D.B., Mazar A., Lubkowsky J. // *J. Mol. Biol*. 2006. V. 363. № 2. P. 482–495.
55. Manchanda N., Schwartz B.S. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 34. P. 20032–20035.
56. Reinartz J., Schaefer B., Bechtel M.J., Kramer M.D. // *Exp. Cell Res*. 1996. V. 223. № 1. P. 91–101.
57. Baker J.B., Low D.A., Simmer R.L., Cunningham D.D. // *Cell*. 1980. V. 21. № 1. P. 37–45.
58. Geiger M., Huber K., Wojta J., Stingl L., Espana F., Griffin J.H., Binder B.R. // *Blood*. 1989. V. 74. № 2. P. 722–728.
59. Potempa J., Korzus E., Travis J. // *J. Biol. Chem*. 1994. V. 269. № 3. P. 15957–15960.
60. Ehrlich H.J., Keijer J., Preissner K.T., Gebbink R.K., Pannekoek H. // *Biochemistry*. 1991. V. 30. № 4. P. 1021–1028.
61. Deng G., Royle G., Seiffert D., Loskutoff D.J. // *Thromb. Haemost.* 1995. V. 74. № 1. P. 66–70.
62. Cubellis M.V., Noll M.L., Cassani G., Blasi F. // *J. Biol. Chem*. 1986. V. 261. № 34. P. 15819–15822.
63. Ellis V., Wun T.C., Behrendt N., Ronne E., Danø K. // *J. Biol. Chem*. 1990. V. 265. № 17. P. 9904–9908.
64. Laiho M., Saksela O., Keski-Oja J. // *J. Biol. Chem*. 1987. V. 262. № 36. P. 17467–17474.
65. Planus E., Barlovatz-Meimon G., Rogers R.A., Bonavaud S., Ingber D.E., Wang N. // *J. Cell Sci*. 1997. V. 110. № 9. P. 1091–1098.
66. Nykjaer A., Conese M., Christensen E.I., Olson D., Cremona O., Gliemann J., Blasi F. // *EMBO J*. 1997. V. 16. № 10. P. 2610–2620.
67. Antalis T.M., Clark M.A., Barnes T., Lehrbach P.R., Devine P.L., Schevzov G., Goss N.H., Stephens R.W., Tolstoshev P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. № 4. P. 985–989.
68. Kruithof E.K., Baker M.S., Bunn C.L. // *Blood*. 1995. V. 86. № 11. P. 4007–4024.
69. Kumar S., Baglioni C. // *J. Biol. Chem*. 1991. V. 266. № 31. P. 20960–20964.
70. Dickinson J.L., Bates E.J., Ferrante A., Antalis T.M. // *J. Biol. Chem*. 1995. V. 270. № 46. P. 27894–27904.
71. Antalis T.M., La Linn M., Donnan K., Mateo L., Gardner J., Dickinson J.L., Buttigieg K., Suhrbier A. // *J. Exp. Med*. 1998. V. 187. № 11. P. 1799–1811.
72. Taichman R.S., Emerson S.G. // *J. Exp. Med*. 1994. V. 179. № 5. P. 1677–1682.
73. Gao X., Xu C., Asada N., Frenette P.S. // *Development*. 2018. V. 145. № 2. P. 1391–1432.
74. Tjwa M., Sidenius N., Moura R., Jansen S., Theunissen K., Andolfo A., De Mol M., Dewerchin M., Moons L., Blasi F., et al // *J. Clin. Invest*. 2009. V. 119. № 4. P. 1008–1018.
75. Selleri C., Montuori N., Salvati A., Serio B., Pesapane A., Ricci P., Gorrasi A., Li Santi A., Hoyer-Hansen G., Ragno P. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 37. P. 60206–60217.
76. Theien B.E., Vanderlugt C.L., Nickerson-Nutter C., Cornebise M., Scott D.M., Perper S.J., Whalley E.T., Miller S.D. // *Blood*. 2003. V. 102. № 13. P. 4464–4471.
77. Wright T., Hidalgo A., Rodríguez-Frade J.M., Soriano S.F., Mellado M., Parmo-Cabañas M., Briskin M.J., Teixeiro J. // *J. Immunol: Official J. Am. Assoc. Immunol*. 2002. V. 168. № 10. P. 5268–5277.
78. Sidenius N., Blasi F. // *FEBS Lett*. 2000. V. 470. № 1. P. 40–46.
79. Blasi F., Carmeliet P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2002. V. 3. № 12. P. 932–943.
80. Tarui T., Mazar A.P., Cines D.B., Takada Y. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. № 6. P. 3983–3990.
81. Montuori N., Ragno P. // *Front. Biosci*. 2009. V. 14. P. 2494–2503.
82. Selleri C., Montuori N., Ricci P., Visconte V., Baiano A., Carriero M.V., Rotoli B., Rossi G., Ragno P. // *Cancer Res*. 2006. V. 66. P. 10885–10890.
83. Montuori N., Carriero M.V., Salzano S., Rossi G., Ragno P. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. № 49. P. 46932–46939.
84. Lu W., Li X. // *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS*. 2018. V. 75. № 5. P. 859–869.
85. Tkachuk V.A., Plekhanova O.S., Parfyonova Y.V. // *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2009. V. 87. № 4. P. 231–251.
86. Kapustin A., Stepanova V., Aniol N., Cines D.B., Poliakov A., Yarovoi S., Lebedeva T., Wait R., Ryzhakov G., Parfyonova Y., et al. // *Biochem. J*. 2012. V. 443. № 2. P. 491–503.
87. Stepanova V., Jayaraman P.S., Zaitsev S.V., Lebedeva T., Bdeir K., Kershaw R., Holman K.R., Parfyonova Y.V., Semina E.V., Beloglazova I.B., Tkachuk V.A., Cines D.B. // *J. Biol. Chem*. 2016. V. 291. № 29. P. 15029–15045.
88. Loscalzo J. // *Semin. Thromb. Hemost.* 1996. V. 22. № 6. P. 503–506.
89. Binder B.R., Mihaly J., Prager G.W. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 97. № 3. P. 336–342.
90. Basire A., Sabatier F., Ravet S., Lamy E., Mialhe A., Zabou G., Paul P., Gurewich V., Sampol J., Dignat-George F. // *Thromb. Haemost.* 2006. V. 95. № 4. P. 678–688.
91. Margheri F., Chillà A., Laurenzana A., Serrati S., Mazzanti B., Saccardi R., Santosuoso M., Danza G., Sturli N., Rosati F., et al. // *Blood*. 2011. V. 118. № 13. P. 3743–3755.
92. Burgermeister E., Liscovitch M., Röcken C., Schmid R.M., Ebert M.P. // *Cancer Lett*. 2008. V. 268. № 2. P. 187–201.
93. Basire A., Sabatier F., Ravet S., Lamy E., Mialhe A., Zabou

- G., Paul P., Gurewich V., Sampol J., Dignat-George F. // *Thromb. Haemost.* 2006. V. 95. № 4. P. 678–688.
94. van Beem R.T., Verloop R.E., Kleijer M., Noort W.A., Loof N., Koolwijk P., van der Schoot C.E., van Hinsbergh V.W., Zwaginga J.J. // *J. Thromb. Haemost.: JTH.* 2009. V. 7. № 1. P. 217–226.
95. Li W.D., Hu N., Lei F.R., Wei S., Rong J.J., Zhuang H., Li X.Q. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 466. № 3. P. 376–380.
96. Mauro A. // *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961. V. 9. P. 493–495.
97. Baghdadi M.B., Tajbakhsh S. // *Dev. Biol.* 2018. V. 433. № 2. P. 200–209.
98. Guthridge M., Wilson M., Cowling J., Bertolini J., Hearn M.T. // *Growth Factors.* 1992. V. 6. № 1. P. 53–63.
99. Fibbi G., Barletta E., Dini G., Del Rosso A., Pucci M., Cerletti M., Del Rosso M. // *Lab. Invest.; J. Tech. Meth. Pathol.* 2001. V. 81. № 1. P. 27–39.
100. Wells J.M., Strickland S. // *J. Cell. Physiol.* 1997. V. 171. № 2. P. 217–225.
101. Lluís F., Roma J., Suelves M., Parra M., Anierte G., Gallardo E., Illa I., Rodríguez L., Hughes S.M., Carmeliet P., et al. // *Blood.* 2001. V. 97. № 6. P. 1703–1711.
102. Fibbi G., D'Alessio S., Pucci M., Cerletti M., Del Rosso M. // *Biol. Chem.* 2002. V. 383. № 1. P. 127–136.
103. Muñoz-Cánoves P., Miralles F., Baiget M., Félez J. // *Thromb. Haemost.* 1997. V. 77. № 3. P. 526–534.
104. Bonavaud S., Charrière-Bertrand C., Rey C., Leibovitch M.P., Pedersen N., Frisdal E., Planus E., Blasi F., Gherardi R., Barlovatz-Meimon G. // *J. Cell Sci.* 1997. V. 110. № 9. P. 1083–1089.
105. Ferraro F., Celso C.L., Scadden D. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. V. 695. P. 155–168.
106. Roura S., Gálvez-Montón C., Mirabel C., Vives J., Bayes-Genis A. // *Stem Cell Res. Therapy.* 2017. V. 8. № 1. P. 238.
107. Sun K., Zhou Z., Ju X., Zhou Y., Lan J., Chen D., Chen H., Liu M., Pang L. // *Stem Cell Res. Therapy.* 2016. V. 7. № 1. P. 151.
108. Kfoury Y., Scadden D.T. // *Cell Stem Cell.* 2015. V. 16. № 3. P. 239–253.
109. Gu W., Hong X., Potter C., Qu A., Xu Q. // *Microcirculation: Official J. Microcirculatory Soc., Inc.* 2017. V. 24. № 1.
110. Chiellini C., Cochet O., Negroni L., Samson M., Poggi M., Ailhaud G., Alessi M.C., Dani C., Amri E.Z. // *BMC Mol. Biol.* 2008. V. 26. № 9. P. 26.
111. Коптелова Н.В., Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Сухарева О.Ю., Дыйканов Д.Т., Ратнер Е.И., Акоюян Ж.А., Шестакова М.В., Парфёнова Е.В. // *Технологии живых систем.* 2016. V. 13. № 8. P. 4–13.
112. Ghajar S.C.M., Kachgal S., Kniazeva E., Mori H., Costes S.V., George S.C., Putnam A.J. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 5. P. 813–825.
113. Meirelles Lda.S., Fontes A.M., Covas D.T., Caplan A.I. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009. V. 20. № 5. P. 419–427.
114. Plekhanova O.S., Stepanova V.V., Ratner E.I., Bobik A., Tkachuk V.A., Parfyonova Y.V. // *J. Vasc. Res.* 2006. V. 43. № 5. P. 437–446.
115. Mukhina S., Stepanova V., Traktouev D., Poliakov A., Beabealashvilly R., Gursky Y., Minashkin M., Shevelev A., Tkachuk V. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 16450–16458.
116. Beloglazova I., Dergilev K., Zubkova E., Ratner E., Molokotina Y., Tsokolaeva Z., Dyikanov D., Parfyonova Y. // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 1. P. 275.
117. Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Tsokolaeva Z.I., Stafeev Y.S., Dergilev K.V., Ratner E.I., Shestakova M.V., Sukhareva O.Y., Parfenova E.V., Men'shikov M.Y. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. V. 161. № 6. P. 775–778.
118. Chabot V., Dromard C., Rico A., Langonné A., Gaillard J., Guilloton F., Casteilla L., Sensebé L. // *Stem Cell Res. Therapy.* 2015. V. 6. P. 188.
119. Kanno Y., Matsuno H., Kawashita E., Okada K., Suga H., Ueshima S., Matsuo O. // *Thromb. Haemost.* 2010. V. 104. № 6. P. 1124–1132.
120. Kalbasi Anaraki P., Patecki M., Larmann J., Tkachuk S., Jurk K., Haller H., Theilmeier G., Dumler I. // *Stem Cells Dev.* 2014. V. 23. № 4. P. 352–362.
121. Gilbert P.M., Havenstrite K.L., Magnusson K.E., Sacco A., Leonardi N.A., Kraft P., Nguyen N.K., Thrun S., Lutolf M.P., Blau H.M. // *Science.* 2010. V. 329. № 5995. P. 1078–1081.
122. Bonnet D., Dick J.E. // *Nat. Med.* 1997. V. 3. № 7. P. 730–737.
123. Zhang S., Balch C., Chan M.W., Lai H.C., Matei D., Schilder J.M., Yan P.S., Huang T.H., Nephew K.P. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 11. P. 4311–4320.
124. Maitland N.J., Collins A.T. // *J. Clin. Oncol.: Official J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 17. P. 2862–2870.
125. Li C., Heidt D.G., Dalerba P., Burant C.F., Zhang L., Adsay V., Wicha M., Clarke M.F., Simeone D.M. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 3. P. 1030–1037.
126. O'Brien C.A., Pollett A., Gallinger S., Dick J.E. // *Nature.* 2007. V. 445. № 7123. P. 106–110.
127. Singh S.K., Clarke I.D., Terasaki M., Bonn V.E., Hawkins C., Squire L.P., Dirks P.B. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 18. P. 5821–5828.
128. Jo M., Eastman B.M., Webb D.L., Stoletov K., Klemke R., Gonias S.L. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 21. P. 8948–8958.
129. Morel A.P., Lièvre M., Thomas C., Hinkal G., Ansieau S., Puisieux A. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 8. P. e2888.
130. Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., et al. // *Cell.* 2008. V. 133. № 4. P. 704–715.
131. Puisieux A., Brabletz T., Caramel J. // *Nat. Cell Biol.* 2014. V. 16. № 6. P. 488–494.
132. Jo M., Lester R.D., Montel V., Eastman B., Takimoto S., Gonias S.L. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 34. P. 22825–22833.
133. Lester R.D., Jo M., Montel V., Takimoto S., Gonias S.L. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 178. № 3. P. 425–436.
134. Naldini L., Tamagnone L., Vigna E., Sachs M., Hartmann G., Birchmeier W., Daikuhara Y., Tsubouchi H., Blasi F., Comoglio P.M. // *EMBO J.* 1992. V. 11. P. 4825–4833.
135. Duffy M.J. // *Curr. Pharmaceut. Design.* 2004. V. 10. № 1. P. 39–49.
136. Rifkin DB. // *Fibrinol. Proteolysis.* 1997. V. 1. № 11. P. 3–9.
137. Plouët J., Moro F., Bertagnolli S., Coldeboeuf N., Mazarguil H., Clamens S., Bayard F. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 20. P. 13390–13396.
138. Mars W.M., Zarnegar R., Michalopoulos G.K. // *Am. J. Pathol.* 1993. V. 143. № 3. P. 949–958.
139. Czekay R.P., Aertgeerts K., Curriden S.A., Loskutoff D.J. // *J. Cell Biol.* 2003. V. 160. № 5. P. 781–791.
140. Cubellis M.V., Wun T.C., Blasi F. // *EMBO J.* 1990. V. 9. № 4. P. 1079–1085.
141. Asuthkar S., Stepanova V., Lebedeva T., Holterman A.L., Estes N., Cines D.B., Rao J.S., Gondi C.S. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 17. P. 2620–2632.
142. Stepanova V., Jayaraman P.S., Zaitsev S.V., Lebedeva T., Bdeir K., Kershaw R., Holman K.R., Parfyonova Y.V., Semina E.V., Beloglazova I.B., Tkachuk V.A., Cines D.B. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 29. P. 15029–15045.
143. Jia W., Yao Z., Zhao J., Guan Q., Gao L. // *Life Sci.* 2017. V. 186. P. 1–10.
144. Chen Z., Xu X. // *Saudi Med. J.* 2016. V. 37. № 12. P. 1312–1318.

145. Blom J.N., Feng Q. // *Pharmacol. Ther.* 2018. V. 186. P. 114–129.
146. Pavón M.A., Arroyo-Solera I., Céspedes M.V., Casanova I., León X., Mangués R. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 35. P. 57351–57366.
147. Dergilev K.V., Rubina K.A., Tsokolaeva Z.I., Sysoeva V.Iu., Gmyzina A.I., Kalinina N.I., Beliavskaia T.M., Akchurin R.S., Parfenova Ye.V., Tkachuk V.A. // *Tsitologiya.* 2010. V. 52. № 11. P. 921–930.
148. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Makarevich P.I., Boldyreva M.A., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Sharonov G.V., Akchurin R.S., Parfyonova Ye.V. // *Tsitologiya.* 2016. V. 58. № 5. P. 340–348.
149. Dergilev K.V., Rubina K.A., Parfenova E.V. // *Kardiologiya.* 2011. V. 51. № 4. P. 84–92.
150. Dergilev K.V., Tsokolaeva Z.I., Beloglazova I.B., Zubkova E.S., Boldyreva M.A., Ratner E.I., Dykanov D.T., Menshikov M.Yu., Parfyonova Ye.V. // *Genes Cells.* 2018. V. 13. № 1. P. 75–81.
151. Traktuev D.O., Tsokolaeva Z.I., Shevelev A.A., Talitskiy K.A., Stepanova V.V., Johnstone B.H., Rahmat-Zade T.M., Kapustin A.N., Tkachuk V.A., March K.L., Parfyonova Ye.V. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 11. P. 1939–1946.
152. Dergilev K., Tsokolaeva Z., Beloglazova I., Zubkova E., Parfyonova Ye. // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. Suppl. S1. P. 156–157.
153. Dergilev K., Tsokolaeva Z., Makarevich P., Beloglazova I., Zubkova E., Boldyreva M., Ratner E., Dykanov D., Menshikov M., Ovchinnikov A., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2018. V. 18. P. 3536854.
154. Kugler M.C., Wei Y., Chapman H.A. // *Curr. Pharm. Des.* 2003. V. 9. № 19. P. 1565–1574.
155. Simon D.I., Wei Y., Zhang L., Rao N.K., Xu H., Chen Z., Liu Q., Rosenberg S., Chapman H.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 14. P. 10228–10234.
156. Wei Y., Lukashev M., Simon D.I., Bodary S.C., Rosenberg S., Doyle M.V., Chapman H.A. // *Science.* 1996. V. 273. № 5281. P. 1551–1555.
157. Wei Y., Eble J.A., Wang Z., Kreidberg J.A., Chapman H.A. // *Mol. Biol. Cell.* 2001. V. 12. № 10. P. 2975–2986.

УДК 577.151.4; 579.253.4

Бактериальные ферменты и резистентность к антибиотикам

А. М. Егоров, М. М. Уляшова, М. Ю. Рубцова*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2018

Принята к печати 29.08.2018

РЕФЕРАТ Резистентность к антибиотикам развивается уже более 2 млрд лет и широко распространена среди микроорганизмов. Ключевую роль в формировании резистентности играют бактериальные ферменты, классификация которых основана на участии в различных каталитических процессах: модификации ферментов, являющихся мишенями антибиотиков, и внутриклеточных мишеней, трансформации молекул антибиотиков и осуществлении реакций клеточного метаболизма. Основные механизмы развития резистентности связаны с эволюцией суперсемейств бактериальных ферментов, обусловленной изменчивостью кодирующих их генов, совокупность которых получила название «резистом». Десятки тысяч ферментов и их мутантов, реализующих различные механизмы резистентности, образуют новое сообщество, названное «энзистом». Анализ структуры и функциональных особенностей ферментов – мишеней разных классов антибиотиков, позволит выработать новые стратегии преодоления резистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотики, антибиотикорезистентность, классы ферментов, мутантные формы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АБП – антибактериальные препараты; АГМФ – аминогликозидмодифицирующие ферменты; БЛРС – β -лактамазы расширенного спектра; МБЛ – металло- β -лактамазы; МКЛС – макролиды, кетолиды, линкозамиды и стрептограмин; ПСБ – пенициллинсвязывающие белки; ААС – аминогликозид-N-ацетилтрансферазы; АНТ – аминогликозид-O-аденилилтрансферазы; АРН – аминогликозид-O-фосфотрансферазы; САТ – хлорамфеникол-ацетилтрансфераза; МРН – макролидные фосфотрансферазы; НАГ – N-ацетилглюкозамин; НАМ – N-ацетилмурамовая кислота; QRDR – область, детерминирующая устойчивость к хинолонам; SAM – S-аденозил-L-метионин.

ВВЕДЕНИЕ

Резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам является глобальной проблемой биологии и медицины [1, 2]. Современные антибактериальные препараты (АБП) представляют самую большую группу фармацевтических препаратов, включающую 16 классов соединений как природного происхождения, так и химически синтезированных (рис. 1).

Синтез антибиотиков существует в природе более 2 млрд лет, и все это время у бактерий развиваются механизмы резистентности к их токсическому действию. Резистентность может возникать как адаптивный процесс, не связанный со структурой антибиотика, или развиваться как результат селекции устойчивых штаммов микроорганизмов под действием антибиотиков. Под действием антропогенных факторов, связанных с применением антибиотиков с середины XX века в медицине и особенно в сельском хозяйстве, механизмы резистентности значительно эволюционировали, при этом существенно сократилось время появления устойчивости к новым препаратам [3, 4].

Роль бактериальных ферментов в формировании резистентности разнообразна и включает несколько основных механизмов (рис. 2) [5]. Ферменты, участвующие в процессах биосинтеза клеточной стенки, синтезе нуклеиновых кислот и метаболитов, служат непосредственной мишенью антибиотиков. Механизмом резистентности являются структурные изменения этих ферментов. Другой механизм связан с ферментативной модификацией структурных элементов, на которые действуют антибиотики, например, модификация рибосом метилтрансферазами. Большая группа ферментов модифицирует или разрушает структуру самих антибиотиков, инактивируя их. В формировании резистентности участвуют также ферменты, катализирующие метаболические процессы, модифицирующие АБП в форме пролекарств.

Бактериальные ферменты, определяющие резистентность, входят, как правило, в состав больших суперсемейств, и многие из них произошли от ферментов, изначально имевших другие функции [6]. Гены, ответственные за синтез этих ферментов и их

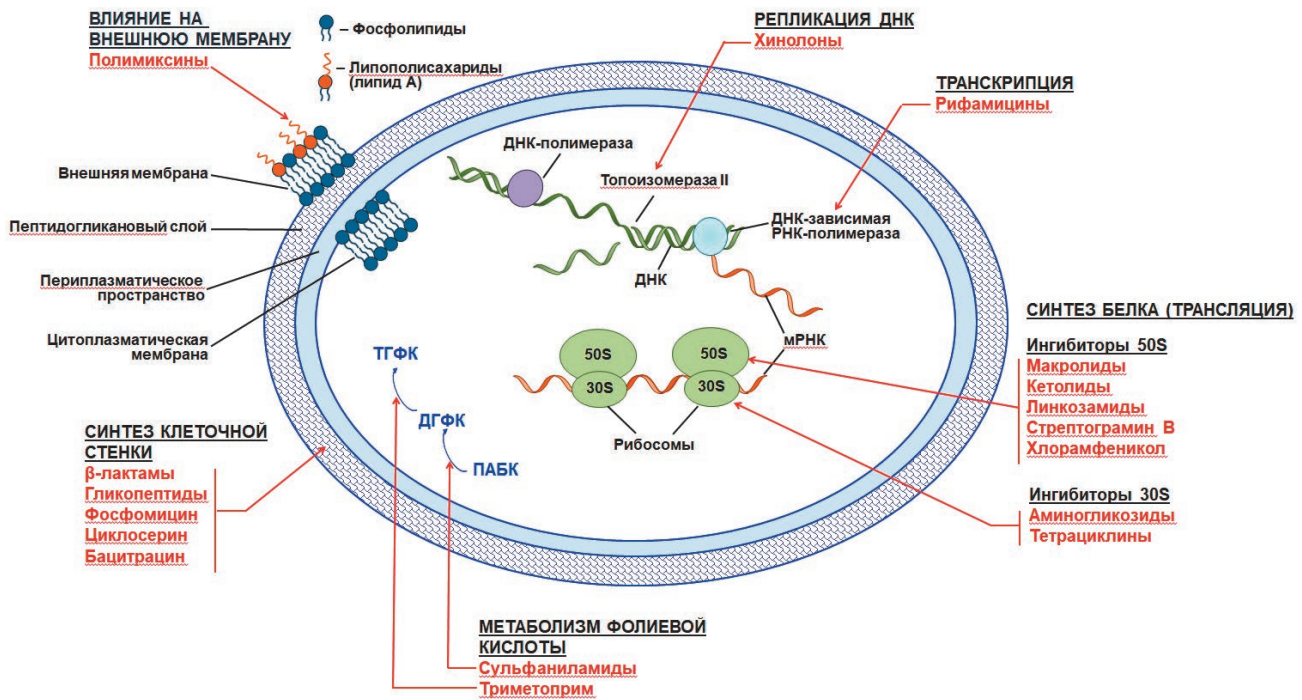


Рис. 1. Основные классы антибактериальных препаратов, их мишени и влияние на основные процессы жизнедеятельности бактериальной клетки



Рис. 2. Классы ферментов, участвующих в различных механизмах резистентности к АБП

мутационную изменчивость, часто локализованы на мобильных генетических элементах, что обеспечивает быстрое распространение резистентности между микроорганизмами.

В обзоре представлены данные о функциональных особенностях основных классов и групп бактериальных ферментов, участвующих в реализации механизмов резистентности бактерий к АБП.

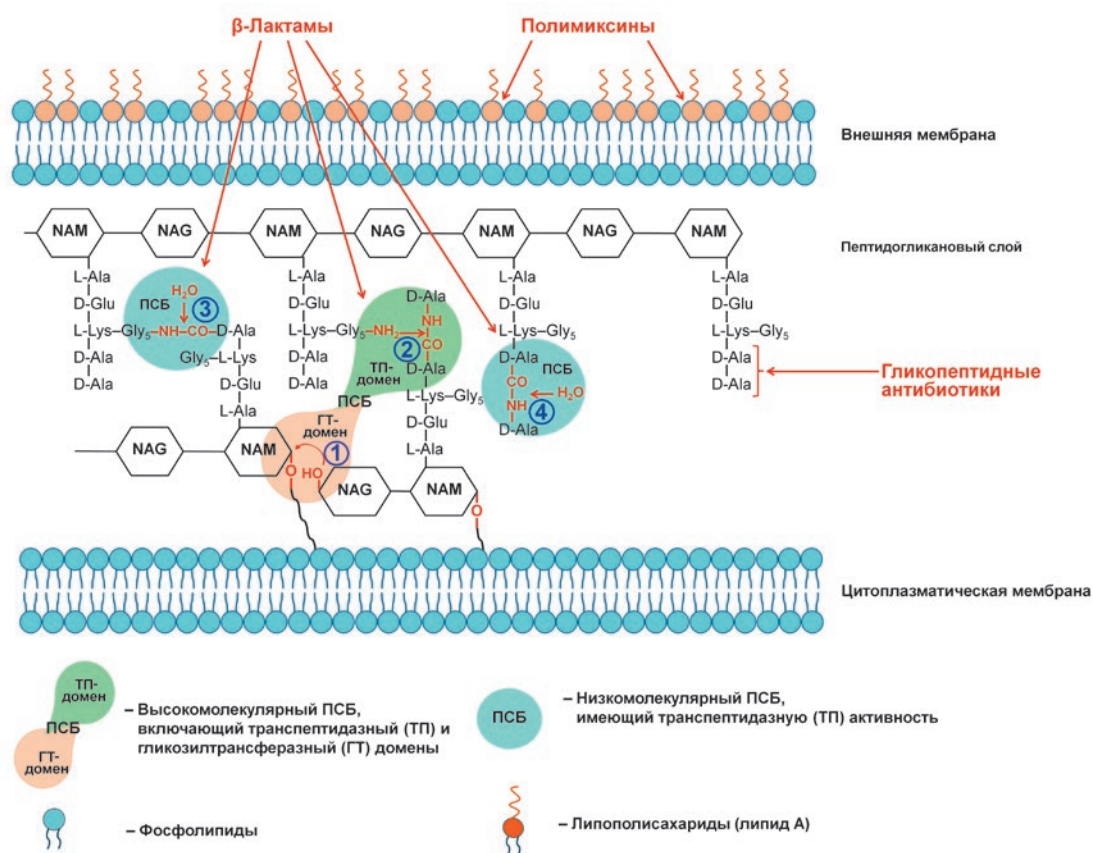


Рис. 3. Структура пептидогликана клеточной стенки бактерий и участие пенициллинсвязывающих белков в его синтезе: 1 – трансгликозилазная реакция, 2 – транспептидазная реакция, 3 – эндопептидазная реакция, 4 – карбокси-пептидазная реакция

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – МИШЕНИ АБП

Пенициллинсвязывающие белки

Пенициллинсвязывающие белки (ПСБ) играют ключевую роль в синтезе пептидогликана – основного компонента клеточных стенок бактерий, и являются мишенью действия β-лактамных антибиотиков. Пептидогликан представляет собой полимер, состоящий из чередующихся остатков N-ацетилглюкозамина (NAG) и N-ацетилмурамовой кислоты (NAM) (рис. 3). Ко всем остаткам NAM присоединены пептиды из L-Ala, D-Glu, мезо-диаминопимелиновой кислоты или L-Lys и двух остатков D-Ala [7]. ПСБ связаны с внутренней мембраной клетки или находятся в свободном виде в цитоплазме [8, 9]. ПСБ делят на высокомолекулярные (> 50 кДа), состоящие из двух доменов, и низкомолекулярные (< 50 кДа).

N-Концевой домен высокомолекулярных ПСБ катализирует реакции трансгликозилирования (последовательное удлинение гликановых цепей присоединением NAG-NAM-пентапептида к гликановому остову, 1 на рис. 3), C-концевой домен – транспептидазные реакции (образование поперечных сшивок пептидных остатков двух гликановых цепей, 2 на рис. 3). Низкомолекулярные ПСБ предотвращают

образование поперечных сшивок в пептидогликане, они катализируют эндопептидазные (гидролиз пептидной связи, соединяющей две гликановые цепи, 3 на рис. 3) и карбоксипептидазные (гидролиз связи в дипептиде D-Ala-D-Ala, 4 на рис. 3) реакции.

C-Концевые домены всех ПСБ являются мишенью β-лактамных антибиотиков, которые составляют более половины всех используемых АБП [10]. Эти антибиотики содержат β-лактамное кольцо, являющееся структурным аналогом дипептида D-Ala-D-Ala, и поэтому действуют как конкурентные ингибиторы ПСБ. В результате взаимодействия карбонила β-лактамного кольца с гидроксильной группой серина в активном центре ПСБ образуется неактивная ацилированная форма фермента. Необратимое ингибирование нарушает синтез клеточной стенки бактерий [9, 10].

Основные причины резистентности грамположительных бактерий к β-лактамным антибиотикам – мутации нативных ПСБ, их гиперпродукция и синтез новых ПСБ, малочувствительных к ингибированию β-лактамами [11]. В настоящее время угрозой представляется распространение штаммов *Staphylococcus aureus*, устойчивых к метициллину и другим полусинтетическим пенициллинам и цефалоспорином [12]. Резистентность обусловлена экс-

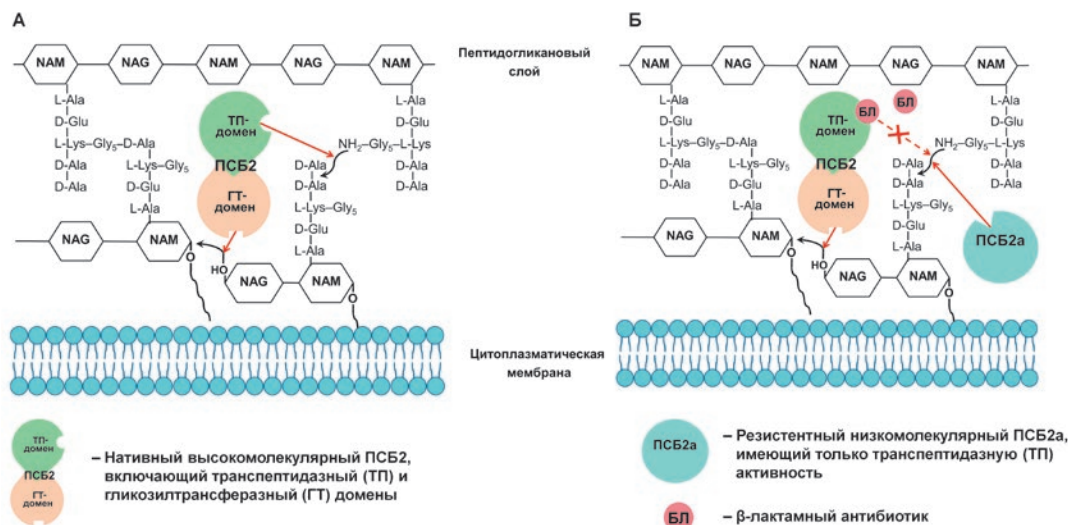


Рис. 4. Роль пенициллинсвязывающих белков в резистентности грамположительных бактерий к β -лактамным антибиотикам. А — чувствительный штамм, Б — резистентный штамм

прессией в дополнение к четырем нативным ПСБ пятого фермента ПСБ2а, который характеризуется низким сродством к β -лактамным антибиотикам и обладает только транспептидазной активностью. Механизм резистентности представлен на рис. 4: в отсутствие антибиотика в биосинтезе пептидогликана участвуют оба домена высокомолекулярного ПСБ (А), в присутствии антибиотика у высокомолекулярного ПСБ активным остается только гликозилтрансферазный домен, транспептидазный домен ацилируется и не образует поперечные сшивки. У резистентного штамма транспептидазную активность проявляет приобретенный низкомолекулярный ПСБ2а (Б), что восстанавливает жизнеспособность клеток.

Ферменты типа ПСБ2а кодируются генами *mecA* [13] или *mecC* [14]. Гены *mecA* и *mecC* вместе с генами, регулирующими их экспрессию (*mecI*, *mecR1* и *mecR2*), входят в состав мобильного генетического элемента «стафилококковой хромосомной кассеты *mec*» [15].

Белки, входящие в семейство ПСБ, ключевые для формирования клеточной стенки бактерий, являются также предшественниками резистентности, обусловленной продукцией β -лактамаз (раздел « β -Лактамазы»).

Топоизомеразы типа II: ДНК-гираза и топоизомераза IV

Топоизомеразы типа II включают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV, которые катализируют изменения пространственной конфигурации молекулы ДНК в процессах репликации, транскрипции и деления клеток [16, 17]. ДНК-гираза и топоизомераза IV представляют собой гетеротетрамерные ферменты: ДНК-гираза состоит из двух субъединиц GyrA (97 кДа)

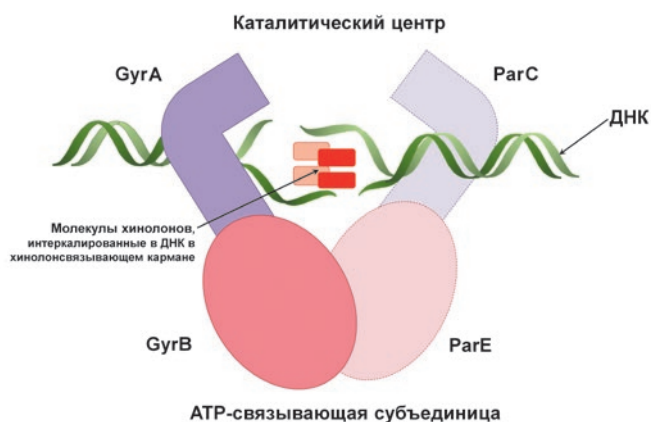


Рис. 5. Схема структуры тройного комплекса топоизомеразы типа II с ДНК и хинолонами (GyrA, GyrB — субъединицы гиразы, ParC, ParE — субъединицы топоизомеразы IV)

и двух субъединиц GyrB (90 кДа); топоизомераза IV состоит из двух субъединиц ParC (84 кДа) и двух ParE (70 кДа). Субъединицы GyrA и ParC образуют каталитические домены, участвующие в образовании комплексов с молекулой ДНК для ее разрыва/лигирования, субъединицы GyrB и ParE обладают АТФ-азной активностью для энергообеспечения процесса.

ДНК-гираза и топоизомераза IV служат мишенью хинолонов и их производных — фторхинолонов. Необходимым условием ингибирования является образование комплекса ДНК с топоизомеразой типа II (рис. 5). Участок связывания антибиотика с ферментом в составе тройного комплекса получил название «хинолоновый карман» [17, 18].

GyrA	A	R	K	Y	H	G	D	S	A	D	T	Q	S	Q
	67	68	76	77	80	81	82	83	84	87	88	94	97	106
	S	S	T	S	N	C	G	L	P	N	P	L	L	H
					D			Y		Y				S
								A		G				
								W		H				
								I		E				
								F		V				
								V						
								T						

ParC	V	D	K	Y	H	G	D	S	A	D	T	Q
	67	69	74	77	78	80	84	86	87	91	93	100
	I	E	S	P	C	I	G	V	G	S	L	A
						R	A					
						L	K					
							V					
							N					
							D					

Рис. 6. Аминокислотные мутации в области QRDR субъединиц GyrA и ParC топоизомераз типа II бактерий *E. coli*, определяющие резистентность к хинолонам. Цветом выделены положения мутаций, сочетание которых вызывает синергический эффект

Антибиотик нековалентно связывается с активным центром фермента, в результате чего продвижение фермента и, следовательно, репликационной вилки вдоль молекулы ДНК останавливается [19]. Формирование тройного комплекса хинолон–топоизомераза типа II–ДНК останавливает не только репликацию, но и транскрипцию, так как блокируется движение РНК-полимеразы по ДНК-матрице [20]. При этом в двухцепочечной молекуле ДНК формируются разрывы, что также обуславливает бактерицидное действие хинолонов [21]. Хинолоны не действуют на топоизомеразы типа II млекопитающих вследствие их существенных отличий от топоизомераз бактерий.

Развитие резистентности к хинолонам связано, в первую очередь, со снижением эффективности их взаимодействия с комплексом ДНК–топоизомераза типа II вследствие мутаций в генах, приводящих к аминокислотным заменам в области «хинолонового кармана». Участки генов, в которых происходят мутации, получили название QRDR (quinolone resistance determining region – область, детерминирующая устойчивость к хинолонам). Эти мутации локализованы у бактерий большей частью в N-концевой части субъединицы GyrA (участок между остатками 67–106 по нумерации *Escherichia coli*) и/или субъединицы ParC (аминокислотные остатки 63–102) (на рис. 6 приведены мутации у бактерий *E. coli*), но могут также затрагивать субъединицы GyrB и ParE [18]. Степень снижения чувствительности к антибиотику зависит от типа мутации и формируется постепенно: сначала мутации возникают в одном ферменте и только позже в другом. Замена одной аминокислоты в положении 67 субъединицы GyrA у *E. coli* приводит к увеличению МПК всех фторхинолонов в 4 раза, в положении 81 той же субъединицы – в 8 раз, в положении 87 – в 16 раз, в положении 83 – в 32 раза [22]. У штаммов микроорганизмов с высоким уровнем резистентности к хи-

нолонам гены обеих субъединиц содержат несколько мутаций, при этом часто наблюдается синергический эффект. Так, при сочетании мутаций в положениях 83 и 87 GyrA и в положении 80 ParC МПК фторхинолонов повышается уже более чем в 4000 раз [22].

ДНК-зависимая РНК-полимераза

Бактерицидное действие рифамицинов (рифампицин, рифабутин) состоит в ингибировании ДНК-зависимой РНК-полимеразы [23]. Этот фермент состоит из пяти субъединиц: двух α (молекулярная масса каждой 35 кДа), β – (155 кДа), β' – (165 кДа) и σ – (70 кДа). Четыре субъединицы $\beta\beta'\alpha\alpha$ образуют так называемый апофермент, обладающий каталитической активностью и осуществляющий все основные этапы транскрипции. Для начала транскрипции и распознавания промоторов бактериальных генов требуется образование холофермента, происходящее при присоединении регуляторной σ -субъединицы к апоферменту [24].

Рифамицины селективно связываются с β -субъединицей фермента вблизи главного канала и блокируют элонгацию зарождающейся цепи РНК. Возникновение резистентности к рифамицинам в большинстве случаев связано с мутациями в сравнительно небольшом фрагменте гена *proB* (кодоны 507–533), кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы. Наибольшим полиморфизмом характеризуются мутации аминокислотных остатков в положениях 513, 516, 526 и 531 (рис. 7) [25].

Ферменты биосинтеза миколовых кислот

Миколовые кислоты – обобщенное название группы длинноцепочечных разветвленных жирных кислот, компонентов клеточной стенки микобактерий. Синтез миколовых кислот подавляют некоторые противотуберкулезные препараты – производные изоникотиновой кислоты (изониазид, этионамид и протиона-

RpoB	507 G	508 T	510 Q	511 L	512 S	513 Q	514 F	515 M	516 D	517 Q	518 N	519 N	521 L	522 S	525 T	526 H	527 L	528 R	529 R	531 S	533 L
	D	A	H	R	T	K	L	V	V	E	H	K	M	L	N	Y	N	P	K	L	P
	S			V	R	P			Y		S			E		D	H	E		W	L
			P			E			G							R				F	
								K	A							L				Y	
								A	N							C				C	
																P				Q	
																N					
																T					
																Q					
																V					
																E					

Рис. 7. Аминокислотные мутации фрагмента RpoB β-субъединицы РНК-полимеразы, определяющие резистентность к рифамицинам

мид) [25, 26]. Действие этих препаратов направлено на редуктазу белка-переносчика еноил-ацильного радикала InhA, которая входит в состав синтазы жирных кислот FAS-II. Она катализирует восстановление D₂-ненасыщенных жирных кислот в насыщенные с использованием кофактора NADPH в качестве донора водорода [27]. При нарушении синтеза миколовых кислот подавляется синтез клеточной стенки микобактерий.

Устойчивость к этим препаратам обусловлена мутациями в гене *inhA*, которые затрагивают промоторный участок оперона *tabA-inhA*, вызывая гиперпродукцию фермента, или последовательность, кодирующую фермент, что обуславливает снижение его аффинности к комплексу радикала изоникотиновой кислоты и NAD⁺ [28, 29].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ КЛЕТОЧНЫЕ МИШЕНИ АБП

рРНК-метилтрансферазы

Мишенью многих АБП являются бактериальные рибосомы [30]. Малая субъединица 30S состоит из 16S рРНК и 21 белка. Аминогликозиды связываются с 30S субъединицей с образованием водородных связей с азотистыми основаниями нескольких нуклеотидов 16S рРНК, что препятствует правильному связыванию аминоацил-тРНК с антикодоном и приводит к ошибкам в синтезе белка и последующей гибели клетки (рис. 8А). Некоторые аминогликозиды могут напрямую ингибировать инициацию или блокировать элонгацию полипептидной цепи [30, 31].

Один из механизмов резистентности к аминогликозидам – метилирование А-сайта 16S рРНК бактериальными 16S рРНК-метилтрансферазами, в результате чего антибиотики теряют способность связываться с рибосомой [32, 33]. Донором метильной группы для этих ферментов служит S-аденозил-L-метионин (SAM). Описано 11 различных 16S рРНК-

метилтрансфераз, которых делят на две группы по типу модифицируемого нуклеотида в А-сайте. Первая группа ферментов (ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD1, RmtD2, RmtE, RmtF, RmtG и RmtH) катализирует метилирование 16S рРНК по положению N-7 в нуклеотиде G1405 и обеспечивает резистентность бактерий только к 4,6-дизамещенным аминогликозидам. Ко второй группе относится метилтрансфераза NmpA, которая метилирует нуклеотид A1408 по положению N-1 и обеспечивает резистентность ко всем известным аминогликозидам, кроме стрептомицина и спектиномицина [31, 32].

Гены, кодирующие данные ферменты, локализованы в основном на конъюгативных плазидах и/или связаны с транспозонами, причем часто они сцеплены с другими генами антибиотикорезистентности [34]. Наиболее распространены ферменты RmtB и ArmA. Продукты RmtB выделены не только из клинических образцов возбудителей заболеваний человека, но и от домашних животных, что указывает на вероятный механизм передачи детерминант резистентности от животных к человеку [33].

Действие макролидов, кетолидов, линкозамидов и стрептограмина В (группа МКЛС по названию составляющих ее препаратов) направлено на большую 50S субъединицу рибосомы, содержащей 5S и 23S рРНК и 33 рибосомных белка. Несмотря на различия в структуре, эти антибиотики имеют общий участок связывания с 50S субъединицей в непосредственной близости от пептидил-трансферазного центра. При этом они закрывают рибосомный туннель – структурный элемент, расположенный в большой субъединице рибосомы. В результате этого взаимодействия пептидил-тРНК диссоциирует из рибосомы, что приводит к нарушению транслокации, и синтез белка останавливается (рис. 8Б).

Один из механизмов устойчивости к препаратам МКЛС – продукция 23S рРНК-метилтрансфераз, которые катализируют посттранскрипционную мо-

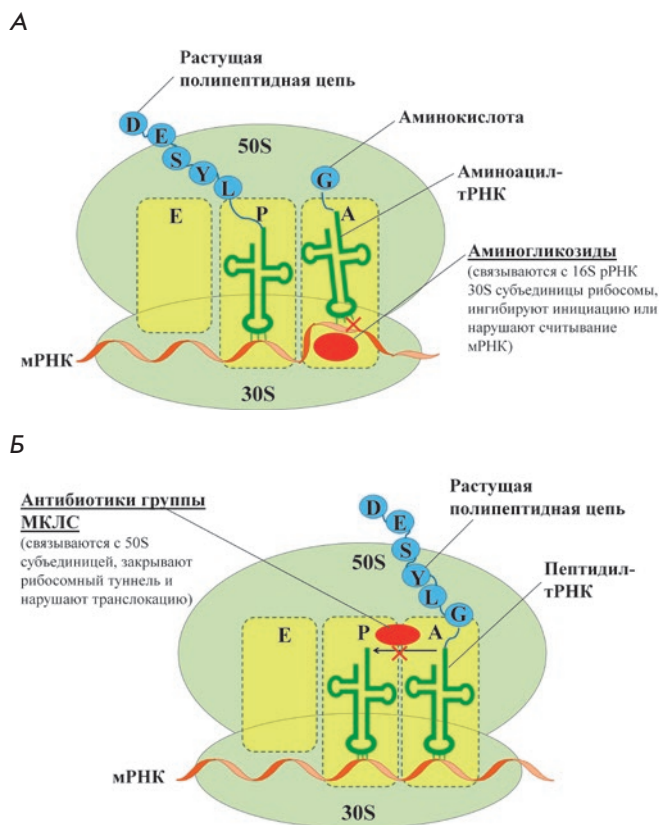


Рис. 8. Взаимодействие аминогликозидов (А) и антибиотиков группы МКЛС (Б) с рибосомой и их влияние на синтез белка

дификацию 23S рРНК, состоящую в метилировании A2058, расположенного в участке связывания антибиотика с рибосомой [35]. Донором метильной группы, как и у 16S рРНК-метилтрансфераз, является SAM. Перенос метильной группы с SAM на A2058 проходит в две стадии, включая промежуточное метилирование консервативного остатка цистеина в С-концевом домене метилтрансферазы [36]. Описано 39 генов, кодирующих 23S рРНК-метилтрансферазы, главным образом, у грамположительных микроорганизмов. У *Enterobacteriaceae* известны как хромосомные гены, например, *rlmA1*, так и локализованные на мобильных генетических элементах гены, кодирующие метилазы ErmB, ErmC, ErmD, ErmE, ErmF и Erm42. Известны конститутивный и индуцибельный типы экспрессии метилтрансфераз Erm. При конститутивном типе синтез метилтрансферазы происходит постоянно и не зависит от внешних условий. Фенотипически это проявляется в устойчивости к макролидам, линкозамидам и стрептограминам В, кетолиды при этом сохраняют активность. При индуцибельном типе синтез метилтрансферазы про-

исходит только в присутствии МКЛС. В отсутствие индуктора регуляторная лидерная последовательность мРНК-метилтрансферазы, расположенная перед кодирующей последовательностью, имеет конформацию шпильки и не позволяет осуществить синтез фермента. Взаимодействие индуктора с регуляторной последовательностью мРНК приводит к ее перегруппировке, что вызывает синтез метилтрансферазы.

Активно ведется поиск эффективных ингибиторов рРНК-метилтрансфераз, в качестве которых предложены ингибиторы SAM-связывающего центра ферментов, имитирующие молекулу-донор метильной группы и оказавшиеся неселективными [37], и соединения, блокирующие одновременно SAM-связывающий и субстратсвязывающий центры ферментов [38].

Ферменты, участвующие в модификации пептидогликана клеточной стенки бактерий

Резистентность грамположительных бактерий к гликопептидным антибиотикам (ванкомицину и тейкопланину) обусловлена продукцией ферментов (дигидрогеназы, сериновой рацемазы, лигазы), катализирующих модификацию пептидогликана [11]. Данные антибиотики представляют собой высокомолекулярные соединения, состоящие из гликозилированных циклических или полициклических пептидов. Они образуют комплекс с терминальным дипептидом D-Ala-D-Ala пептидогликана, стабильный за счет образования пяти водородных связей, и предотвращают реакции трансгликозилирования и транспептидирования в клеточной стенке (рис. 3) [39]. Резистентность к ним обеспечивается заменой последнего аминокислотного остатка D-Ala пептидогликана на D-Lac или D-Ser, при этом уменьшается сродство терминального дипептида к антибиотику на три порядка для D-Ala-D-Lac и на два порядка для D-Ala-D-Ser [40]. Обнаружены девять оперонов, определяющих устойчивость энтерококков к гликопептидным антибиотикам [41, 42]. Опероны *vanA*, *vanB*, *vanD* и *vanM* обеспечивают синтез предшественников пептидогликана с С-концевым дипептидом D-Ala-D-Lac, опероны *vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* и *vanN* – с С-концевым дипептидом D-Ala-D-Ser [42]. Экспрессия продуктов перечисленных оперонов носит индуцибельный характер [43]. Детерминанты устойчивости к гликопептидным антибиотикам чаще локализируются на плаزمидах, однако могут входить и в состав хромосомы.

Фосфоэтаноламинтрансферазы

Полимиксины (колистин) действуют на липополисахариды наружной мембраны грамотрицательных

бактерий. Основной структуры данных АБП является положительно заряженный циклический полипептид, механизм действия которого сходен с механизмом катионных детергентов. Молекулы полимиксинов взаимодействуют с отрицательно заряженными фосфатными группами липополисахаридов, что нейтрализует заряд мембраны и изменяет ее проницаемость для внутри- и внеклеточных компонентов. Главный механизм резистентности к полимиксинам связан с закрытием канала проникновения антибиотика в клетку, которое происходит при модификации липида А – компонента липополисахаридов фосфоэтаноломином, катализируемой фосфоэтанолминтрансферазой (рис. 9) [44]. Ген, кодирующий данный фермент, имеет хромосомную локализацию. Недавно кодирующий фосфоэтанолминтрансферазу ген *msr-1* был обнаружен на плаزمиде [45]. Развитие резистентности этого типа связано с возникновением мутаций в генах фосфоэтанолминтрансфераз [46].

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ, МОДИФИЦИРУЮЩИЕ АБП

Одним из наиболее распространенных механизмов резистентности с участием ферментов является разрушение или модификация структуры антибиотика. По типу катализируемых реакций ферменты, определяющие данный механизм резистентности, делятся на гидролазы, трансферазы и оксидоредуктазы (рис. 10). Структуры основных классов АБП и позиции их ферментативной модификации представлены на рис. 11.

Гидролазы

Среди ферментов, катализирующих гидролиз антибиотиков, наиболее распространены β-лактамазы и макролидные эстеразы, разрушающие β-лактамы и макролиды соответственно. Этот же механизм определяет резистентность к фосфомицину и хлорамфениколу [5, 47].

β-Лактамазы

β-Лактамазы гидролизуют амидную связь в β-лактамном кольце, общем структурном элементе всех β-лактамных антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы). Они образуют суперсемейство ферментов, состоящее к настоящему времени из более чем 2000 представителей [47]. На основании гомологии аминокислотных последовательностей β-лактамазы разделяются на четыре молекулярных класса [48]. Ферменты классов А, С и D являются сериновыми гидролазами, ферменты класса В – металлоферментами.

Сериновые β-лактамазы имеют структурные элементы, сходные с С-доменом ПСВ, что свиде-

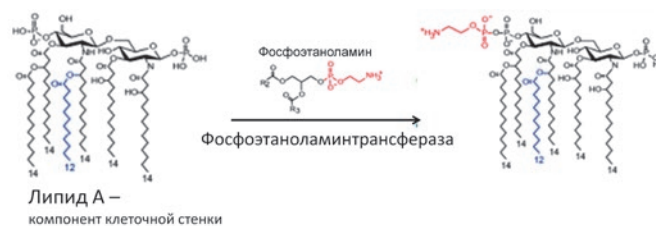


Рис. 9. Схема модификации фосфоэтанолминтрансферазой липида А – компонента липополисахаридов наружной клеточной мембраны

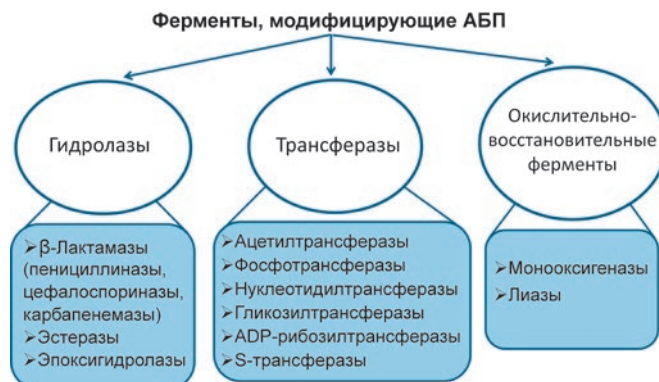


Рис. 10. Основные классы ферментов, модифицирующих АБП

тельствует об их эволюционной взаимосвязи [49]. Эволюция β-лактамаз развивается по двум основным механизмам – появлению новых мутаций в генах известных ферментов и возникновению ферментов с новой структурой. Высокая скорость мутирования β-лактамаз и локализация их генов на мобильных генетических элементах способствуют быстрому распространению устойчивых бактерий, что представляет глобальную угрозу [50]. К настоящему времени обнаружены бактерии, имеющие одновременно до восьми генов β-лактамаз [51].

Наиболее распространены β-лактамазы класса А – типа СТХ-М, ТЕМ, SHV и КРС [51]. Особенностью β-лактамаз типа ТЕМ и SHV является их мутационная изменчивость. Ключевые мутации в активном центре приводят к увеличению объема фермента и к появлению способности гидролизовать объемные молекулы цефалоспоринов II–IV поколения [52]. Эти мутантные формы получили название β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Некоторые мутации аминокислотных остатков, расположенных на удалении от активного центра, являются компенсирующими и могут иметь разнонаправленное действие на стабильность [53, 54].

β-Лактамазы класса С эффективно гидролизуют цефалоспорины. Изначально этот класс был пред-

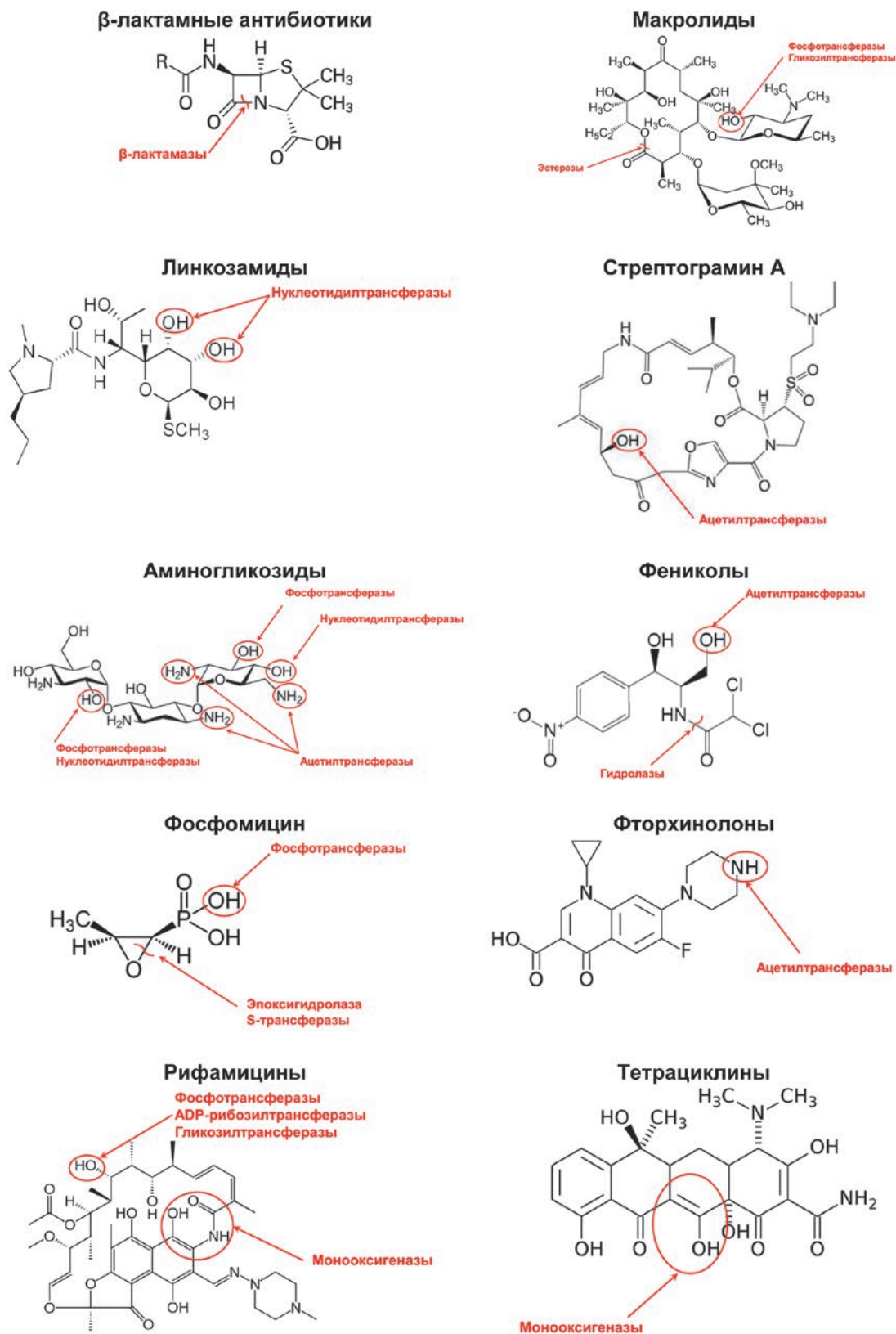


Рис. 11. Структуры основных классов АБП и модифицирующие их ферменты

ставлен ферментами, которые кодируются хромосомными генами и имеют индуцибельный тип экспрессии. Затем были обнаружены ферменты, гены которых локализованы на мобильных элементах [55].

β -Лактамазы класса D включают β -лактамазы типа ОХА и являются самыми структурно разнообразными среди сериновых β -лактамаз.

Молекулярный класс В представляет собой гетерогенное семейство металло- β -лактамаз (МБЛ) [56]. Они содержат в активном центре один или два иона цинка, гидролизуют практически все β -лактамные антибиотики, кроме монобактамов, ингибируются хелатирующими агентами (EDTA, дипиколиновая кислота и о-фенантролин). Появление новых вариантов МБЛ (например, карбапенемаз NDM-типа) и их совместная экспрессия с сериновыми β -лактамазами приводят к появлению бактерий, резистентных ко всем β -лактамным антибиотикам [57].

Для преодоления резистентности, обусловленной продукцией β -лактамаз, активно ведется поиск ингибиторов данных ферментов [58, 59]. В клинической практике для ингибирования ферментов класса А активно используются комбинации β -лактамов с клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом, которые содержат в структуре β -лактамное кольцо, образуют более стабильный ацил-ферментный комплекс и имеют низкую скорость деацилирования. К новейшим ингибиторам, имеющим структурную аналогию с β -лактамами, но не содержащим β -лактамное кольцо, относятся диазабициклооктаны (авибактам и МК-7655), образующие карбамил-ферментные комплексы с участием каталитического серина, которые далее подвергаются медленной обратимой рециклизации с освобождением молекулы ингибитора. Эти ингибиторы показали свою эффективность в отношении β -лактамаз классов А, С и частично D. Активно исследуются производные борных кислот, способные ингибировать карбапенемазы класса А. Особое внимание уделяется поиску ингибиторов МБЛ, но ни один из них пока не используется на практике [60].

Макролидные эстеразы

Резистентность к 14- и 15-членным макролидам (эритромицину, азитромицину и др.) обусловлена продукцией эстераз, катализирующих гидролиз лактонового кольца [35, 61]. Макролиды, содержащие 16-членные кольца, не являются субстратами данных ферментов. Наибольшее клиническое значение имеют эритромицинэстеразы EreA и EreB. EreA имеет более ограниченный профиль субстратной специфичности, она не гидролизует азитромицин и телитромицин. Это металлотрансферный фермент, активность которого ингибируется хелатными аген-

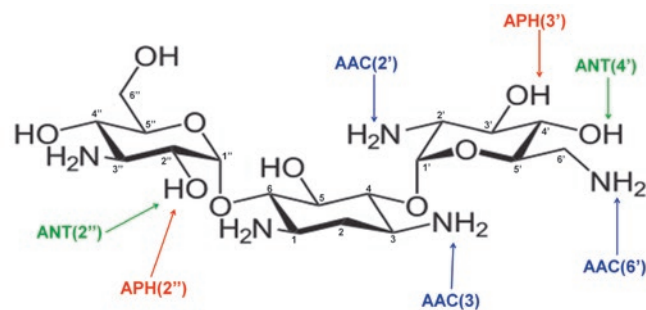


Рис. 12. Структура канамицина В и позиции его модификации аминокликозидмодифицирующими ферментами

тами. EreB обеспечивает резистентность практически ко всем 14- и 15-членным макролидам, кроме телитромицина. Гены этих эстераз локализуются на плазидах, они часто сочетаются с другими генами антибиотикорезистентности [62].

Трансферазы

Трансферазы, модифицирующие молекулы АБП ковалентным присоединением различных химических групп, представляют большое суперсемейство ферментов [5, 6, 63]. Ниже рассмотрены их основные группы, различающиеся субстратной специфичностью, типом модификации и механизмом действия.

Аминокликозидмодифицирующие ферменты

Ферментативная модификация аминокликозидных антибиотиков является наиболее распространенным механизмом резистентности, который осуществляется аминокликозидмодифицирующими ферментами (АГМФ). Известно несколько сотен различных АГМФ, практически каждый из которых представлен несколькими изоферментами, имеющими уникальную субстратную специфичность и модифицирующими аминокликозиды в определенной позиции [31]. Гены АГМФ локализуются на мобильных генетических элементах, что обуславливает их быстрое распространение.

По типу реакции выделяют три семейства АГМФ: N-ацетилтрансферазы (ААС), O-фосфотрансферазы (АРН) и O-аденилилтрансферазы (АНТ) (рис. 12). Ферменты ААС используют в качестве кофактора ацетил-КоА, донорами фосфатных групп и аденина для АРН и АНТ служат АТР или ГТР [23]. Ферменты ААС наиболее распространены и клинически значимы, выделено 48 вариантов ААС, способных ацетилировать аминокликозиды в одном из положений (1, 3, 2' или 6'). Также известен уникальный фермент Eis, способный ацетилировать аминокликозиды по нескольким положениям одновременно.

АРН являются вторым по численности семейством АГМФ, в котором выделяют семь типов ферментов, катализирующих перенос фосфатной группы в положения 4-, 6-, 9-, 3'-, 2''-, 3'''- или 7''-аминогликозидов. Ферменты АНТ подразделяют на пять классов, способных модифицировать положения 6-, 9-, 4'-, 2''- или 3'''-аминогликозидов [64, 65].

Предложено несколько подходов к преодолению резистентности к аминогликозидам: регуляция экспрессии генов антисмысловыми олигонуклеотидами [66], дизайн новых аминогликозидов [67, 68], а также поиск ингибиторов АГМФ [64, 69]. Первыми в качестве ингибиторов ААС были предложены бисубстраты, состоящие из аминогликозида и ацетил-КоА, однако из-за значительных размеров и отрицательного заряда данное соединение плохо проникало через клеточную мембрану и показало низкую эффективность в экспериментах *in vivo* [70]. Ряд последних исследований показал, что активность ААС и Eis ингибируют катионы различных металлов, что повышает эффективность аминогликозидов [71]. Для ингибирования обладающих киназной активностью АРН исследованы различные ингибиторы протеинкиназ [72]. Одним из наиболее эффективных оказался природный ингибитор кверцетин, подавляющий активность нескольких АРН *in vitro* и *in vivo*. Перспективными считаются ингибиторы, действующие на различные АГМФ, например, соединения на основе 3-(диметиламино)пропиламина с достаточной эффективностью ингибируют как АНТ, так и АРН [73]. Катионные пептиды связывались с отрицательно заряженным активным центром АГМФ и проявляли высокое сродство к различным ААС и АРН, но не действовали на резистентные бактериальные штаммы, вероятно, из-за плохой проницаемости через клеточную мембрану [74]. Димер неомицина А ингибировал активность как монофункциональных ферментов ААС(6')-Ii и АРН(3')-IIIa, так и бифункционального ААС(6')-АРН(2''), в том числе *in vivo* с использованием клинического штамма *Pseudomonas aeruginosa* [69, 75].

Ферменты, модифицирующие хлорамфеникол и его аналоги

Продукция хлорамфеникол-ацетилтрансфераз (САТ) является основным механизмом устойчивости бактерий к хлорамфениколу. Эти ферменты катализируют присоединение ацетильной группы ацетил-КоА к 3-гидроксильной группе хлорамфеникола или его синтетических аналогов (триамфеникола, азидамфеникола), препятствуя тем самым связыванию молекулы антибиотика с рибосомами [5]. САТ не инактивируют фторфеникол, поскольку в его молекуле 3-гидроксильная группа замеще-

на атомом фтора [63]. САТ разных типов обладают крайне низкой гомологией аминокислотных последовательностей, не превышающей 10%. Гены *cat* могут располагаться на хромосомах [76], но чаще локализуются на плазидах и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим АБП. Экспрессия генов *cat* индуцируется хлорамфениколом [63].

Помимо ацетилирования инактивация хлорамфеникола может осуществляться путем О-фосфорилирования. Данный механизм антибиотикорезистентности описан у *S. venezuelae* – продуцента хлорамфеникола [77].

Ферменты, модифицирующие антибиотики группы МКЛС

Макролидные фосфотрансферазы (МРН) – ферменты, модифицирующие структуру макролидов, присоединяя фосфатную группу к 2'-ОН-группе [5]. Донором фосфатной группы служат нуклеозидтрифосфаты, преимущественно GTP. На сегодняшний день описано семь различных ферментов этой группы. МРНА предпочтительно катализирует фосфорилирование 14- и 15-членных макролидов, тогда как МРНВ модифицирует 14- и 16-членные макролиды [35, 62]. Гены, кодирующие МРН, расположены на мобильных генетических элементах, содержащих другие гены резистентности к макролидам и другим классам антибиотиков [78, 79]. Экспрессия генов макролидных фосфотрансфераз может быть как индуцибельной (*mphA*), так и конститутивной (*mphB*) [35].

Макролидные гликозилтрансферазы – ферменты, инактивирующие макролиды гликозилацией 2'-ОН-группы макролидного кольца [6]. В качестве кофактора они используют UDP-глюкозу.

Стрептограмин-ацетилтрансферазы инактивируют только стрептограмин типа А ацетилированием свободной гидроксильной группы, механизм их действия схож с механизмом САТ [5]. Гены, кодирующие эти ферменты, были идентифицированы у ряда грамположительных патогенов, включая стафилококки и энтерококки [63].

Фосфомицинмодифицирующие ферменты

Эпоксидазы FosA, FosB и FosX и киназы FomA и FomB – металлоферменты, инактивирующие фосфомицин [11, 23, 80]. Эпоксидазы раскрывают эпокси-группу фосфомицина (оксирановое кольцо), добавляя различные субстраты. FosA представляет собой глутатион-S-трансферазу, использующую в качестве кофакторов помимо глутатиона ионы металлов Mn²⁺ и K⁺. В качестве источника тиоловой группы у FosB выступает бациллитоил или L-Cys, дополнительно в качестве кофактора эти ферменты

используют Mg^{2+} [11, 81]. Фермент FosX представляет собой Mn^{2+} -зависимую гидролазу. В большинстве своем гены, кодирующие перечисленные ферменты, имеют плазмидную локализацию, хотя FosA у *P. aeruginosa* и FosB у *S. aureus* кодируются хромосомными генами.

Киназы FomA и FomB присоединяют одну или две фосфатные группы к молекуле фосфомицина, используя в качестве кофакторов АТФ и ионы Mg^{2+} . Эти ферменты выделены у продуцента фосфомицина *S. wedriensis* [11].

Рифамицинмодифицирующие ферменты

Инактивацию рифамицинов модификацией гидроксильной группы, ключевой при связывании молекулы антибиотика с β -субъединицей РНК-полимеразы, осуществляют несколько групп ферментов. NAD^{+} -зависимые ферменты группы Arg катализируют АДФ-рибозилирование, киназы RPH – фосфорилирование, гликозилтрансферазы – гликозилирование [23, 82, 83].

Моноксигеназы

Флавинозависимая моноксигеназа TetX обеспечивает резистентность ко всем тетрациклинам, включая антибиотик широкого спектра действия тигециклин [5]. TetX катализирует моногидроксилирование тетрациклинов в присутствии молекул $NADPH$, O_2 и Mg^{2+} , что приводит к внутримолекулярной циклизации и распаду молекулы. Флавинозависимые моноксигеназы Rox инактивируют рифамицины окислением нафтиловой группы в положении 2, что приводит к раскрытию кольца и линеаризации молекулы антибиотика [84].

Ферменты метаболических процессов, модифицирующие АБП в форме пролекарства

Модификацию антибиотиков осуществляют также ферменты, защищающие клетки от токсичных молекул. При этом в большинстве случаев происходит трансформация АБП в форме пролекарства в активную форму.

Активация изониазида происходит под действием каталазы-пероксидазы KatG с образованием свободнорадикальных форм изоникотиновой кислоты, которые блокируют ферменты, участвующие в синтезе миколовых кислот [85]. Резистентность вызвана мутациями в гене *katG*, которые наиболее часто локализованы в кодоне 315 и вызывают конформационные изменения изониазидсвязывающего кармана.

Структурные аналоги изониазида этионамид и протиионамид активируются $NADPH$ -зависимой FAD-содержащей моноксигеназой, кодируемой геном *ethA* [85]. Окисленные формы этионамида и про-

тионамида в комплексе с NAD^{+} , как и в случае изониазида, ингибируют ферменты синтеза миколовых кислот, прежде всего InhA. Экспрессия гена *ethA* регулируется транскрипционным репрессором EthR. Резистентность обусловлена мутациями в генах *ethA* и *ethR*.

БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ФЕРМЕНТЫ – НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ЭВОЛЮЦИИ

Мутации в бактериальных геномах и селекция новых устойчивых фенотипов являются основным механизмом возникновения резистентности бактерий к антибиотикам. В результате наблюдается широкое разнообразие форм ряда ферментов, обуславливающих резистентность, например, описано более 2000 β -лактамаз. Однако единичные аминокислотные замены вызывают ограниченные изменения активности и специфичности конкретного фермента. К новым направлениям эволюционного развития резистентности относится появление бифункциональных ферментов, кодируемых двумя сцепленными генами. Это существенно увеличивает субстратную специфичность и имеет эволюционное преимущество для обеспечения чрезвычайно широкой резистентности в отношении различных АБП [86].

Бифункциональные β -лактамазы

Первый бифункциональный фермент Trp47 был выделен из возбудителя сифилиса *Treponema palladium* [87]. Он имеет два активных центра, один из которых проявляет активность ПСБ, а второй – β -лактамазную. Поскольку Trp47 обладает очень низкой β -лактамазной активностью, она реально не обеспечивает устойчивость к β -лактамам.

Другая бифункциональная β -лактамаза blaLRA-13 обнаружена у устойчивых к β -лактамам штаммов *E. coli*, выделенных из почв Аляски [88]. Этот фермент состоит из 609 аминокислот, что почти в 2 раза больше, чем у обычной монофункциональной β -лактамазы. С-Домен данного фермента (356 аминокислот) имеет высокую степень гомологии с β -лактамазами класса С и обеспечивает резистентность к амоксициллину, ампициллину и карбенициллину, в то время как N-домен (253 аминокислоты) имеет высокую степень гомологии с β -лактамазами класса D и обеспечивает резистентность к цефалексину. Помимо blaLRA-13 выделенные штаммы продуцировали также несколько монофункциональных β -лактамаз разных классов. Хотя данная бифункциональная β -лактамаза пока не обнаружена у клинических штаммов бактерий, нельзя исключать ее распространение в будущем среди возбудителей инфекционных заболеваний человека. Более того, открытие этого фермента подтверждает эволюционную

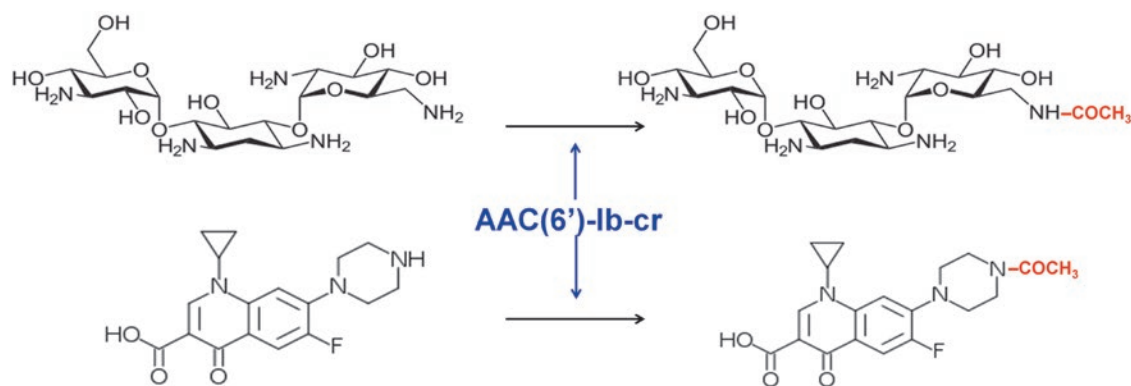


Рис. 13. Ацилирование канамицина В и ципрофлоксацина, катализируемое бифункциональным ферментом AAC(6')-Ib-cr

гипотезу о том, что микроорганизмы почвы, а также других экологических ниш, имеют широкий спектр механизмов резистентности, которые со временем могут быть переданы клинически значимым патогенам.

Бифункциональность ферментов могла возникнуть в процессе эволюционных изменений высокомолекулярных двухдоменных ПСБ, транспептидазный домен которых способен образовывать стабильный комплекс с β -лактамами антибиотиками. В процессе мутаций связывающий центр приобрел способность гидролизовать β -лактаманное кольцо, т.е. образовалась новая группа ферментов, гидролизующих антибиотики.

Бифункциональные аминогликозид-модифицирующие ферменты

У грамположительных бактерий обнаружен бифункциональный фермент AAC(6')-Ie/APH(2'')-Ia, N-концевой домен которого имеет ацетилтрансферазную активность, а С-домен – фосфотрансферазную [89]. AAC-домен в составе фермента способен ацилировать только один вид аминогликозидного кольца, в то время как домен АРН имеет более широкую специфичность, катализируя О-фосфорилирование четырех различных аминогликозидных колец [90]. Бифункциональный фермент обеспечивает устойчивость почти ко всем известным клинически значимым аминогликозидам, за исключением стрептомицина и спектиномицина.

Бифункциональный фермент ANT(3'')-Ii/AAC(6')-IId характеризуется сочетанием нуклеотидилтрансферазной активности в отношении стрептомицина и спектиномицина и ацетилтрансферазной активности с широкой субстратной специфичностью [91].

Первый домен бифункционального фермента AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' специфичен только в отношении гентамицина и фортимицина, второй домен проявляет широкую субстратную специфичность,

включая амикацин, дибекацин, гентамицин, изепамицин, канамицин А и неомицин [92].

Недавно из штамма *P. aeruginosa* был выделен новый бифункциональный фермент AAC(6')-30/AAC(6')-Ib', обеспечивающий устойчивость ко многим аминогликозидам, кроме изепамицина, с более высокой активностью по сравнению с монофункциональными ферментами [93].

Бифункциональный аминогликозид- и фторхинолонмодифицирующий фермент

Новый вариант ацетилтрансферазы AAC(6')-Ib-cr является первым ферментом, одновременно инактивирующим аминогликозиды и фторхинолоны (рис. 13) [94]. Две мутации, кодирующие замены W102R и D179Y, обеспечивают резистентность к ципрофлоксацину [95]. Ген этого фермента имеет как плазмидную, так и хромосомную локализацию. Он обнаружен на мультирезистентной плазмиде в сочетании с другими генами резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос о происхождении бактериальных ферментов, формирующих резистентность в процессе эволюции, остается дискуссионным. Гены, кодирующие эти ферменты, локализируются на хромосомах и мобильных элементах. Ферменты, кодируемые хромосомными генами, предохраняют микроорганизмы-продуценты антибиотиков от модификаций потенциальных мишеней. Резистентность возникает при передаче генов данных ферментов в другие бактерии.

Другая группа ферментов, кодируемых хромосомными генами, произошла под влиянием эволюции от ферментов, входящих в состав суперсемейств с выделением подгрупп с измененной субстратной специфичностью. Ферменты, выполняющие жизненно важные функции и ответственные за биосинтез полисахаридов клеточной стенки, белков, нуклеиновых кислот и метаболитов, служат мише-

ниями антибиотиков. Модификация активных центров ферментов-мишеней способствовала появлению у них способности использовать антибиотики в качестве субстратов. Установлено наличие генов проторезистентности, обуславливающих эволюционную взаимосвязь β -лактамаз и ПСБ, киназ и ацетилтрансфераз с аминогликозидмодифицирующими ферментами.

Многие ферменты произошли от бактериальных проферментов, изначально имевших другие функции. Под влиянием экзогенных и эндогенных факторов (в частности, антибиотиков и продуктов их метаболизма) в генах, кодирующих ферменты, возникали мутации, что приводило к изменению структуры, каталитических свойств и субстратной специфичности их продуктов. Множественность мутаций указывает на то, что мутациям подвергаются как ключевые аминокислотные остатки, важные для каталитических процессов, так и сопутствующие, изменения которых позволяют компенсировать структурные изменения и являются аллостерическими центрами регуляции активности.

Особенностью резистентности бактерий является разнонаправленность процессов. Совмещение нескольких механизмов устойчивости в одной клетке, включающих модификацию структурных элементов, изменение уровня экспрессии белков, в том числе поринов, активацию систем эффлюкса, затрудняет разработку методов подавления резистентности. В последние годы сложилась научная концепция объединения объектов, связанных с важнейшими биологическими процессами, в определенные группы. Так появилось понятие «микробиом» как совокупность микроорганизмов определенного вида и человека. Непатогенные микроорганизмы, в частности почвенные бактерии, представляют собой огромный резервуар и источник генов резистентности. Их широкое распространение среди микроорганизмов связано с локализацией на плазидах и других мобильных генетических элементах и высокой скоростью обмена и передачи между бактериальными клетками, в том числе патогенными штаммами.

Совокупность генов, обуславливающих резистентность как патогенных клинических штаммов, так и непатогенных бактерий в окружающей среде

и микробиоте, получила название «резистом». Важной особенностью является наличие в геноме одной бактерии нескольких генов резистентности, что обеспечивает их мультирезистентность. Способность бактериальных клеток к быстрому размножению, изменению структуры генов и их селекции привела к развитию новых механизмов, обеспечивающих выживаемость клеток. Важнейшую роль в этих процессах играют ферменты, выполняющие различные функции. Созданная в течение длительного эволюционного развития защитная система бактерий на основе ферментов может быть названа «энзистом».

Представленная классификация бактериальных ферментов «энзистом» будет в дальнейшем развиваться и дополняться. Обобщая результаты анализа участия ферментов в формировании резистентности бактерий к антибиотикам, следует признать фундаментальность биологического значения этого процесса, обеспечивающего выживаемость микроорганизмов и их способность к адаптации. «Приспособляемость» микроорганизмов к новым условиям окружающей среды во многом осуществляется за счет «биокаталитического функционала». Изменение этого функционала на генетическом уровне и должно, на наш взгляд, быть предметом пристального внимания микробиологов, молекулярных биологов и биотехнологов. Развитие промышленного производства АБП и их неконтролируемое использование в медицине и ветеринарии стало мощным антропогенным фактором, который оказал сильное влияние на ускорение развития резистентности. Изучение структур ферментов, составляющих «энзистом», анализ эволюционной изменчивости и консервативных участков «резистом» позволят понять механизмы регуляции бактериальных клеток и найти новые мишени для разработки рациональных подходов к созданию селективных и эффективных АБП для преодоления резистентности. Особый интерес представляет использование ферментов, способных разрушать и метаболизировать антибиотики, в качестве лекарственных средств для защиты полезной микробиоты и предотвращения побочных эффектов при лечении антибиотиками. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 15-14-00014-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. // 2014. <http://www.who.int/drugresistance/en>
2. Roca I., Akova M., Baquero F., Carlet J., Cavaleri M., Coenen S., Cohen J., Findlay D., Gyssens I., Heure O.E., et al. // *New Microbes New Infect.* 2015. V. 6. P. 22–29.
3. Chang Q., Wang W., Regev-Yochay G., Lipsitch M., Hanage W.P. // *Evol. Appl.* 2015. V. 8. № 3. P. 240–247.
4. Holmes A.H., Moore L.S.P., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P.J., Piddock L.J.V. // *Lancet.* 2016. V. 387. P. 176–187.
5. Wright G.D. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. № 10. P. 1451–1470.
6. Morar M., Wright G.D. // *Annu. Rev. Genet.* 2010. V. 44. № 1. P. 25–51.
7. Vollmer W., Blanot D., De Pedro M.A. // *FEMS Microbiol. Rev.*

2008. V. 32. № 2. P. 149–167.
8. Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A., Charlier P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2008. V. 32. № 2. P. 234–258.
 9. Sauvage E., Terrak M. // *Antibiotics.* 2016. V. 5. № 1. P. 12.
 10. Bush K., Bradford P.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 8. P. 1–22.
 11. Nikolaidis I., Favini-Stabile S., Dessen A. // *Protein Sci.* 2014. V. 23. № 3. P. 243–259.
 12. Chambers H.F., Deleo F.R. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2009. V. 7. № 9. P. 629–641.
 13. Fuda C., Suvorov M., Vakulenko S.B., Mobashery S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 39. P. 40802–40806.
 14. Diaz R., Ramalheira E., Afreixo V., Gago B. // *Diagn. Microbiol. Infect.* 2016. V. 84. № 2. P. 135–140.
 15. Liu J., Chen D., Peters B.M., Li L., Li B., Xu Z., Shirliff M.E. // *Microb. Pathog.* 2016. V. 101. P. 56–67.
 16. Correia S., Poeta P., Hébraud M., Capelo J.L., Igrejas G. // *J. Med. Microbiol.* 2017. V. 66. № 5. P. 551–559.
 17. Aldred K.J., Kerns R.J., Osheroff N. // *Biochemistry.* 2014. V. 53. № 10. P. 1565–1574.
 18. Hooper D.C., Jacoby G.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 9. P. 1–21.
 19. Wentzell L.M., Maxwell A. // *J. Mol. Biol.* 2000. V. 304. № 5. P. 779–791.
 20. Willmott C.J., Critchlow S.E., Eperon I.C., Maxwell A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 242. P. 351–363.
 21. Drlica K., Malik M., Kerns R.J., Zhao X. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. V. 52. № 2. P. 385–392.
 22. Drlica K., Hiasa H., Kerns R., Malik M., Mustaev A., Zhao X. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2009. V. 9. № 11. P. 981–998.
 23. Costa V.D., Wright G.D. // *Antimicrobial Drug Resistance / Ed. Mayers D.L.* New York: Humana Press, 2009. P. 81–95.
 24. Borukhov S., Nudler E. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2003. V. 6. № 2. P. 93–100.
 25. Dookie N., Rambaran S., Padayatchi N., Mahomed S., Naidoo K. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2018. V. 73. № 5. P. 1138–1151.
 26. Palomino J.C., Martin A. // *Antibiot.* 2014. V. 3. № 3. P. 317–340.
 27. Vilchêze C., Morbidoni H.R., Weisbrod T.R., Iwamoto H., Kuo M., Sacchettini J.C., Jacobs W.R. // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. № 14. P. 4059–4067.
 28. Larsen M.H., Vilchêze C., Kremer L., Besra G.S., Parsons L., Salfinger M., Heifets L., Hazbon M.H., Alland D., Sacchettini J.C., et al. // *Mol. Microbiol.* 2002. V. 46. № 2. P. 453–466.
 29. Machado D., Perdigão J., Ramos J., Couto I., Portugal I., Ritter C., Boettger E.C., Viveiros M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 8. P. 1728–1732.
 30. Wilson D.N. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2014. V. 12. № 1. P. 35–48.
 31. Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R., Connolly L.E. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 6. P. 1–18.
 32. Doi Y., Wachino J., Arakawa Y. // *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2016. V. 30. № 2. P. 523–537.
 33. Wachino J.I., Arakawa Y. // *Drug Resist. Updat.* 2012. V. 15. № 3. P. 133–148.
 34. Hidalgo L., Hopkins K.L., Gutierrez B., Ovejero C.M., Shukla S., Douthwaite S., Prasad K.N., Woodford N., Gonzalez-Zorn B. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 7. P. 1543–1550.
 35. Fyfe C., Grossman T.H., Kerstein K., Sutcliffe J. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 10. P. 1–38.
 36. Boal A.K., Grove T.L., McLaughlin M.I., Yennawar N.H., Booker S.J., Rosenzweig A.C. // *Science.* 2011. V. 332. № 6033. P. 1089–1092.
 37. Hajduk P.J., Dinges J., Schkeryantz J.M., Janowick D., Kaminski M., Tufano M., Augeri D.J., Petros A., Nienaber V., Zhong P., et al. // *J. Med. Chem.* 1999. V. 42. № 19. P. 3852–3859.
 38. Feder M., Purta E., Kosciński L., Čubrilo S., Vlahovicek G.M., Bujnicki J.M. // *ChemMedChem.* 2008. V. 3. № 2. P. 316–322.
 39. Périchon B., Courvalin P. // *Antibiotic Discovery and Development / Eds Dougherty T.J., Pucci M.J.* Boston: Springer US, 2012. P. 515–542.
 40. Courvalin P. // *Clin. Infect. Dis.* 2006. V. 42. P. 25–34.
 41. Hegstad K., Mikalsen T., Coque T.M., Werner G., Sundsfjord A. // *Clin. Microbiol. Infect.* 2010. V. 16. № 6. P. 541–554.
 42. Cattoir V., Leclercq R. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013. V. 68. № 4. P. 731–742.
 43. Сидоренко С.В., Тишков В.И. // *Успехи биол. химии.* 2004. Т. 44. С. 263–306.
 44. Poirer L., Jayol A., Nordmann P. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2017. V. 30. № 2. P. 557–596.
 45. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., et al. // *Lancet Infect. Dis.* 2016. V. 16. № 2. P. 161–168.
 46. Sun J., Zhang H., Liu Y.H., Feng Y. // *Trends Microbiol.* 2018. V. 26. № 9. P. 794–808.
 47. Bonomo R.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–16.
 48. Hall B.G., Barlow M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 55. № 6. P. 1050–1051.
 49. Ghuyens J.-M. // *Trends Microbiol.* 1994. V. 2. № 10. P. 372–380.
 50. Bush K., Jacoby G.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. V. 54. № 3. P. 969–976.
 51. Bush K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2013. V. 1277. № 1. P. 84–90.
 52. Orenca M.C., Yoon J.S., Ness J.E., Stemmer W.P.C., Stevens R.C. // *Nat. Struct. Biol.* 2001. V. 8. № 3. P. 238–242.
 53. Brown N.G., Pennington J.M., Huang W., Ayvaz T., Palzkill T. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 404. № 5. P. 832–846.
 54. Grigorenko V., Uporov I., Rubtsova M., Andreeva I., Shcherbinin D., Veselovsky A., Serova O., Ulyashova M., Ishtubaev I., Egorov A. // *FEBS Open Bio.* 2018. V. 8. № 1. P. 117–129.
 55. Philippon A., Arlet G., Jacoby G.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 1. P. 1–11.
 56. Bebrone C. // *Biochem. Pharmacol.* 2007. V. 74. № 12. P. 1686–1701.
 57. Nordmann P., Poirer L., Walsh T.R., Livermore D.M. // *Trends Microbiol.* 2011. V. 19. № 12. P. 588–595.
 58. Docquier J.D., Mangani S. // *Drug Resist. Updat.* 2018. V. 36. № November 2017. P. 13–29.
 59. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. // *Protein Sci.* 2016. V. 25. № 4. P. 787–803.
 60. Rotondo C.M., Wright G.D. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V. 39. P. 96–105.
 61. Morar M., Pengelly K., Koteva K., Wright G.D. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 8. P. 1740–1751.
 62. Gomes C., Martínez-Puchol S., Palma N., Horna G., Ruiz-Roldán L., Pons M.J., Ruiz J. // *Crit. Rev. Microbiol.* 2017. V. 43. № 1. P. 1–30.
 63. Schwarz S., Shen J., Kadlec K., Wang Y., Michael G.B., Feßler A.T., Vester B. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. V. 6. № 11. P. 1–30.
 64. Zárate S., De la Cruz Claire M., Benito-Arenas R., Revuelta J., Santana A., Bastida A. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 2. P. 284.
 65. Garneau-Tsodikova S., Labby K.J. // *Med. Chem. Comm.* 2016. V. 7. № 1. P. 11–27.
 66. Soler Bistué A.J.C., Martín F.A., Voza N., Ha H., Joaquín J.C., Zorreguieta A., Tolmasky M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 13230–13235.
 67. Fair R.J., McCoy L.S., Hensler M.E., Aguilar B., Nizet V., Tor Y. // *ChemMedChem.* 2014. V. 9. № 9. P. 2164–2171.

68. Santana A.G., Zárate S.G., Asensio J.L., Revuelta J., Bastida A. // *Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. № 2. P. 516–525.
69. Labby K.J., Garneau-Tsodikova S. // *Future Med. Chem.* 2013. V. 5. № 11. P. 1285–1309.
70. Gao F., Yan X., Auclair K. // *Chem. Eur. J.* 2009. V. 15. № 9. P. 2064–2070.
71. Li Y., Green K.D., Johnson B.R., Garneau-Tsodikova S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. № 7. P. 4148–4156.
72. Shakya T., Stogios P.J., Waglechner N., Evdokimova E., Ejim L., Blanchard J.E., McArthur A.G., Savchenko A., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. № 12. P. 1591–1601.
73. Welch K.T., Virga K.G., Whittmore N.A., Özen C., Wright E., Brown C.L., Lee R.E., Serpersu E.H. // *Bioorganic Med. Chem.* 2005. V. 13. № 22. P. 6252–6263.
74. Boehr D.D., Draker K., Koteva K., Bains M., Hancock R.E., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 189–196.
75. Berkov-Zrihen Y., Green K.D., Labby K.J., Feldman M., Garneau-Tsodikova S., Fridman M. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. № 13. P. 5613–5625.
76. Galopin S., Cattoir V., Leclercq R. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2009. V. 296. № 2. P. 185–189.
77. Mosher R.H., Camp D.J., Yang K., Brown M.P., Shaw W.V., Vining L.C., Mosher M., *Microbiol. G.* // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. № 45. P. 27000–27006.
78. Woodford N., Carattoli A., Karisik E., Underwood A., Ellington M.J., Livermore D.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009. V. 53. № 10. P. 4472–4482.
79. Lee Y., Kim B.-S., Chun J., Yong J.H., Lee Y.S., Yoo J.S., Yong D., Hong S.G., D'Souza R., Thomson K.S., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 1–6.
80. Silver L.L. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. V. 7. № 2. P. 1–12.
81. Roberts A.A., Sharma S.V., Strankman A.W., Duran S.R., Rawat M., Hamilton C.J. // *Biochem. J.* 2013. V. 451. № 1. P. 69–79.
82. De Pascale G., Wright G.D. // *ChemBioChem.* 2010. V. 11. № 10. P. 1325–1334.
83. Spanogiannopoulos P., Waglechner N., Koteva K., Wright G.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 19. P. 7102–7107.
84. Koteva K., Cox G., Kelso J.K., Surette M.D., Zubyk H.L., Ejim L., Stogios P., Savchenko A., Sørensen D., Wright G.D. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. № 4. P. 403–412.
85. Laborde J., Deraeve C., Bernardes-Génisson V. // *ChemMedChem.* 2017. V. 12. № 20. P. 1657–1676.
86. Zhang W., Fisher J.F., Mobashery S. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2009. V. 12. № 5. P. 505–511.
87. Cha J.Y., Ishiwata A., Mobashery S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 15. P. 14917–14921.
88. Allen H.K., Moe L.A., Rodbumr J., Gaarder A., Handelsman J. // *ISME J.* 2009. V. 3. № 2. P. 243–251.
89. Boehr D.D., Daigle D.M., Wright G.D. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. № 30. P. 9846–9855.
90. Daigle D.M., Hughes D.W., Wright G.D. // *Chem. Biol.* 1999. V. 6. № 2. P. 99–110.
91. Green K.D., Garneau-Tsodikova S. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 6. P. 1319–1325.
92. Green K.D., Chen W., Garneau-Tsodikova S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011. V. 55. № 7. P. 3207–3213.
93. Mendes R.E., Toleman M.A., Ribeiro J., Sader H.S., Jones R.N., Walsh T.R. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48. № 12. P. 4693–4702.
94. Robicsek A., Strahilevitz J., Jacoby G.A., Macielag M., Abbanat D., Chi H.P., Bush K., Hooper D.C. // *Nat. Med.* 2006. V. 12. № 1. P. 83–88.
95. Vetting M.W., Park C.H., Hegde S.S., Jacoby G.A., Hooper D.C., Blanchard J.S. // *Biochemistry.* 2008. V. 47. № 37. P. 9825–9835.

УДК 57.011

Проект «Ноев ковчег»: промежуточные итоги и перспективы развития классических коллекций

М. В. Калякин[#], А. П. Серегин[#], А. Е. Соловченко[#], П. А. Каменский^{*}, В. А. Садовничий
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва,
Ленинские горы, 1

[#]Равный вклад авторов в работу.

^{*}E-mail: peter@protein.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 20.03.2018

Принята к печати 09.11.2018

РЕФЕРАТ Проект «Ноев ковчег», выполняющийся в МГУ имени М.В. Ломоносова с 2015 года и посвященный исследованию биологического разнообразия, стал крупнейшим российским проектом в области наук о жизни. За время его выполнения открыто несколько сотен новых видов живых существ, проведена комплексная генетическая и биохимическая паспортизация новых и уже хранившихся в коллекциях МГУ образцов. Разработана не имеющая аналогов единая информационная система проекта. В настоящем обзоре суммированы научные достижения, связанные с развитием классических коллекций МГУ в рамках проекта, а также обсуждаются перспективы их дальнейшего развития.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биобанк, депозитарий, животные, микроорганизмы, растения.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время ни у кого не вызывает сомнений, что в ближайшем будущем наша жизнь будет во многом определяться так называемыми «большими данными» (big data) – гигантскими массивами информации, эффективная работа с которыми уже сейчас совершает настоящие революции во многих аспектах жизнедеятельности человека. В области наук о жизни термин «большие данные» традиционно ассоциируют с геномной информацией – результатами секвенирования большого числа геномов живых существ. Однако геномные данные – это только один из видов настоящих «больших данных» наук о жизни, а именно биологических коллекций. Под биологической коллекцией понимают систематизированное хранилище совокупности образцов биологического материала любой природы – от засушенных растений до живых клеток человека и тех же геномных данных.

Сейчас становится ясным, что потенциал биологических коллекций существенно выше, чем это было принято считать. Однако для реализации этого потенциала необходимо рассматривать биологические коллекции именно как «большие данные», т.е. как источник огромного количества информации о живых системах. Оперировав такой информацией и используя современный методологический арсенал, можно

на основе сравнения друг с другом множества биологических образцов получать значимые научные данные о происхождении жизни на Земле, ее развитии, а также внедрять получаемые знания в практику и использовать их для сохранения биоразнообразия нашей планеты.

Именно такой подход реализуется при выполнении проекта «Ноев ковчег», посвященного сохранению биологического разнообразия, его исследованию и полезному использованию в экономике. Важнейшим условием успешной реализации проекта является создание единого биокolleкционного виртуального пространства, в котором аккумулируются самые разнообразные данные о максимально возможном количестве биологических образцов. Такое пространство уже создано, пока что в масштабах МГУ, однако в дальнейшем планируется выход на всероссийский уровень. Уже сейчас можно утверждать, что такой глобальный подход к изучению биоразнообразия существенно повышает уровень научных результатов, позволяя выявлять более общие и более сложные закономерности организации жизни на нашей планете.

Настоящий обзор посвящен подведению промежуточных итогов проекта в части классических биологических коллекций (животный, растительный и микробиологический материал).

ЖИВОТНЫЕ

Задача биобанка – накопление коллекций, адекватно отражающих многоаспектное биоразнообразие (БР), что позволяет исследовать разные его проявления. Проведен анализ научного статуса зоологических коллекций [1], показано, что при изучении БР коллекции выполняют функцию исследовательской выборки. Их главная характеристика – репрезентативность, которую детализируют информативность, достоверность, систематичность, объем, структура и др.

Исследования по разделу «Животные» нацелены на анализ ключевых аспектов БР на основе комплексного подхода, сочетающего филогеномный и электронно-микроскопический анализ, а также 3D-реконструкцию серий гистологических срезов.

Макротаксономический анализ основных групп Animalia включал таксоны рангом от отряда до типа. Принципиально новым стало надежное обоснование гипотезы монофилии клады Lophophorata с типами Phoronida, Brachiopoda и Bryozoa: в ее пользу свидетельствуют особенности целомической системы и иннервация щупалец лофофора [2–9]. Вывод принципиально важен для выяснения структуры филогении животных на уровне базальной радиации Metazoa. Прорывным стало исследование филогенетических отношений в классе Ophiuroidea. Он разделен на надотряды Euryophiurida и Ophintegrida, выявлены четыре новых отряда и 11 семейств [10]. Получены существенно новые результаты по систематике отряда Nudibranchia (Mollusca), описаны три новых семейства [11]. В рамках концепции онтогенетической систематики показано значение педоморфоза в формировании новых таксонов высокого ранга и необходимости изучения разнообразия онтогенетических паттернов для их выявления [12–15]. Молекулярно-филогенетический анализ доказал монофилию восьми родов надотряда Acrothoracica (Copepoda) [16]. Анализ родового состава выявил 24 новых таксона этого ранга в классах Gastropoda, Maxillopoda, Mammalia [11, 17–22]. Очевидно, что филогеномный подход к анализу структуры макротаксономического разнообразия недостаточен: его должно дополнять изучение морфологического разнообразия на уровне онтогенетических паттернов. Это согласуется с новейшими идеями концепции «evo-devo» о том, что историческое развитие многоклеточных организмов есть главным образом эволюция их онтогенезов; в макротаксономических исследованиях эти идеи развивает концепция онтогенетической систематики.

Микротаксономический анализ видов и подвигов проводили на основе концепции интегративной систематики: идентификацию видов осуществляли на генетическом материале, затем результаты уточ-

няли с помощью морфологических и эпифенотипических (в том числе акустических) признаков.

Выявлены новые виды и подвиды животных (в скобках указано их число) в типах Cercozoa (4) [23, 24], Cnidaria (1) [25], Kamptozoa (6) [21, 26], Phoronida (5) [3, 27], Nematoda (13) [28, 29], Annelida (9) [30–33], Chaetognatha (1) [34], Mollusca (27) [11, 17, 18, 35–41]; в классах Maxillopoda (23) [42–46], Arachnida (2) [47, 48], Insecta (48) [49–60], Osteichthyes (7) [61–63], Amphibia (16) [64–67], Reptilia (14) [68], Aves (4) [69], Mammalia (4) [22, 70]. Впервые показана возможность надежной идентификации родственных видов и подвидов ряда азиатских Insecta, Amphibia, Reptilia, Aves и Mammalia по акустическим параметрам [71–76]. Разработан метод определения генетической идентичности медуз и полипов в лабораторных линиях некоторых Cercozoa, позволяющий адекватно оценивать их видовое разнообразие [77]. Проведена маркировка видового и подвигового уровней таксономической дифференциации групп Asterocheridae и Ascothoracida [43, 45]: корректное разграничение этих уровней – одна из ключевых проблем микро-систематики.

На основе геномной филогеографии в сочетании с генетическим баркодингом получены новые данные о структуре видового разнообразия в ряде групп животных. Изучены сем. Nothybidae (Insecta) [78], промысловые виды сем. Salmonidae и Cyprinidae (Osteichthyes) [79–84], формы из 10 семейств наземных позвоночных Евразии [64, 85–95]. Показана высокая эффективность анализа гена COI для оценки разнообразия филогенетических связей в ряде родов Amphibia [96]. Предварительное исследование молекулярно-генетического и морфологического разнообразия представителей сем. Megophryidae, Dicroglossidae, Microhylidae, Rhacophoridae (Amphibia) и Gekkonidae (Reptilia) выявило высокий уровень «скрытого» видового разнообразия, требующего детального изучения. Сравнительный анализ географической изменчивости модельных видов птиц Палеарктики (сем. Aegithalidae, Sylviidae, Corvidae и др.) указывает на группоспецифичный характер их внутривидовой дифференциации [97]. Показано, что в роде *Darevskia* (Reptilia) происходит активная ретикулярная микроэволюция [98]. Выявление комплекса симпатрических форм рода *Salvelinus* (Osteichthyes) позволяет предполагать их симпатрическое видообразование [81, 82]. Выяснено, что на Командорских о-вах в условиях изоляции происходит формирование местных популяций *Hypomesus olidus* и *Salvelinus malma* (Osteichthyes) как самостоятельных единиц [99, 100]. На основе комплексного анализа рыб из нескольких семейств показано слабое соответствие диверген-

ции популяционных и видовых единиц по морфогенетическим характеристикам и наличие большого числа криптических видов; видовое разнообразие изученных групп животных существенно недооценено. Ключевая задача состоит в переводе «скрытого» разнообразия в «явное» за счет сбора и хранения, в том числе новых форм коллекционного материала, и разработки новых методов анализа видовой дифференциации.

Из результатов исследования мерономического разнообразия животных наиболее впечатляет демонстрация того, что миниатюризация насекомых отрядов Coleoptera (сем. Ptiliidae), Psocoptera (сем. Liposcelididae) и Thysanoptera, по размерам сопоставимых с одноклеточными (около 1 мм), почти не сказывается на анатомии важнейших органов головного отдела [101, 102]. Результат принципиально важен для понимания механизмов обеспечения консервативности строения многоклеточных животных. У Phoronida описан новый тип оогенеза – аутогетеросинтез [103], расширяющий представления о разнообразии онтогенетических паттернов. У представителей ряда семейств Orthoptera впервые выявлен механизм эмиссии звуковых сигналов, выдвинуто предположение о неоднократном формировании сходного стридуляционного сигнала в их эволюции [71]. Результаты анализа вибрационных и звуковых сигналов у видов ряда семейств Orthoptera и Homoptera [71–73, 77] подтверждают гипотезу о том, что они служат эффективным репродуктивным барьером. Показано, что краниальные различия изолированных популяций песца *Vulpes lagopus* на Командорских о-вах возникли в результате отбора, а не генетического дрейфа [104].

В исследованиях биохронологического раздела обследованы фаунистические комплексы беспозвоночных и позвоночных животных морей Арктического бассейна, российского Дальнего Востока, Северной Атлантики, тропических морей Австралазии, Красного моря. Результативным стал анализ разнообразия представителей пяти отрядов Nematoda гидротермальных сайтов Срединно-Атлантического хребта на глубинах 1200–1500 м [105, 106]. По таксономическому составу и биологическим характеристикам гидротермальные нематоды отличаются от глубоководных батидальных и абиссальных нематод, но сходны с шельфовыми и сублиторальными видами и сообществами. Показано, что фаунистическое разнообразие морских бентосных гетеротрофных представителей Flagellata в Мировом океане более соответствует предсказаниям модели «космополитизма», чем «умеренного эндемизма» [107]. Показано, что фауна Harpacticoida в низких широтах значительно более богата и обладает существенно бо-

лее высокой степенью эндемизма в сравнении с фауной высоких широт; при этом население мелководной (до 50 м) и более глубоководной зон отличается по видовому составу. Обнаружено значительное различие фауны Harpacticoida между восточными и западными акваториями арктических морей [108]. В составе и разнообразии макробентоса моря Лаптевых выявлено наличие «генерального» батиметрического тренда: один комплекс факторов влияет как на состав, так и на функционирование донных сообществ [109]. Установлено, что различия в составе пресноводных фаун Cladocera Арктической и Субарктической зон определяются в первую очередь современными климатическими факторами, что позволяет использовать эти фаунистические комплексы в качестве биоиндикаторов [110]. Проведены масштабные исследования видового состава беспозвоночных арктических и дальневосточных морей: получены новые данные по представителям Ciliophora и Kamptozoa [109, 111–113]. Выявлено соотношение между генетическим, морфологическим и таксономическим разнообразием в четырех семействах Annelida из фауны северных морей [109]. Уточнен видовой состав Cladocera пресноводных озер и мелководных морей Азии [114, 115]; выяснено, что фауна Cladocera прибрежных вод о. Борнео существенно беднее материковой [116]. В бассейне р. Белая выделены четыре типа сообществ раковинных амёб (Testacea) [117].

Принципиально важна разработка комплексного подхода к долгосрочному мониторингу пространственной динамики видового и фаунистического разнообразия на основе регулярного сбора и анализа мониторинговых коллекций в фокальных регионах Северной Евразии [118]. Он позволяет выявлять регионы с потенциально повышенной уязвимостью биоразнообразия и предлагать меры по его сохранению.

Изучение экологического аспекта БР связано, главным образом, с анализом пространственной динамики энергетики птиц, населяющих разные природные зоны. Подтверждена значительная специфика энергетики тропических птиц Старого Света, в частности, отсутствие филогенетического сигнала в независимом от массы тела базальном метаболизме [119].

РАСТЕНИЯ

Реконструкция происхождения, расселения и родственных связей различных групп растений в проекте решается с широким привлечением в классическую науку молекулярных методов.

В семействе Fabaceae результаты многолетнего молекулярно-генетического и морфологического анализа диких лядвенцев позволили реконструировать не только эволюцию рода *Lotus*, но и ключевые

моменты исторической биогеографии группы [120]. Также показана независимость близких к лядвенцам родов *Hammatolobium*, *Tripodion* и *Cytisopsis* [121]. Также реконструирована история рода *Lagochilus* из семейства *Lamiaceae* [122]. Показано, что диверсификация этого центральноазиатского рода напрямую связана с недавней геологической историей и последующими климатическими сдвигами. В семействе *Ariaceae* на основе анализа ДНК пересмотрен объем внутривидовых подразделений в роде *Prangos*, в котором установлен новый подвид *Koelzella* [123]. В его составе, в свою очередь, в качестве отдельного вида восстановлен «забытый» афганский эндемик *Prangos akumatodes* [124]. Кроме того, в род *Prangos* для придания ему монофилетичности был перенесен монотипный род *Alococarpum* [125].

Интегративный молекулярно-морфологический подход позволяет не только устанавливать происхождение и родство таксонов, но и восстанавливать наиболее вероятный ход эволюции отдельных признаков. Так, установлено наличие односемянных плодов у общего предка порядка *Caryophyllales*, насчитывающего 12000 видов [126]. Дана подробная характеристика семян полифилетического рода *Mollugo*, что позволило сделать важные заключения для систематики и таксономии групп [127]. Согласованность признаков строения семян с новейшими молекулярными данными показана и для кавказских видов рода *Minuartia* [128].

С помощью молекулярно-филогенетического анализа показана необходимость пересмотра многих групп мхов. Наиболее показателен пример с полифилией семейства *Ditrichaceae*: подробный анализ убедительно показал, что признаки, считавшиеся таксономически значимыми, возникли независимо в разных группах [129]. Из этого родства описан новый порядок и три новых семейства мхов [130]. Дальнейшая ревизия отдельных групп мхов привела к значительному пересмотру отношений в порядке *Grimmiales* [131].

Решение частной задачи по описанию нового вида *Bryoerythrophyllum duellii* с привлечением молекулярных данных не только по этому роду, но и его ближайшим родственникам, позволило полностью пересмотреть объем рода *Bryoerythrophyllum* [132].

Проведено глубокое изучение геномов цветковых растений и мхов. Расшифрованы и аннотированы полные пластымы трех видов *Dryopteris*, *Adiantum hispidulum* [133], *Seseli montanum* [134] и ряд других. Детально изучена структура межгенного спейсера IGS1 рибосомного оперона у мхов из рода *Schistidium* [135].

Примером монографического исследования, которое сочетает как классический морфологиче-

ский подход, так и новейшие молекулярные методы, является обработка гербарных образцов диких луков из группы *Allium saxatile* [136]. Из 15 видов пять оказались новыми для науки. Географическая изоляция стала главной причиной недооцененного ранее видообразования – исследователям удалось описать новые виды из Румынии, Болгарии, России, Казахстана и Китая. Позднее был описан еще один вид лука из Узбекистана [137] и один из Турции [138].

Монографическая ревизия недавно описанного рода *Paramollugo* (*Molluginaceae*), который, как предполагалось, состоит всего из трех видов, позволила вдвое увеличить число известных видов [139]. Два новых вида описано на Мадагаскаре (*Paramollugo simulans* и *P. elliotii*), а еще один «забытый» вид обнаружен в коллекциях из Новой Каледонии.

Другой удачный пример монографической обработки – ревизия африканского рода *Corbichonia* (*Lophiocarpaceae*), который насчитывал всего два вида [140]. Был открыт и диагностирован третий вид – *C. exellii*, распространенный сразу в нескольких странах юга Африки.

Опубликованы результаты ревизии рода *Rhabdosciadium* из семейства *Ariaceae*, который включает семь видов, распространенных в горных местностях Турции и Ирана. Удалось проанализировать ДНК всех представителей рода, в том числе нескольких узколокальных эндемиков. Показана монофилетичность этого рода, и описан новый вид *R. anatolyi*, распространенный в Турецком Курдистане [141]. Также описан новый вид эндемичного зонтичного из Лаоса – *Xyloselinum laoticum* [142].

Продолжалось и традиционное изучение систематики и таксономии семейства *Chenopodiaceae*. Описан новый вид мари *Dysphania geoffreyi*, обитающий в труднодоступных для европейских исследователей Лхасе и Бутане [143]. Позднее была описана лебеда *Atriplex congolensis* из Демократической Республики Конго [144] и солерос *Arthrocnemum franzi* с островов Зеленого Мыса [145].

По результатам обширной ревизии рода *Atraphaxis* описано несколько новых таксонов семейства *Polygonaceae*: вид *Atraphaxis kamelinii* из Монголии [146], род *Bactria* с видом *B. lazkovii* из Киргизии [147] и род *Persepolium* [148].

По причинам номенклатурного характера пришлось повторно описать *Calciphlopteris wallichii* – новый вид папоротника с Филиппин [149]. Отметим и описание широко распространенного в Канаде и России нового вида мха *Schistidium relictum* [150].

Уточнение наших знаний о географическом распространении организмов идет двумя путями – при изучении имеющихся коллекций, которые ранее

не были точно описаны, и во время полевых исследований. В результате этой работы появляется целый пласт новых данных, которые получили название «флористические находки» [151].

Особняком стоит интереснейшая находка печеночника *Scapania aspera*. Удалось обнаружить в природе, верно распознать, а в дальнейшем и сделать анализ ДНК растения, найденного на Анабарском плато – в 3000 км от ближайших известных мест обитания этого печеночника в Европе [152].

Флористические новинки – верхушка огромного пласта информации, который накапливается в результате флористического обследования любой территории. Результаты таких работ отражаются во «Флорах» и чеклистах. Так, были обобщены результаты изучения флоры Севастополя. Показано, что западная оконечность Горного Крыма – один из самых флористически богатых уголков России, где на территории около 600 км² отмечено 1859 видов сосудистых растений [153].

Важные результаты в ходе выполнения проекта получены в области палинологии. Массовое пыление растений можно рассматривать не только как биологический процесс, но и как особое природное явление, которое может изучаться с позиций ботаники, метеорологии, палеогеографии, аллергологии.

Группой палинологов проанализированы многолетние данные по пылению березы в Московском регионе, установлены основные метеорологические факторы, влияющие на концентрацию пыльцы в период ее пыления [154]. Сравнительное исследование городских и загородных пыльцевых спектров показало, что данные станций мониторинга пыльцы, расположенные в крупных городах, могут быть экстраполированы на прилегающую сельскую местность [155].

Продолжены традиционные исследования морфологии и анатомии пыльцы и спор – детально описаны гетеробороздные пыльцевые зерна болотной незабудки *Myosotis scorpioides* и их развитие [156], а также строение спор сфагновых мхов на разных стадиях прорастания [157].

Гербарные образцы являются важным и легко доступным источником для отбора образцов ДНК, однако в процессе хранения молекулы ДНК постепенно разрушаются. В связи с этим, отдельного внимания заслуживает разработанный метод извлечения ДНК из старых гербарных образцов [158].

Перевод данных коллекций в электронный вид или, иными словами, виртуализация коллекционного пространства задумывалась как магистральное направление в работах по изучению растений. Основу этой работы составляет большой проект по переводу в цифровой формат Гербария МГУ [159].

МИКРООРГАНИЗМЫ И ГРИБЫ

В рамках направления «Микроорганизмы и грибы» создан банк-депозитарий бактерий, грибов, грибоподобных организмов (миксомицеты и оомицеты) и водорослей. Наряду с обширными, важными для науки и практики коллекциями собран уникальный массив информации о микроорганизмах. Уникальность коллекций биоматериала и знаний, собранных в рамках работы по проекту, – в его комплексности и полноте охвата биоразнообразия и разнообразия местообитаний. Охарактеризованы микробные сообщества почв разных природных зон, урбанизированных биотопов, местообитаний с экстремальными условиями [160]. Важным направлением стало изучение микробных сообществ почв Антарктиды [161–165]. Основные грибы-доминанты в антарктических почвах с моховым покровом – представители родов *Phoma*, *Thelebolus*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, в «каменных мостовых» – *Cadophora*, *Cladosporium*, *Cladophialophora*, в аквальных биотопах – *Antarctomyces*, *Hyphozyma*, *Goffeauzyma*, *Phoma*, *Thelebolus*, *Geotrichum*.

Другая группа грибов в фокусе исследований разнообразия, экологии и возможностей использования – это макромицеты. В экосистемах это одни из основных редуцентов, возвращающих в круговорот биогенные элементы. В результате проведенных работ выявлены редкие виды [166], описан ряд новых для науки видов грибов-макромицетов [167–169]. Не менее важным представляется исследование урбанизированных экосистем, а также инвентаризация присутствия и оценка содержания потенциально патогенных видов грибов в почвенном покрове [170, 171], на пыльце растений [172]. В городских почвах формируются комплексы микромицетов, обогащенные потенциально опасными для здоровья и вызывающими биоповреждения видами [171]. С другой стороны, создаваемые в городах парки и ботанические сады остаются пристанищем для редких и интересных видов грибов и миксомицетов. Исследованы ранее не изученные и мало освещенные особенности дрожжевых группировок различных типов почв и биоценозов: почв умеренной полосы России [173], почв под зарослями инвазивных растений (таких, как *Heracleum sosnowskyi*) [174–176], почв под виноградниками Дагестана [177, 178] и плантаций Южного Вьетнама [179]. Почвы оказались природным резервуаром разнообразия дрожжей.

Грибы и грибоподобные организмы (миксомицеты и оомицеты) крайне важны как для функционирования природных сообществ, так и для хозяйственной деятельности человека. Распространены они повсеместно, и для их изучения необходим сбор материалов в различных регионах. При этом важно охватить

как эталонные места обитания на особо охраняемых природных территориях, так и антропогенно измененные территории. Проект позволил выполнить беспрецедентно широкие исследования разнообразия почвообитающих микроскопических грибов и миксомицетов заповедников – Центральнолесного биосферного заповедника [180], заповедника «Калужские засеки», природного парка «Волго-Ахтубинская пойма». Собраны обширные данные по разнообразию и распространению микроскопических грибов в заповедных лесах Вьетнама как культивируемых видов, так и некультивируемых, а также миксомицетов [181].

Созданные в рамках проекта коллекции стали уникальной базой для поиска и исследования практически значимых видов микроорганизмов. Выявлены активные штаммы, образующие антибиотики из группы пептабиолов широкого спектра действия [182], противоопухолевый метаболит Brefeldin-A, а также культуры, которые можно использовать при производстве препаратов стероидов [183]. Большой интерес и практическое значение представляет изучение фитопатогенных грибов как в естественных местообитаниях, являющихся резервуарами для патогенов [184], так и в агроценозах. Собраны обширные коллекции, на основе которых проведены популяционные исследования наиболее опасных патогенов картофеля – *Phytophthora infestans* [185] и *Alternaria* [186], выявлены популяционные особенности и механизмы устойчивости к фунгицидам [187, 188]. Среди огромного разнообразия микроорганизмов, населяющих различные горизонты почв, отдельного внимания заслуживают дрожжевые грибы как одна из наиболее биотехнологически значимых групп микроорганизмов [189].

Выявление в экстремальных природных местообитаниях Земли наиболее устойчивых микроорганизмов – одна из важнейших задач микробиологии, решение которой невозможно без исследования древних пород. Исследование радиорезистентности микробных сообществ вечномерзлых осадочных пород Арктики путем воздействия гамма-излучения (100 кГр) в условиях низкой температуры (-50°C) и низкого давления (1 мм рт.ст.) может рассматриваться как земной аналог условий обитания микроорганизмов в реголите Марса. Микробные сообщества вечномерзлых пород показали высокую устойчивость к воздействию моделируемых условий инопланетной среды, сохранив высокую численность культивируемых и метаболически активных прокариот [190]. Полученные результаты свидетельствуют о возможности длительной криоконсервации жизнеспособных микроорганизмов в марсианском реголите. С учетом интенсивности излучения на по-

верхности Марса, наши данные позволяют предполагать сохранение гипотетических экосистем Марса в анабиотическом состоянии в слое реголита (защищенном от УФ-лучей) в течение не менее 1.3–2 млн лет. На глубине 2 м (предполагаемая глубина отбора образцов миссией ExoMars 2020) – не менее 3.3 млн лет, а на глубине 5 м – не менее 20 млн лет. Особый интерес представляют микроскопические грибы, приспособленные к обитанию в экстремальных условиях засоления и щелочных значений pH среды. В связи с этим создана и изучена коллекция изолятов из Беломорских заболоченных местообитаний [191] и содовых солончаков [192]. На основе материалов, полученных в результате этих флористических работ, проведены физиологические и биохимические исследования механизмов толерантности к стрессу, связанных со структурой мембран [193].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Приведенные данные убедительно демонстрируют, каких существенных научных результатов можно добиться при использовании глобального подхода к анализу биологических коллекций, т.е. при анализе большого количества образцов вне зависимости от их природы (зоологические, ботанические или микробиологические коллекции). Более того, зависимость качества сравнительных исследований от количества используемых в них образцов, судя по всему, является линейной или даже экспоненциальной при сколь угодно больших числах. Таким образом, для дальнейшего развития данного подхода необходимо всемерно увеличивать количество доступных для работы биологических образцов. Наиболее удачным способом реализации этого постулата нам видится объединение максимально возможного числа биологических коллекций в едином информационном пространстве. Прототип такого пространства уже создан – это информационная система проекта «Ноев ковчег» (<https://depo.msu.ru/>), по состоянию на март 2018 года содержащая информацию более чем о миллионе единиц хранения. Выведение этой системы на всероссийский уровень даст мощнейший толчок к развитию наук о жизни в нашей стране и к внедрению результатов фундаментальных исследований в практику. Именно расширение информационной системы проекта видится нам как одна из основных перспектив его развития.

Успех проекта «Ноев ковчег» во многом обусловлен его междисциплинарностью. В частности, именно выполнение проекта позволило держателям классических биологических коллекций МГУ осуществить их давнюю мечту, а именно, создать генетические и биохимические сервисные лаборатории, основной функцией которых является обслуживание дан-

ных коллекций. Конечно, соответствующий анализ хранящихся в них образцов проводился и ранее, но в этом участвовали лаборатории, для которых этот вид деятельности не был основным, что, конечно же, сказывалось на эффективности работы. В настоящее время любой вновь закладываемый на хранение в коллекции МГУ образец подвергается генетической и зачастую биохимической паспортизации; также появилась возможность анализа ДНК, выделяемой из музейных образцов. Нужно отметить работы с образцами, проводимые при помощи разнообразных методов микроскопии. Очевидно, что такой подход позволяет получить более значимые научные результаты. Не вызывает сомнений, что подобный синтез классических и современных методов исследования необходимо всячески поддерживать и развивать.

Таким образом, в качестве основных перспектив развития проекта «Ноев ковчег» следует отметить:

- расширение информационной системы проекта до всероссийского (в более дальней перспективе – до международного) уровня,
- развитие генетических, биохимических и физико-химических методов анализа образцов биологических коллекций. ●

Авторы выражают глубокую признательность коллективу исполнителей работ по гранту – команде проекта «Ноев ковчег». М.В. Калякин особенно благодарен И.Я. Павлинову за помощь в работе над статьей.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлинов И.Я., Калякин М.В., Сысоев А.В. // Сбор. тр. Зоол. муз. МГУ. 2016. Т. 54. С. 733–786.
2. Temereva E.N. // *Evol. Dev.* 2017. V. 19. P. 171–189.
3. Temereva E.N., Chichvarkhin A. // *Invertebr. Syst.* 2017. V. 31. № 1. P. 65–84.
4. Temereva E.N., Kosevich I.A. // *BMC Evol. Biol.* 2016. V. 16. № 181. P. 1–24.
5. Temereva E.N., Neretina T.V., Stupnikova A.N. // *Russ. J. Mar. Biol.* 2016. V. 42. № 2. P. 128–138.
6. Temereva E.N., Malakhov V.V. // *BMC Evol. Biol.* 2015. V. 15. № 229. P. 1–28.
7. Temereva E.N. // *J. Zool.* 2015. V. 296. № 2. P. 79–94.
8. Temereva E.N., Tsitrin E.B. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 4. P. e0123040.
9. Temereva E.N., Gebruk A.A., Malakhov V.V. // *Zool. Anz.* 2015. V. 256. P. 22–27.
10. O'Hara T.D., Hugall A.F., Thuy B., Stohr S., Martynov A.V. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017. V. 107. P. 415–430.
11. Korshunova T., Martynov A., Bakken T., Evertsen J., Fletcher K., Mudianta I.W., Saito H., Lundin K., Schrod M., Picton B. // *Zookeys.* 2017. № 717. P. 1–139.
12. Stohr S., Martynov A. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 11. P. e0164562.
13. Ezhova O.V., Malakhov V.V., Martynov A.V. // *Zoomorphology.* 2016. V. 135. № 3. P. 333–350.
14. Zhadan A., Vortsepneva E., Tzetlin A. // *Zoomorphology.* 2015. V. 134. № 4. P. 509–521.
15. Martynov A., Ishida Y., Irimura S., Tajiri R., O'Hara T., Fujita T. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 10. P. e0139463.
16. Lin H.C., Kolbasov G.A., Chan B.K.K. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016. V. 100. P. 292–302.
17. Korshunova T., Zimina O., Martynov A. // *J. Mollus. Stud.* 2017. V. 83. P. 409–421.
18. Korshunova T., Martynov A., Picton B. // *Zootaxa.* 2017. V. 4324. № 1. P. 1–22.
19. Sinev A.Y., Tiang-Nga S., Sanoamuang L. // *Zootaxa.* 2017. V. 4276. № 3. P. 416–426.
20. Martynov A., Korshunova T. // *J. Mollus. Stud.* 2015. V. 81. P. 365–379.
21. Borisanova A.O. // *Zootaxa.* 2016. V. 4084. № 1. P. 135–142.
22. Shenbrot G., Bannikova A., Giraudoux P., Quere J.P., Raoul F., Lebedev V. // *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 2017. V. 55. № 4. P. 356–368.
23. Bobrov A., Mazei Y. // *Zootaxa.* 2017. V. 4294. № 5. P. 600–600.
24. Bobrov A., Mazei Y. // *Zootaxa.* 2017. V. 4282. № 2. P. 292–308.
25. Kolbasova G.D., Zalevsky A.O., Gafurov A.R., Gusev P.O., Ezhova M.A., Zheludkevich A.A., Konovalova O.P., Kosobokova K.N., Kotlov N.U., Lanina N.O., et al. // *Polar Biol.* 2015. V. 38. № 9. P. 1439–1451.
26. Borisanova A.O., Potanina D.M. // *Zootaxa.* 2016. V. 4184. № 2. P. 376–382.
27. Temereva E.N., Stupnikova A.N., Neretina T.V. // *Syst. Biodivers.* 2016. V. 14. № 5. P. 509–523.
28. Tchesunov A.V. // *Zootaxa.* 2017. V. 4306. № 4. P. 478–500.
29. Fedyaeva M.A., Neretina T.V., Konovalova O.P., Tchesunov A.V. // *Zootaxa.* 2016. V. 4121. № 4. P. 382–411.
30. Zhadan A.E., Tzetlin A.B., Salazar-Vallejo S.I. // *Zootaxa.* 2017. V. 4226. № 1. P. 75–92.
31. Jirkov I.A. // *Zootaxa.* 2016. V. 4117. № 1. P. 125–134.
32. Schiaparelli S., Jirkov I.A. // *Ital. J. Zool.* 2016. V. 83. № 4. P. 531–542.
33. Zhadan A. // *Rec. Aust. Mus.* 2015. V. 67. № 1. P. 1–24.
34. Kulagin D.N., Neretina T.V. // *ICES J. Mar. Sci.* 2017. V. 74. № 7. P. 1875–1884.
35. Korshunova T., Martynov A., Bakken T., Picton B. // *Zool. Scr.* 2017. V. 46. № 6. P. 683–692.
36. Martynov A., Korshunova T. // *Zootaxa.* 2017. V. 4299. № 3. P. 391–404.
37. Furfaro G., Picton B., Martynov A., Mariottini P. // *Zootaxa.* 2016. V. 4193. № 2. P. 304–316.
38. Shipway J.R., O'Connor R., Stein D., Cragg S.M., Korshunova T., Martynov A., Haga T., Distel D.L. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 5. P. e0155269.
39. Korshunova T.A., Sanamyan N.P., Martynov A.V. // *Zookeys.* 2016. № 634. P. 15–28.
40. Korshunova T., Sanamyan N., Zimina O., Fletcher K., Martynov A. // *Zookeys.* 2016. № 630. P. 19–42.
41. Ekimova I., Korshunova T., Schepetov D., Neretina T., Sanamyan N., Martynov A. // *Zool. J. Linn. Soc.-Lond.* 2015. V. 173. № 4. P. 841–886.
42. Kolbasov G.A., Chan B.K.K., Cheng Y.R. // *Zootaxa.* 2017. V. 4290. № 3. P. 591–599.
43. Yu M.C., Kolbasov G.A., Hosie A.M., Lee T.M., Chan B.K.K. // *Zootaxa.* 2017. V. 4277. № 2. P. 151–198.

44. Maran B.A.V., Kim I.H., Bratova O.A., Ivanenko V.N. // *Syst. Parasitol.* 2017. V. 94. № 2. P. 227–241.
45. Kolbasov G.A., Chan B.K.K., Molodtsova T.N., Achituv Y. // *Zootaxa.* 2016. V. 4178. № 2. P. 182–208.
46. Kolbasov G.A., Chan B.K.K., Petrunina A.S. // *Zootaxa.* 2015. V. 3972. № 3. P. 328–342.
47. Mikhailov K.G., Otto S., Japoshvili G. // *Zool. Middle East.* 2017. V. 63. № 4. P. 362–368.
48. Mikhailov K.G. // *Zookeys.* 2016. № 558. P. 153–169.
49. Tishechkin D.Y. // *Zootaxa.* 2017. V. 4216. № 6. P. 537–558.
50. Galinskaya T.V., Shatalkin A.I. // *Orient. Insects.* 2017. V. 51. № 1. P. 6–10.
51. Gorbunov O.G., Krupitsky A.V., Marusov A.A. // *Zootaxa.* 2017. V. 4273. № 4. P. 559–575.
52. Prosvirov A.S. // *Zootaxa.* 2017. V. 4323. № 2. P. 269–276.
53. Prosvirov A.S. // *Zootaxa.* 2017. V. 4232. № 3. P. 376–384.
54. Prosvirov A.S. // *Zootaxa.* 2016. V. 4168. № 2. P. 279–296.
55. Galinskaya T.V. // *Zookeys.* 2016. № 615. P. 119–141.
56. Galinskaya T.V., Shatalkin A.I. // *Zootaxa.* 2015. V. 4012. № 3. P. 581–592.
57. Ozerov A.L., Krivosheina M.G. // *Zootaxa.* 2015. V. 4012. № 2. P. 201–257.
58. Tishechkin D.Y. // *Zootaxa.* 2015. V. 3985. № 1. P. 31–52.
59. Prosvirov A.S. // *Zootaxa.* 2015. V. 3980. № 3. P. 442–446.
60. Krivosheina M.G., Ozerov A.L. // *Zootaxa.* 2015. V. 3974. № 4. P. 595–598.
61. Markevich G.N., Esin E.V., Saltykova E.A., Busarova O.Y., Anisimova L.A., Kuzishchin K.V. // *Russ. J. Mar. Biol.* 2017. V. 43. № 3. P. 216–223.
62. Vasil'eva E.D., Kim D., Vasil'ev V.P., Ko M.H., Won Y.J. // *Zootaxa.* 2016. V. 4208. № 6. P. 577–591.
63. Vasil'eva E.D., Mousavi-Sabet H., Vasil'ev V.P. // *Acta Ichthyol. Piscat.* 2015. V. 45. № 2. P. 189–197.
64. Chen J.M., Zhou W.W., Poyarkov N.A., Stuart B.L., Brown R.M., Lathrop A., Wang Y.Y., Yuan Z.Y., Jiang K., Hou M., et al. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2017. V. 106. P. 28–43.
65. Min M.S., Baek H.J., Song J.Y., Chang M.H., Poyarkov N.A. // *Zootaxa.* 2016. V. 4169. № 3. P. 475–503.
66. Orlov N.L., Poyarkov N.A., Nguyen T.T. // *Russ. J. Herpetol.* 2015. V. 22. № 3. P. 206–218.
67. Poyarkov N.A., Rowley J.J.L., Gogoleva S.I., Vassilieva A.B., Galoyan E.A., Orlov N.L. // *Zootaxa.* 2015. V. 3931. № 2. P. 221–252.
68. Faizi H., Rastegar-Pouyani N., Rastegar-Pouyani E., Nazarov R., Heidari N., Zangi B., Orlova V., Poyarkov N. // *Zootaxa.* 2017. V. 4320. № 2. P. 289–304.
69. Alstrom P., Rasmussen P.C., Zhao C., Xu J.Z., Dalvi S., Cai T.L., Guan Y.Y., Zhang R.Y., Kalyakin M.V., Lei F.M., Olsson U. // *Avian Res.* 2016. V. 7. P. 1–39.
70. Kruskop S.V. // *Acta Chiropterol.* 2015. V. 17. № 1. P. 49–57.
71. Tishechkin D.Y. // *Zootaxa.* 2017. V. 4318. № 3. P. 531–547.
72. Tishechkin D.Y. // *Zootaxa.* 2017. V. 4318. № 1. P. 167–176.
73. Tishechkin D.Y. // *Zootaxa.* 2015. V. 3999. № 4. P. 537–548.
74. Poyarkov N.A., Duong T.V., Orlov N.L., Gogoleva S.S., Vassilieva A.B., Nguyen L.T., Nguyen V.D.H., Nguyen S.N., Che J., Mahony S. // *Zookeys.* 2017. № 672. P. 49–120.
75. Vassilieva A.B., Gogoleva S.S., Poyarkov N.A. // *Zootaxa.* 2016. V. 4127. № 3. P. 515–536.
76. Samotskaya V., Marova I., Kvartalnov P., Arkhipov V.Y., Ivanitskii V. // *Bird Study.* 2016. V. 63. № 4. P. 479–489.
77. Zhantiev R., Korsunovskaya O., Benediktov A. // *Eur. J. Entomol.* 2017. V. 114. P. 301–311.
78. Prudkovsky A.A., Neretina T.V. // *Polar Biol.* 2016. V. 39. № 3. P. 533–542.
79. Galinskaya T.V., Oyun N.Y., Teterina A.A., Shatalkin A.I. // *Oriental Insects.* 2016. V. 50. № 2. P. 69–83.
80. Soshina V.A., Pavlov S.D., Zelenina D.A. // *Russ. J. Genet.* 2016. V. 52. № 11. P. 1208–1213.
81. Pavlov S.D., Ponomareva E.V., Kholodova M.V., Melnikova M.N., Mineeva T.V. // *Biol. Bull.* 2016. V. 43. № 1. P. 12–20.
82. Stierandova S., Vukic J., Vasil'eva E.D., Zogaris S., Shumka S., Halacka K., Vetesnik L., Svatora M., Nowak M., Stefanov T., et al. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016. V. 94. P. 479–491.
83. Gruzdeva M.A., Pichugin M.Y., Kuzishchin K.V., Pavlov S.D., Melnikova M.N. // *Russ. J. Mar. Biol.* 2015. V. 41. № 6. P. 432–447.
84. Osinov A.G., Senchukova A.L., Mugue N.S., Pavlov S.D., Chereshev I.A. // *Biol. J. Linn. Soc.* 2015. V. 116. № 1. P. 63–85.
85. Poyarkov N.A., Orlov N.L., Moiseeva A.V., Pawangkhanant P., Ruangsuwan T., Vassilieva A.B., Galoyan E.A., Nguyen T.T., Gogoleva S.S. // *Russ. J. Herpetol.* 2015. V. 22. № 4. P. 241–280.
86. Orlova V.F., Poyarkov N.A., Chirikova M.A., Nazarov R.A., Munkhbaatar M., Munkhbayar K., Terbish K. // *Zootaxa.* 2017. V. 4282. № 1. P. 1–42.
87. Spiridonova L.N., Valchuk O.P., Red'kin Y.A., Saitoh T., Kryukov A.P. // *Russ. J. Genet.* 2017. V. 53. № 8. P. 885–902.
88. Conklin J.R., Reneerkens J., Verkuil Y.I., Tomkovich P.S., Palsboll P.J., Piersma T. // *J. Ornithol.* 2016. V. 157. № 1. P. 325–332.
89. Abramov A.V., Bannikova A.A., Lebedev V.S., Rozhnov V.V. // *Zootaxa.* 2017. V. 4232. № 2. P. 216–230.
90. Bannikova A.A., Zemlemerova E.D., Colangelo P., Sozen M., Sevindik M., Kidov A.A., Dzuev R.I., Krystufek B., Lebedev V.S. // *Zool. J. Linn. Soc.-Lond.* 2015. V. 175. № 4. P. 930–948.
91. Bogdanov A.S., Lebedev V.S., Zykov A.E., Bakloushinskaya I.Y. // *Russ. J. Genet.* 2015. V. 51. № 12. P. 1243–1248.
92. Poplavskaya N.S., Romanenko S.A., Serdyukova N.A., Trifonov V.A., Yang F.T., Nie W.H., Wang J.H., Bannikova A.A., Surov A.V., Lebedev V.S. // *Cytogenet. Genome Res.* 2017. V. 152. № 2. P. 65–72.
93. Poplavskaya N.S., Lebedev V.S., Bannikova A.A., Belokon M.M., Belokon Y.S., Pavlenko M.V., Korablev V.P., Kartavtseva I.V., Bazhenov Y.A., Surov A.V. // *Russ. J. Genet.* 2017. V. 53. № 1. P. 76–90.
94. Lissovsky A.A., Obolenskaya E.V., Ge D.Y., Yang Q.S. // *Hystrix.* 2017. V. 28. № 1. P. 107–109.
95. Lissovsky A.A., Yatsentyuk S.P., Ge D.Y. // *Zool. Scr.* 2016. V. 45. № 6. P. 583–594.
96. Yuan Z.-Y., Zhou W.-W., Chen X., Poyarkov N.A., Chen H.-M., Jang-Liaw N.-L., Chou W.-H., Matzke N.J., Iizuka K., et al. // *Syst. Biol.* 2016. V. 65. № 5. P. 824–842.
97. Редькин Я.А., Архипов В.Ю., Волков С.В., Мосалов А.А., Коблик Е.А. // XIV Межд. орнит. конф. Сев. Евр. 2015. Т. 2. С. 104–138.
98. Spangenberg V., Arakelyan M., Galoyan E., Matveevsky S., Petrosyan R., Bogdanov Y., Danielyan F., Kolomiets O. // *Genes.* 2017. V. 8. № 6. e149. doi: 10.3390/genes8060149
99. Мельникова М.Н., Сенчукова А.Л., Павлов С.Д., Малютина А.М. // *Изв. Акад. наук. Сер. биол.* 2018. № 1. С. 16–21.
100. Soshina V.A., Pavlov S.D., Zelenina D.A. // *Russ. J. Genet.* 2016. V. 52. № 11. P. 1336–1341.
101. Anton E., Yavorskaya M.I., Beutel R.G. // *J. Morphol.* 2016. V. 277. № 5. P. 615–633.
102. Polilov A.A., Shmakov A.S. // *Arthropod Struct. Dev.* 2016. V. 45. № 5. P. 496–507.
103. Temereva E.N. // *J. Morphol.* 2018. V. 279. № 2. P. 199–215.
104. Nanova O., Proa M. // *Polar Res.* 2017. V. 36. doi: 10.1080/17518369.2017.1310976
105. Tchesunov A.V. // *Helgoland Mar. Res.* 2015. V. 69. № 4. P. 343–384.

106. Geisen S., Mitchell E.A.D, Wilkinson D., Adl S., Bonkowski M., Brown M., Fiore-Donne A.M., Heger Th., Jasey V., Krashvska V., et al. // *Soil Biol. Biochem.* 2017. V. 111. P. 94–103.
107. Azovsky A.I., Garlitska L.A., Chertoprud E.S. // *Mar. Biol.* 2016. V. 163. № 5. P. 1–12.
108. Novichkova A.A., Azovsky A.I. // *Polar Biol.* 2017. V. 40. № 1. P. 185–198.
109. Kokarev V.N., Vedenin A.A., Basin A.B., Azovsky A.I. // *J. Sea Res.* 2017. V. 129. P. 61–69.
110. Ratcliffe J., Creevy A., Andersen R., Zarov E., Gaffney P., Taggart M., Mazei Yu., Tsyganov A., Rowson J., Lapshina E.D., et al. // *Sci. Total Environ.* 2017. V. 607–608. P. 816–828.
111. Novichkova A.A., Chertoprud E.S. // *J. Nat. Hist.* 2017. V. 51. № 29–30. P. 1781–1793.
112. Alalykina I.L., Dnestrovskaya N.Y., Jirkov I.A. // *Zookeys.* 2017. № 684. P. 1–18.
113. Garlitska L.A., Azovsky A.I. // *J. Nat. Hist.* 2016. V. 50. № 47–48. P. 2941–2959.
114. Chertoprud E.S., Sinev A.Y., Dimante-Deimantovica I. // *Zootaxa.* 2017. V. 4258. № 6. P. 561–573.
115. Sinev A.Y. // *Zootaxa.* 2016. V. 4200. № 4. P. 451–486.
116. Sinev A.Y., Yusoff F.M. // *Zootaxa.* 2015. V. 4000. № 5. P. 581–591.
117. Malysheva E., Mazei N., Shapovalov M., Saprykin M., Mazei Yu. // *Inland Water Biol.* 2017. V. 10. № 1. P. 92–96.
118. Romanov A.A., Koroleva E.G., Dikareva T.V. // *Nat. Conservation-Bulgaria.* 2017. № 22. P. 191–218.
119. Bushuev A., Tolstenkov O., Zubkova E., Solovyeva E., Kerimov A. // *Curr. Zool.* 2018. V. 64. № 1. P. 33–43.
120. Kramina T.E., Degtjareva G.V., Samigullin T.H., Valiejo-Roman C.M., Kirkbride J.H., Volis S., Deng T., Sokoloff D.D. // *Taxon.* 2016. V. 65. № 5. P. 997–1018.
121. Sokoloff D.D., Kramina T.E. // *Phytotaxa.* 2016. V. 245. № 1. P. 75–78.
122. Zhang M.L., Zeng X.Q., Sanderson S.C., Byalt V.V., Sukhorukov A.P. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 9. P. e0178389.
123. Lyskov D.F., Degtjareva G.V., Samigullin T.H., Pimenov M.G. // *Plant Systematics Evol.* 2017. V. 303. № 7. P. 815–826.
124. Lyskov D., Samigullin T. // *Phytotaxa.* 2017. V. 326. № 3. P. 202–210.
125. Lyskov D.F., Samigullin T.H., Pimenov M.G. // *Phytotaxa.* 2017. V. 299. № 2. P. 223–233.
126. Sukhorukov A.P., Mavrodiev E.V., Struwig M., Nilova M.V., Dzhaililova K.K., Balandin S.A., Erst A., Krinitsyna A.A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 2. P. e0117974.
127. Sukhorukov A.P., Kushunina M. // *Israel J. Plant Sci.* 2017. V. 64. № 1–2. P. 31–47.
128. Zaychenko S.G., Zernov A.S. // *Wulfenia.* 2017. V. 24. P. 205–220.
129. Fedosov V.E., Fedorova A.V., Ignatova E.A., Bobrova V.K., Troitsky A.V. // *Mol. Biol.* 2015. V. 49. № 6. P. 890–894.
130. Fedosov V.E., Fedorova A.V., Fedosov A.E., Ignatov M.S. // *Bot. J. Linnean Soc.* 2016. V. 181. № 2. P. 139–155.
131. Fedosov V., Fedorova A., Ignatova E. // *J. Bryology.* 2017. V. 39. № 2. P. 161–170.
132. Blockeel T.L., Kucera J., Fedosov V.E. // *J. Bryology.* 2017. V. 39. № 3. P. 247–254.
133. Logacheva M.D., Krinitsina A.A., Belenikin M.S., Khafizov K., Konorov E.A., Kuptsov S.V., Speranskaya A.S. // *BMC Plant Biology.* 2017. V. 17. № S2. P. 255.
134. Samigullin T.H., Logacheva M.D., Terenteva E.I., Degtjareva G.V., Vallejo-Roman C.M. // *Biochemistry (Moscow).* 2016. V. 81. № 9. P. 981–985.
135. Milyutina I.A., Ignatova E.A., Ignatov M.S., Goryunov D.V., Troitsky A.V. // *Biochemistry (Moscow).* 2015. V. 80. № 11. P. 1485–1491.
136. Seregin A.P., Anackov G., Friesen N. // *Bot. J. Linnean Soc.* 2015. V. 178. № 1. P. 67–101.
137. Seregin A.P. // *Phytotaxa.* 2015. V. 205. № 3. P. 211–214.
138. Kocyiğit M., Seregin A.P., Ozhatay N., Friesen N. // *Phytotaxa.* 2016. V. 275. № 3. P. 228–242.
139. Sukhorukov A.P., Kushunina M. // *Phytokeys.* 2016. № 73. P. 93–116.
140. Sukhorukov A.P., Kushunina M. // *Phytotaxa.* 2015. V. 218. № 3. P. 227–240.
141. Lyskov D., Kljuykov E., Guner E.D., Samigullin T. // *Phytotaxa.* 2017. V. 331. № 2. P. 253–262.
142. Pimenov M.G., Degtjareva G.V., Ostroumova T.A., Samigullin T.H., Averyanov L.V. // *Phytotaxa.* 2016. V. 244. № 3. P. 248–262.
143. Sukhorukov A.P., Zhang M.L., Kushunina M. // *Phytotaxa.* 2015. V. 203. № 2. P. 138–146.
144. Sukhorukov A.P., Kushunina M., Verloove F. // *Plant Ecol. Evol.* 2016. V. 149. № 2. P. 249–256.
145. Sukhorukov A.P., Nilova M.V. // *Botany Lett.* 2016. V. 163. № 3. P. 237–250.
146. Yurtseva O.V., Kuznetsova O.I., Mavrodiev E.V. // *Phytotaxa.* 2016. V. 268. № 1. P. 1–24.
147. Yurtseva O.V., Kuznetsova O.I., Mavrodieva M.E., Mavrodiev E.V. // *Peer J.* 2016. V. 4. P. e1977.
148. Yurtseva O.V., Severova E.E., Mavrodiev E.V. // *Phytotaxa.* 2017. V. 314. № 2. P. 151–194.
149. Seregin A.P. // *Phytotaxa.* 2017. V. 303. № 1. P. 89–92.
150. McIntosh T.T., Blom H.H., Kuznetsova O.I., Ignatova E.A. // *Phytotaxa.* 2017. V. 299. № 2. P. 234–242.
151. Nobis M., Nowak A., Piwowarczyk R., Ebel A.L., Kiraly G., Kushunina M., Sukhorukov A.P., Chernova O.D., Kipriyanova L.M., Paszko B., et al. // *Botany Lett.* 2016. V. 163. № 2. P. 159–174.
152. Borovichev E., Fedosov V., Vilnet A. // *Cryptogamie Bryol.* 2016. V. 37. № 4. P. 445–454.
153. Seregin A.P., Yevseyenkov P.E., Svirin S.A., Fateryga A.V. // *Wulfenia.* 2015. V. 22. P. 33–82.
154. Severova E., Volkova O. // *Aerobiologia.* 2017. V. 33. № 2. P. 253–264.
155. Volkova O., Severova E., Nosova M. // *Grana.* 2016. V. 55. № 4. P. 311–318.
156. Volkova O., Severova E., Polevova S. // *Grana.* 2017. V. 56. № 5. P. 368–376.
157. Polevova S., Krinitsina A. // *Wulfenia.* 2017. V. 24. P. 125–133.
158. Krinitsina A.A., Sizova T.V., Zaika M.A., Speranskaya A.S., Sukhorukov A.P. // *Biochemistry (Moscow).* 2015. V. 80. № 11. P. 1478–1484.
159. Seregin A.P. // *Taxon.* 2016. V. 65. № 1. P. 206–208.
160. Dobrovol'skaya T., Zvyagintsev D., Chernov I.Y., Golovchenko A., Zenova G., Lysak L., Manucharova N., Marfenina O., Polyanskaya L., Stepanov A. // *Eurasian Soil Sci.* 2015. V. 48. № 9. P. 959–967.
161. Kudinova A., Lysak L., Soina V., Mergelov N., Dolgikh A., Shorkunov I. // *Eurasian Soil Sci.* 2015. V. 48. № 3. P. 276–287.
162. Manucharova N., Trosheva E., Kol'tsova E., Demkina E., Karaevskaya E., Rivkina E., Mardanov A. // *Microbiology.* 2016. V. 85. № 1. P. 102–108.
163. Marfenina O., Nikitin D., Ivanova A. // *Eurasian Soil Sci.* 2016. V. 49. № 8. P. 934–941.
164. Nikitin D., Marfenina O., Kudinova A., Lysak L., Mergelov N., Dolgikh A., Lupachev A. // *Eurasian Soil Sci.* 2017. V. 50. № 9. P. 1086–1097.

165. Pankratov T., Kachalkin A., Korchikov E., Dobrovolskaya T. // *Microbiology*. 2017. V. 86. № 3. P. 293–309.
166. Viner I.A., Kokaeva L.Y. // *Folia Cryptogamica Estonica*. 2017. V. 54. P. 43.
167. Crous P., Wingfield M., Guarro J., Hernández-Restrepo M., Sutton D., Acharya K., Barber P., Boekhout T., Dimitrov R., Dueñas M. // *Persoonia: Mol. Phylogeny Evol. Fungi*. 2015. V. 34. P. 167.
168. Crous P., Wingfield M.J., Burgess T., Carnegie A., Hardy G.S.J., Smith D., Summerell B.A., Cano-Lira J., Guarro J., Houbraken J., et al. // *Persoonia*. 2017. V. 39. P. 270–467.
169. Morozova O., Noordeloos M., Popov E., Alexandrova A. // *Mycol. Progress*. 2018. V. 17. P. 381–392.
170. Ivanova A., Nikolaeva V., Marfenina O. // *Eurasian Soil Sci*. 2015. V. 48. № 5. P. 501–508.
171. Marfenina O.E., Danilogorskaya A.A. // *Pedobiologia*. 2017. V. 60. P. 11–19.
172. Glushakova A., Kachalkin A., Zheltikova T., Chernov I.Y. // *Microbiology*. 2015. V. 84. № 5. P. 722–725.
173. Glushakova A., Kachalkin A., Tiunov A., Chernov I.Y. // *Eurasian Soil Sci*. 2017. V. 50. № 7. P. 820–825.
174. Glushakova A., Kachalkin A., Chernov I.Y. // *Eurasian Soil Sci*. 2015. V. 48. № 2. P. 201–207.
175. Glushakova A., Kachalkin A., Chernov I.Y. // *Microbiology*. 2015. V. 84. № 5. P. 717–721.
176. Glushakova A., Kachalkin A., Chernov I.Y. // *Eurasian Soil Sci*. 2016. V. 49. № 7. P. 792–795.
177. Abdullabekova D., Magomedova E., Magomedov G., Aliverdieva D., Kachalkin A. // *Eurasian Soil Sci*. 2017. V. 50. № 12. P. 1463–1467.
178. Kachalkin A., Abdullabekova D., Magomedova E., Magomedov G., Chernov I.Y. // *Microbiology*. 2015. V. 84. № 3. P. 425–432.
179. Glushakova A., Kachalkin A., Maksimova I., Chernov I.Y. // *Microbiology*. 2016. V. 85. № 4. P. 488–492.
180. Gmoshinskiy V.I., Buchtoyarova N.Y., Matveev A.V. // *Botanica Lithuanica*. 2017. V. 23. № 2. P. 107–110.
181. Novozhilov Y.K., Erastova D.A., Shchepin O.N., Schnittler M., Alexandrova A.V., Popov E.S., Kuznetov A.N. // *Nova Hedwigia*. 2017. V. 104. № 1–2. P. 143–182.
182. Sadykova V., Kurakov A., Korshun V., Rogozhin E., Gromovykh T., Kuvarina A., Baranova A. // *Antibiotiki i khimioterapiia*. 2015. V. 60. № 11–12. P. 3–8.
183. Karpova N., Andryushina V., Stytsenko T., Druzhinina A., Feofanova T., Kurakov A. // *Appl. Biochem. Microbiol*. 2016. V. 52. № 3. P. 316–323.
184. Blagoveshchenskaya E.Y., Popkova E. // *Moscow University Biol. Sci. Bull*. 2016. V. 71. № 2. P. 80–81.
185. Elansky S., Pobedinskaya M., Kokaeva L., Statsyuk N., Dyakov Y.T. // *J. Plant Pathol*. 2015. V. 97. № 3. P. 449–456.
186. Kokaeva L.Y., Belosokhov A.F., Doeva L.Y., Skolotneva E.S., Elansky S.N. // *J. Plant Dis. Protection*. 2017. V. 125. P. 205–212.
187. Krutyakov Y.A., Kudrinskiy A.A., Zherebin P.M., Yapryntsev A.D., Pobedinskaya M.A., Elansky S.N., Denisov A.N., Mikhaylov D.M., Lisichkin G.V. // *Materials Res. Express*. 2016. V. 3. № 7. P. 075403.
188. Kutuzova I., Kokaeva L.Y., Pobedinskaya M., Krutyakov Y.A., Skolotneva E., Chudinova E., Elansky S. // *J. Plant Pathol*. 2017. V. 99. № 3. P. 635–642.
189. Yurkov A.M. // *Yeast*. 2018. V. 35. P. 369–378.
190. Cheptsov V.S., Vorobyova E.A., Manucharova N.A., Gorlenko M.V., Pavlov A.K., Vdovina M.A., Lomasov V.N., Bulat S.A. // *Extremophiles*. 2017. V. 21. № 6. P. 1057–1067.
191. Grum-Grzhimaylo O.A., Debets A.J., Bilanenko E.N. // *Mycologia*. 2016. V. 108. № 2. P. 233–254.
192. Grum-Grzhimaylo A.A., Georgieva M.L., Bondarenko S.A., Debets A.J., Bilanenko E.N. // *Fungal Diversity*. 2016. V. 76. № 1. P. 27–74.
193. Bondarenko S.A., Ianutsevich E.A., Danilova O.A., Grum-Grzhimaylo A.A., Kotlova E.R., Kamzolnikina O.V., Bilanenko E.N., Tereshina V.M. // *Extremophiles*. 2017. V. 21. № 4. P. 743–754.

УДК 577.2, 577.29

Перспективы использования гамма-карболинов для разработки патогенетической терапии протеинопатий

В. И. Скворцова¹, С. О. Бачурин², А. А. Устюгов^{2*}, М. С. Кухарский^{1,2}, А. В. Дейкин³,
В. Л. Бухман^{2,4}, Н. Н. Нинкина^{2,4}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9

²Институт физиологически активных веществ РАН, 142432, Черноголовка, Северный пр., 1

³Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

⁴Cardiff University, School of Biosciences, Sir Martin Evans Building, Museum Avenue, Cardiff, CF10 3AX

*E-mail: alexey@ipac.ac.ru

Поступила в редакцию 04.07.2018

Принята к печати 21.09.2018

РЕФЕРАТ Неконтролируемая агрегация белков, сопровождающаяся формированием специфических включений, является важной составляющей патогенеза многих распространенных нейродегенеративных заболеваний, известных как протеинопатии. Промежуточные продукты этой агрегации токсичны для нейронов и вызывают их гибель. Стратегия разработки патогенетической терапии протеинопатий основывается на создании препаратов, способных как подавлять прогрессию протеинопатии, так и повышать выживаемость пораженных нейронов. Результаты десятилетних исследований, проведенных в отечественных и западных ведущих лабораториях, позволили заключить, что обладающий нейропротекторным эффектом отечественный препарат Димебон (Latrepirdine) способен, как и ряд других соединений из группы гамма-карболинов, модулировать течение нейродегенеративного процесса и в *in vitro*, и в *in vivo* модельных системах. Накопленные данные позволяют рассматривать гамма-карболины в качестве перспективной основы для разработки патогенетической терапии протеинопатий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА БАС, Димебон, гамма-карболины, протеинопатия, трансгенные животные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БАС – боковой амиотрофический склероз; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; FUS – от англ. Fused in sarcoma; TDP-43 – от англ. Transactive response DNA binding protein 43 kDa.

ВВЕДЕНИЕ

Неконтролируемая агрегация белков определенного типа с формированием патогистологических включений (протеинопатия) является важным компонентом патогенеза многих нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), включающих боковой амиотрофический склероз (БАС). В этой связи создание препаратов, действие которых направлено на подавление прогрессии протеинопатии, рассматривается как важное направление стратегии разработки патогенетической терапии НДЗ. Данные последних исследований, полученные независимо в различных лабораториях в различных странах, убедительно доказали способность отечественного препарата Димебон (Latrepirdine), относящегося к группе гам-

ма-карболинов, подавлять прогрессию модельных протеинопатий в трансгенных животных. Наши данные показали эффективность применения Димебона и его производных для ингибирования прогрессии протеинопатий в модельных трансгенных системах с фенотипом БАС.

Боковой амиотрофический склероз – тяжелое заболевание нервной системы со специфическим поражением двигательных нейронов – характеризуется протеинопатией, вызванной агрегацией ряда определенных белков. Ассоциация патогенной агрегации этих белков с развитием фенотипа БАС показана в многочисленных экспериментальных исследованиях по моделированию основных механизмов нейродегенеративного процесса, поражающего

двигательные нейроны [1–3]. При патогистологическом анализе идиопатических форм БАС в подавляющем большинстве случаев в аутопсийном материале больных обнаруживаются внутриклеточные белковые включения, среди которых особое значение придается депозитам, сформированным ДНК/РНК-связывающими белками TDP-43 и FUS [4–6]. Непосредственные механизмы, лежащие в основе патогенной агрегации этих белков и приводящие к дисфункции и гибели двигательных нейронов, могут быть в определенной степени специфичными для данного белка. Нет никаких сомнений в том, что процесс патогенной белковой агрегации играет важную роль в патогенезе всех форм БАС и является очевидной мишенью для терапевтических вмешательств.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ СВОЙСТВА ГАММА-КАРБОЛИНОВ

Данные независимых исследований ряда лабораторий позволили рассматривать соединения, относящиеся к классу гамма-карболинов, как потенциальные нейропротекторные средства, которые, в частности, способны снижать уровень патогенной агрегации и/или активировать внутриклеточные защитные механизмы, направленные на контролирующую деградацию агрегированных форм белков [7, 8]. Первые указания на такие свойства гамма-карболинов были получены в работах по изучению применения отечественного препарата Димебон для коррекции когнитивной функции у больных с болезнью Альцгеймера (БА) – наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием, относящимся к группе протеинопатий [9, 10]. Более того, в клинических испытаниях, проведенных в нескольких центрах, выявлено положительное влияние Димебона на когнитивную функцию пациентов с хореей Гентингтона [11]. Хотя в фазе III клинических испытаний Димебон, как и все разрабатываемые на сегодняшний день препараты для патогенетической терапии БА, не был признан эффективным [12] (скорее всего из-за исключительно высокой гетерогенности группы заболеваний, объединенных в нозологическую форму «болезнь Альцгеймера»), изучение механизмов действия этого препарата и его производных на прогрессию протеинопатии остается предметом интенсивных исследований целого ряда лабораторий [13]. Так, результаты недавно проведенного метаанализа позволили сделать заключение о положительном воздействии Димебона на показатели нейропсихотического статуса у пациентов с БА [14] и стали дополнительным стимулом для продолжения работ в данном направлении. Кроме того, показано, что в однородной модельной системе на основе транс-

генных животных Димебон подавляет развитие таупротейнопатии – одного из ключевых звеньев патогенеза БА [15]. Другой тип ключевой протеинопатии в патогенезе БА – церебральный амилоидоз – также подавлялся Димебоном у мышей TgCRND8 [16–18] и 3xTg-AD [19], но не на модели 5xFAD, характеризующейся более агрессивным течением амилоидоза [20]. Эти данные послужили основанием для расширения спектра исследований действия гамма-карболинов на прогрессию других типов протеинопатий, которым отводится важная роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний.

ВЛИЯНИЕ ГАММА-КАРБОЛИНОВ НА ПРОГРЕССИЮ ПРОТЕИНОПАТИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЕМ ДВИГАТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ

В трансгенной мышшиной модели с нейроспецифической экспрессией гамма-синуклеина, воспроизводящей основные характеристики патогенеза БАС [21, 22], хроническое введение Димебона замедляло прогрессию протеинопатии [23, 24]. При этом выявлено существенное снижение содержания агрегированных нерастворимых в детергенте форм гамма-синуклеина в тканях пораженных участков нервной системы трансгенных мышей [25] и уменьшение гамма-синуклеин-реактивных включений в пораженных отделах спинного мозга экспериментальных животных [21, 22]. Этот эффект оказался более выраженным, если введение начинали задолго до первых проявлений патологического процесса как по показателям клинической симптоматики, так и по данным гистологического анализа. Такая же особенность Димебона показана и на трансгенных мышцах SOD1^{G93A}: если Димебон начинали вводить задолго до ожидаемого возраста проявления симптомов БАС-фенотипа, то дебют симптоматической стадии модельного заболевания регистрировали позже, а продолжительность жизни животных увеличивалась [26]. Если же введение Димебона начинали в возрасте, близком к ожидаемому дебюту симптоматической стадии модельного заболевания, то эффект от применения препарата был гораздо менее выраженным [27]. Ингибирующий прогрессию протеинопатии эффект Димебона и его производных был подтвержден нами на недавно созданной и считающейся наиболее адекватной модели специфического поражения двигательных нейронов с фенотипом БАС – линии трансгенных мышей FUS¹⁻³⁵⁹ [28, 29]. В нервной системе этих мышей, как и у больных с FUS-ассоциированными формами БАС, патогистологический анализ выявляет накопление aberrантных форм FUS в составе характерных цитоплазматических белковых агрегатов. И Димебон, и его

производные способны были модифицировать, хотя и с различной эффективностью, прогрессию FUS-протеинопатии в нервной системе мышей FUS¹⁻³⁵⁹ [30]. Так, продолжительность жизни модельных животных, получавших Димебон, статистически значительно увеличивалась. Более того, перевод линии мышей FUS¹⁻³⁵⁹ с генетического фона C57Bl/6J, на котором было выполнено большинство исследований в различных лабораториях, на генетический фон CD-1 не повлиял на выраженность ингибирующего протеинопатию эффекта гамма-карболинов и не может быть объяснен повышенной чувствительностью линии C57Bl/6J к гамма-карболинам [30]. Помимо увеличения продолжительности жизни у мышей FUS¹⁻³⁵⁹, получавших Димебон или его производное, был отсрочен дебют симптоматической стадии модельного заболевания с развитием выраженного фенотипа БАС, если введение соединений было начато на ранних скрытых стадиях FUS-протеинопатии [31]. Вместе с тем, механизм такого действия Димебона до сих пор остается неясным. Имеющиеся на сегодняшний день данные биохимических исследований, экспериментов на клеточных культурах и на животных говорят о том, что Димебон является мультитаргетным препаратом, способным влиять на целый ряд внутриклеточных процессов и на различные патогенетические пути в пораженных нейродегенеративными изменениями нейронах и в других клетках [7].

В частности, Димебон способен модулировать функционирование рецепторов, каналов и менять кинетику сигнальных ферментов [9, 32–35], а также стабилизировать работу митохондрий [36, 37]. Но, пожалуй, наиболее значимым свойством Димебона, которое позволяет рассматривать его в качестве базового соединения при разработке подходов к лечению протеинопатий, является способность ингибировать накопление патогенных белковых агрегатов в клетке.

ПОДАВЛЕНИЕ ГАММА-КАРБОЛИНАМИ ПРОЦЕССОВ НАКОПЛЕНИЯ ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИХ БЕЛКОВЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ В ЦИТОПЛАЗМЕ НЕЙРОНОВ

Способность Димебона препятствовать накоплению в телах нейронов патогенных белковых включений впервые была продемонстрирована в наших совместных исследованиях с лабораториями М. Хасегавы и М. Гедерта на клеточных культурах, продуцирующих аберрантную, обладающую высоким агрегационным потенциалом, форму РНК-связывающего белка TDP-43 [38, 39]. Обнаруженный эффект был подтвержден в другой клеточной модели с агрегаци-

ей РНК-связывающего белка FUS. Нами показано, что при FUS-протеинопатии добавление Димебона и его производных к культивируемым клеткам нейробластомы человека снижало как содержание нерастворимых форм белка в цитоплазматической фракции, так и количество формируемых в цитоплазме белковых включений (неопубликованные данные). Последующие исследования, выполненные на различных модельных системах протеинопатий, подтвердили обнаруженный нами эффект, который, как мы полагали, связан с активацией аутофагосомной системы в клетках, обработанных Димебоном [16, 40–42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты десятилетних исследований, проведенных в отечественных и западных ведущих лабораториях, позволяют с уверенностью заключить, что соединения из ряда гамма-карболинов действительно способны подавлять прогрессию определенных типов протеинопатий и, как в случае с моделями БАС, замедлять развитие фенотипа нейродегенеративных процессов в *in vivo* моделях. Именно модуляция процессов агрегации белков, вовлеченных в механизмы протеинопатии, рассматривается в качестве важного элемента концепции разработки патогенетической терапии нейродегенеративных заболеваний [43]. В настоящее время имеется достаточно оснований для того, чтобы отнести отечественный препарат Димебон и его производные к группе перспективных соединений, на основе которых могут создаваться новые соединения этого ряда с улучшенными показателями фармакокинетики и эффективности действия и которые могут быть использованы в составе комплексной патогенетической терапии социально значимых нейродегенеративных болезней. ●

Исследование нейродегенеративных процессов в модельных системах поддержано грантом РФФИ (№ 18-15-00357), содержание животных обеспечено программой поддержки биоресурсных коллекций ИФАН РАН (ФАНО № 0090-2017-0016) и проведено на оборудовании ЦКП ИФАН РАН и ЦКП ИБГ РАН, в рамках Государственного задания ИФАН РАН (тема по ГЗ № 0090-2017-0019) и программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skvortsova V.I., Bachurin S.O., Razinskaia O.D., Smirnov A.P., Kovrazhkina E.A., Pochigaeva K.I., Ninkina N.N., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*. 2011. V. 111. № 2. P. 4–9.
2. Bachurin S., Ninkina N., Tarasova T., Shelkovnikova T., Kovrazhkina E., Smirnov A., Razinskaia O., Skvortsova V. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*. 2013. V. 113. № 10. P. 74.
3. Bachurin S., Ninkina N., Tarasova T., Shelkovnikova T., Kovrazhkina E., Smirnov A., Razinskaya O., Skvortsova V. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*. 2013. V. 113. № 9. P. 86.
4. Mackenzie I.R., Bigio E.H., Ince P.G., Geser F., Neumann M., Cairns N.J., Kwong L.K., Forman M.S., Ravits J., Stewart H., et al. // *Ann. Neurol.* 2007. V. 61. № 5. P. 427–434.
5. Neumann M., Sampathu D.M., Kwong L.K., Truax A.C., Micsenyi M.C., Chou T.T., Bruce J., Schuck T., Grossman M., Clark C.M., et al. // *Science*. 2006. V. 314. № 5796. P. 130–133.
6. Scotter E.L., Chen H.J., Shaw C.E. // *Neurotherapeutics*. 2015. V. 12. № 2. P. 352–363.
7. Ustyugov A., Shevtsova E., Bachurin S. // *Mol. Neurobiol.* 2015. V. 52. № 2. P. 970–978.
8. Ustyugov A., Shevtsova E., Barreto G.E., Ashraf G.M., Bachurin S.O., Aliev G. // *Curr. Med. Chem.* 2016. doi: 10.2174/09298673233666160804122746.
9. Bachurin S., Bukatina E., Lermontova N., Tkachenko S., Afanasiev A., Grigoriev V., Grigorieva I., Ivanov Y., Sablin S., Zefirov N. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001. V. 939. P. 425–435.
10. Doody R.S., Gavrilova S.I., Sano M., Thomas R.G., Aisen P.S., Bachurin S.O., Seely L., Hung D., Dimebon I. // *Lancet*. 2008. V. 372. № 9634. P. 207–215.
11. Kieburz K., McDermott M.P., Voss T.S., Corey-Bloom J., Deue L.M., Dorsey E.R., Factor S., Geschwind M.D., Hodgeman K., Kayson E., et al. // *Arch. Neurol.* 2010. V. 67. № 2. P. 154–160.
12. Bharadwaj P.R., Bates K.A., Porter T., Teimouri E., Perry G., Steele J.W., Gandy S., Groth D., Martins R.N., Verdile G. // *Transl. Psychiatry*. 2013. V. 3. e332.
13. Bachurin S.O., Bovina E.V., Ustyugov A.A. // *Med. Res. Rev.* 2017. V. 37. № 5. P. 1186–1225.
14. Cano-Cuenca N., Solis-Garcia del Pozo J.E., Jordan J. // *J. Alzheimers Dis.* 2014. V. 38. № 1. P. 155–164.
15. Peters O.M., Connor-Robson N., Sokolov V.B., Aksinenko A.Y., Kukharsky M.S., Bachurin S.O., Ninkina N., Buchman V.L. // *J. Alzheimers Dis.* 2013. V. 33. № 4. P. 1041–1049.
16. Steele J.W., Gandy S. // *Autophagy*. 2013. V. 9. № 4. P. 617–618.
17. Steele J.W., Lachenmayer M.L., Ju S., Stock A., Liken J., Kim S.H., Delgado L.M., Alfaro I.E., Bernales S., Verdile G., et al. // *Mol. Psychiatry*. 2013. V. 18. № 8. P. 889–897.
18. Wang J., Ferruzzi M.G., Varghese M., Qian X., Cheng A., Xie M., Zhao W., Ho L., Pasinetti G.M. // *Mol. Neurodegener.* 2011. V. 6. № 1. P. 7.
19. Perez S.E., Nadeem M., Sadleir K.R., Matras J., Kelley C.M., Counts S.E., Vassar R., Mufson E.J. // *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 2012. V. 4. № 3. P. 115–127.
20. Peters O.M., Shelkovnikova T., Tarasova T., Springe S., Kukharsky M.S., Smith G.A., Brooks S., Kozin S.A., Kotelevtsev Y., Bachurin S.O., et al. // *J. Alzheimers Dis.* 2013. V. 36. № 3. P. 589–596.
21. Ninkina N., Peters O., Millership S., Salem H., van der Putten H., Buchman V.L. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 10. P. 1779–1794.
22. Peters O.M., Millership S., Shelkovnikova T.A., Soto I., Keeling L., Hann A., Marsh-Armstrong N., Buchman V.L., Ninkina N. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 48. № 1. P. 124–131.
23. Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O., Khritankova I., Afanasieva M.A., Tarasova T.V., Alentov I.I., Buchman V.L., Ninkina N.N. // *Neurotox. Res.* 2012. V. 22. № 1. P. 33–42.
24. Bachurin S.O., Ustyugov A.A., Peters O., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L., Ninkina N.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2009. V. 428. P. 235–238.
25. Ustyugov A.A., Shelkovnikova T.A., Kokhan V.S., Khritankova I.V., Peters O., Buchman V.L., Bachurin S.O., Ninkina N.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2012. V. 152. № 6. P. 731–733.
26. Coughlan K.S., Mitchem M.R., Hogg M.C., Prehn J.H. // *Neurobiol. Aging*. 2015. V. 36. № 2. P. 1140–1150.
27. Tesla R., Wolf H.P., Xu P., Drawbridge J., Estill S.J., Huntington P., McDaniel L., Knobbe W., Burket A., Tran S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 42. P. 17016–17021.
28. Shelkovnikova T.A., Peters O.M., Deykin A.V., Connor-Robson N., Robinson H., Ustyugov A.A., Bachurin S.O., Ermolkevich T.G., Goldman I.L., Sadchikova E.R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 35. P. 25266–25274.
29. Deikin A.V., Kovrazhkina E.A., Ovchinnikov R.K., Bronovitskii E.V., Razinskaia O.D., Smirnov A.P., Ermolkevich T.G., Eliakov A.B., Popov A.N., Fedorov E.N., et al. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*. 2014. V. 114. № 8. P. 62–69.
30. Bronovitsky E.V., Deikin A.V., Ermolkevich T.G., Elyakov A.B., Fedorov E.N., Sadchikova E.R., Goldman I.L., Ovchinnikov R.K., Roman A.Y., Khritankova I.V., et al. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. V. 462. P. 189–192.
31. Maltsev A.V., Deykin A.V., Ovchinnikov R.K., Chicheva M.M., Kovrazhkina E.A., Razinskaya O.D., Bronovitsky E.V., Budevich A.I., Kirikovich Y.K., Bachurin S.O., et al. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova*. 2017. V. 117. № 4. P. 64–67.
32. Schaffhauser H., Mathiasen J.R., Dicamillo A., Huffman M.J., Lu L.D., McKenna B.A., Qian J., Marino M.J. // *Biochem. Pharmacol.* 2009. V. 78. № 8. P. 1035–1042.
33. Wu J., Li Q., Bezprozvanny I. // *Mol. Neurodegener.* 2008. V. 3. P. 15.
34. Wang C.C., Kuo J.R., Wang S.J. // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. V. 734. P. 67–76.
35. Weisova P., Alvarez S.P., Kilbride S.M., Anilkumar U., Baumann B., Jordan J., Bernas T., Huber H.J., Dussmann H., Prehn J.H. // *Transl. Psychiatry*. 2013. V. 3. e317.
36. Zhang S., Hedskog L., Petersen C.A., Winblad B., Ankarcrona M. // *J. Alzheimers Dis.* 2010. V. 21. № 2. P. 389–402.
37. Eckert S.H., Eckmann J., Renner K., Eckert G.P., Leuner K., Muller W.E. // *J. Alzheimers Dis.* 2012. V. 31. № 1. P. 21–32.
38. Yamashita M., Nonaka T., Arai T., Kametani F., Buchman V.L., Ninkina N., Bachurin S.O., Akiyama H., Goedert M., Hasegawa M. // *FEBS Lett.* 2009. V. 583. № 14. P. 2419–2424.
39. Кухарский М.С., Хританкова И.В., Лыткина О.А., Овчинников Р.К., Устюгов А.А., Шелковникова Т.А., Броновицкий Е.В., Кохан В.С., Нинкина Н.Н., Бачурин С.О. // *Патогенез*. 2013. V. 11. № 1. P. 53–60.
40. Khritankova I.V., Kukharskiy M.S., Lytkina O.A., Bachurin S.O., Shorning B.Y. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2012. V. 446. P. 251–253.
41. Steele J.W., Ju S., Lachenmayer M.L., Liken J., Stock A., Kim S.H., Delgado L.M., Alfaro I.E., Bernales S., Verdile G., et al. // *Mol. Psychiatry*. 2013. V. 18. № 8. P. 882–888.
42. Bharadwaj P.R., Verdile G., Barr R.K., Gupta V., Steele J.W., Lachenmayer M.L., Yue Z., Ehrlich M.E., Petsko G., Ju S., et al. // *J. Alzheimers Dis.* 2012. V. 32. № 4. P. 949–967.
43. Kumar V., Sami N., Kashav T., Islam A., Ahmad F., Hassan M.I. // *Eur. J. Med. Chem.* 2016. V. 124. P. 1105–1120.

УДК 57.084.1; 57.083.3; 599.821.2

Определение параметров адаптивного клеточного иммунитета у обыкновенных мармозет (*Callithrix jacchus*)

И. В. Гордейчук^{1,2,3*}, А. И. Тухватулин², С. П. Петков⁴, М. А. Абакумов^{5,6}, С. А. Гуляев¹, Н. М. Тухватулина², Т. В. Гуляева¹, М. И. Михайлов^{7,8}, Д. Ю. Логунов², М. Г. Исагулянц^{1,2,9}

¹Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 108819, Россия, Москва, поселение Московский, пос. Института полиомиелита, 8, стр. 1

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18

³Первый Московский государственный медицинский университет им И.М. Сеченова Минздрава России, 119146, Россия, Москва, Большая Пироговская ул., 19, стр. 1

⁴Каролинский институт, 171 77, Швеция, Стокгольм

⁵Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1

⁶Национальный исследовательский технологический университет МИСиС (МИСиС), 119049, Россия, Москва, Ленинский просп., 4

⁷Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, 125993, Россия, Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

⁸Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А

⁹Рижский университет им. Страдыня, LV-1007, Латвия, Рига

*E-mail: lab.gord@gmail.com

Поступила в редакцию 13.12.2017

Принята к печати 28.08.2018

РЕФЕРАТ Обыкновенные мармозеты (*Callithrix jacchus*) – игрунковые обезьяны Нового Света, широко используются в биомедицинских исследованиях. Нами представлены оптимизированные протоколы оценки параметров адаптивного клеточного иммунитета мармозет, включая оценку субпопуляционного состава лимфоцитов и определение основных маркеров созревания и активации Т- и В-клеток методом проточной цитометрии с использованием панели флуоресцентно меченных антител. Образцы цельной крови восьми мармозет окрашивали флуоресцентно мечеными моноклональными антителами к популяционным маркерам (CD45, CD3, CD20, CD4, CD8) и маркерам созревания и активации лимфоцитов (CD69, CD62L, CD45RO, CD107a и CD27) и анализировали методом проточной цитометрии. Популяция CD45⁺ клеток включала 22.7 ± 5.5% CD3⁻CD20⁺ клеток и 67.6 ± 6.3% CD3⁺CD20⁻ клеток. Популяция CD3⁺ клеток состояла из 55.7 ± 5.5% CD3⁺CD4⁺CD8⁻ и 34.3 ± 3.7% CD3⁺CD4⁻CD8⁺. Маркеры активации и созревания лимфоцитов выявлены в соответствующих популяциях в следующих пропорциях: CD62L на 54.0 ± 10.7% CD3⁺CD4⁺ и 74.4 ± 12.1% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD69 на 2.7 ± 1.2% CD3⁺CD4⁺ и 1.2 ± 0.5% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD45RO на 1.6 ± 0.6% CD3⁺CD4⁺ и 1.8 ± 0.7% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD107a на 0.7 ± 0.5% CD3⁺CD4⁺ и 0.5 ± 0.3% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD27 на 94.6 ± 2.1% CD3⁺ и 8.9 ± 3.9% CD20⁺ клеток. Доля CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток у самок и самцов значимо различалась (1.9 ± 0.5% у самок и 1.1 ± 0.2% у самцов; $p < 0.05$). Доля CD20⁺CD27⁺ клеток значимо коррелировала с возрастом животных ($r = 0.923$, $p < 0.005$). Определены базовые параметры адаптивного клеточного иммунитета, характерные для интактных мармозет, не имеющих маркеров системной иммунной активации. Знание этих параметров и проведение описанных процедур необходимы для оценки изменений иммунного статуса мармозет под воздействием профилактических и терапевтических иммунобиологических препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адаптивный клеточный ответ, обыкновенные мармозеты, проточная цитометрия, *Callithrix jacchus*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CD – кластер дифференцировки; ФМО – контроль флуоресценции минус один; FSC – прямое светорассеяние; HEPA – воздушный фильтр с высокоэффективным удалением частиц; HLA – человеческие лейкоцитарные антигены; $M \pm \sigma$ – среднее значение \pm стандартное отклонение; ME – международная единица; MHC – главный комплекс гистосовместимости; SSC – боковое светорассеяние.

ВВЕДЕНИЕ

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*, мармозеты) – маленькие приматы Нового Света, все чаще применяемые для моделирования патологических состояний человека, включая инфекционные, неврологические и онкологические заболевания [1, 2]. В силу высокой восприимчивости к инфекционным болезням человека мармозеты представляют собой уникальную приматную модель для изучения вирусных, протозойных, бактериальных и прионных заболеваний [3] и служат идеальной платформой для доклинических исследований эффективности и безопасности новых вакцин и иммуномодулирующих препаратов [4]. Значимыми преимуществами использования мармозет в биомедицинских исследованиях являются их малый размер, эволюционная близость к человеку, относительная простота содержания, а также быстрое половое созревание и небольшая средняя продолжительность жизни, что позволяет обеспечить высокую скорость увеличения и уменьшения численности колонии в соответствии с экспериментальной необходимостью [3].

Эволюционная близость мармозет к человеку позволяет применять в работе с ними аналитические методики, успешно используемые при работе с биологическими материалами, полученными от человека. В то же время во многих биологических аспектах мармозеты имеют значимые отличия от других видов нечеловекообразных приматов [5]. Иммунологически мармозеты, как и другие игрунковые, представляют собой исключение из общего правила стабильности локусов MHC класса I [6, 7]. Каждый род игрунковых обезьян (*Callitrichidae*) обладает своим собственным набором генов MHC класса I и не имеет локусов, сравнимых с MHC класса I (HLA-A, -B и -C) человека. Локусы MHC класса I мармозет обладают ограниченной изменчивостью при относительно высокой частоте смены поколений, что приводит к низкому уровню или полному отсутствию различий иммунного ответа на инфекционные патогены и опухолевые антигены у отдельных представителей данного вида [5]. Изменчивость локусов MHC класса II также весьма ограничена [8]. Совокупность упомянутых факторов делает мармозет очень восприимчивыми к вирусным заболеваниям [9–11], в частности, к вызванным онкогенными вирусами инфекциям, приводящим к формированию спонтанных опухолей [12–15]. Ранние работы, выявившие повышенную восприимчивость мармозет к онкогенным вирусам, нашли подтверждение в экспериментах по их заражению

вирусами саркомы и лимфотропными герпесвирусами [16–18]. Сходные спонтанные новообразования наблюдаются у человека при лимфоме Беркитта и назофарингеальной карциноме, что делает мармозет ценной моделью для тестирования соответствующих противовирусных препаратов и иммунотерапевтических средств, включая профилактические и терапевтические вакцины против онкогенных вирусов человека. В силу низкого уровня изменчивости иммунного ответа между отдельными животными такие исследования дают высоковоспроизводимые результаты, несмотря на аутбредную природу экспериментальных групп.

Оценка эффективности иммунотерапевтических средств, уровня поствакцинального иммунного ответа, а также безопасности применяемых иммунобиологических препаратов требует тщательного описания иммунного статуса экспериментальных животных в норме и при активации. Один из основных применяемых с этой целью методов – проточная цитометрия с использованием моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным антигенам. Несмотря на высокую гомологию маркерных молекул клеточных популяций человека и нечеловекообразных обезьян, показано, что ряд клонов коммерчески доступных антител против CD антигенов человека не реагирует с соответствующими антигенами мармозет [19–21].

В результате нашей работы определен перечень клонов антител, способных эффективно связываться с CD антигенами мармозет, также методом проточной цитометрии идентифицированы параметры иммунного статуса не иммунизированных («интактных») животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия содержания и ухода за животными соответствовали положениям Европарламента и Директивы Европейского совета по защите животных, используемых в научных целях (2010/63/EU), а также Руководству Национальных институтов здравоохранения США по использованию и уходу за лабораторными животными. Животных содержали попарно в клетках из прутьев (размер клетки 80 × 55 × 130 см) с деревянными спальными ящиками и ветвями для лазания. Мочу и фекалии удаляли ежедневно путем замены лотков. Комнатную температуру и относительную влажность поддерживали на уровне $27 \pm 2^\circ\text{C}$ и 60–80% соответственно. Автоматическая система контроля

освещения была установлена на 12-часовой цикл смены режимов день/ночь. Система вентиляции обеспечивала 8-кратный ежечасный воздухообмен с НЕРА-фильтрацией. Мармозеты получали видоспецифическую диету, не изменяющуюся по ходу эксперимента, и имели свободный круглосуточный доступ к воде. Качество воды и кормов контролировали на регулярной основе.

Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия). Исследование включало восемь животных (три самца и пять самок возрастом от 23 до 48 месяцев и весом 360–400 г), выведенных и содержавшихся в экспериментальной клинике игрунковых обезьян ФГБНУ ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Эксперименты проводил специалист, прошедший курс обучения работе с нечеловеческими приматами (Каролинский институт, Стокгольм, Швеция). Режим содержания животных во время проведения процедур не изменялся относительно стандарта. Ухудшений в состоянии здоровья животных в ходе двухнедельного эксперимента и в течение двух недель после его окончания не выявлено. Индивидуальную идентификацию животных производили с использованием подкожных радиочипов с уникальными 15-значными кодами (Globalvet, Москва, Россия). Идентификаторы в таблицах представляют собой последние четыре цифры кода радиочипа.

Образцы венозной крови объемом 2 мл были получены от восьми мармозет путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев объемом 2.5 мл с иглами 25G, в которые предварительно набирали 25 МЕ натрий-гепарина («Белмедпрепараты», Минск, Республика Беларусь) на 1 мл взятой крови. Аликвоты цельной крови объемом 50 мкл на один тест инкубировали в течение 30 мин при температуре 22°C с предварительно приготовленной смесью флуоресцентно меченных антител следующих клонов: PE mouse anti-marmoset CD45 (BioLegend, Сан-Диего, США; клон 6C9; кат. 250204); Alexa Fluor 700 mouse anti-human CD3 (BD, Нью-Джерси, США; клон SP34-2, кат. 557917); FITC mouse anti-human CD20 (Beckman Coulter, Бреа, США; клон H299; кат. 6602381); PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD4 (BD, клон L200, кат. 552838); PE anti-marmoset CD8 (BioLegend, клон 6F10, кат. 250304); APC mouse anti-human CD69 (BD, клон L78, кат. 654663); BV421 Mouse Anti-Human CD62L (BD, клон SK11, кат. 743207); PE/Cy7 anti-human CD45RO (BioLegend, клон UCHL1, кат. 304230); BV421 Mouse Anti-Human CD107a (BD, клон H4A3, кат. 562623); APC anti-human CD27 (BioLegend, клон M-T271, кат.

356409). После инкубации с указанными антителами образцы обрабатывали 1 мл буфера для лизиса эритроцитов (BioLegend, кат. 420301) в течение 15 мин при комнатной температуре и однократно отмывали путем центрифугирования в 1 мл фосфатно-солевого буфера при скорости 2000 g. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSAria III (BD) в течение 30 мин после окрашивания. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением тестируемого (контроль флуоресценции микнус один [ФМО]).

Статистический анализ проводили с использованием *t*-теста для нормально распределенных значений и непараметрических тестов ранговой корреляции Спирмена и теста Манна–Уитни, выполненных с помощью пакета программ статистической обработки STATISTICA AXA 10 (TIBCO Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

К настоящему времени опубликовано лишь несколько работ, рассматривающих применимость различных коммерчески доступных моноклональных антител для цитометрического анализа клеток мармозет [19–21]. В ходе данного исследования нами был отработан протокол определения иммунного статуса мармозет методом проточной цитометрии с многоцветной панелью флуоресцентно меченных антител к поверхностным антигенам основных субпопуляций лимфоцитов и к маркерам созревания и активации Т- и В-клеток. Используя данную методику, мы охарактеризовали иммунный статус интактных мармозет. В частности, определено процентное соотношение основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов (CD45⁺, CD45⁺CD3⁻CD20⁺, CD45⁺CD3⁺CD20⁻, CD3⁺CD4⁺CD8⁻, CD3⁺CD4⁻CD8⁺) и уровень экспрессии этими клетками маркеров созревания и активации (CD27, CD62L, CD69, CD45RO, CD107a). Стратегия определения популяций и анализ результатов окрашивания представлены на *рис. 1* и *2* на примере одной мармозеты (ID 4540).

Доли клеток периферической крови мармозет, окрашиваемых рецепторспецифическими антителами, представлены в *таблице*. CD45⁺ лейкоциты составляли 54.3 ± 11.8% от общего количества клеток после лизиса эритроцитов. CD45⁺ популяция содержала 22.7 ± 5.5% В-клеток (CD45⁺CD3⁻CD20⁺) и 67.6 ± 6.3% Т-клеток (CD45⁺CD3⁺CD20⁻). Среди CD3⁺ клеток 55.7 ± 5.5% составляли Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), 34.3 ± 3.7% – цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD4⁻CD8⁺). Соотношения популяций В- и Т-клеток мармозет, включая субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ клеток, соответствовали данным [20, 22],

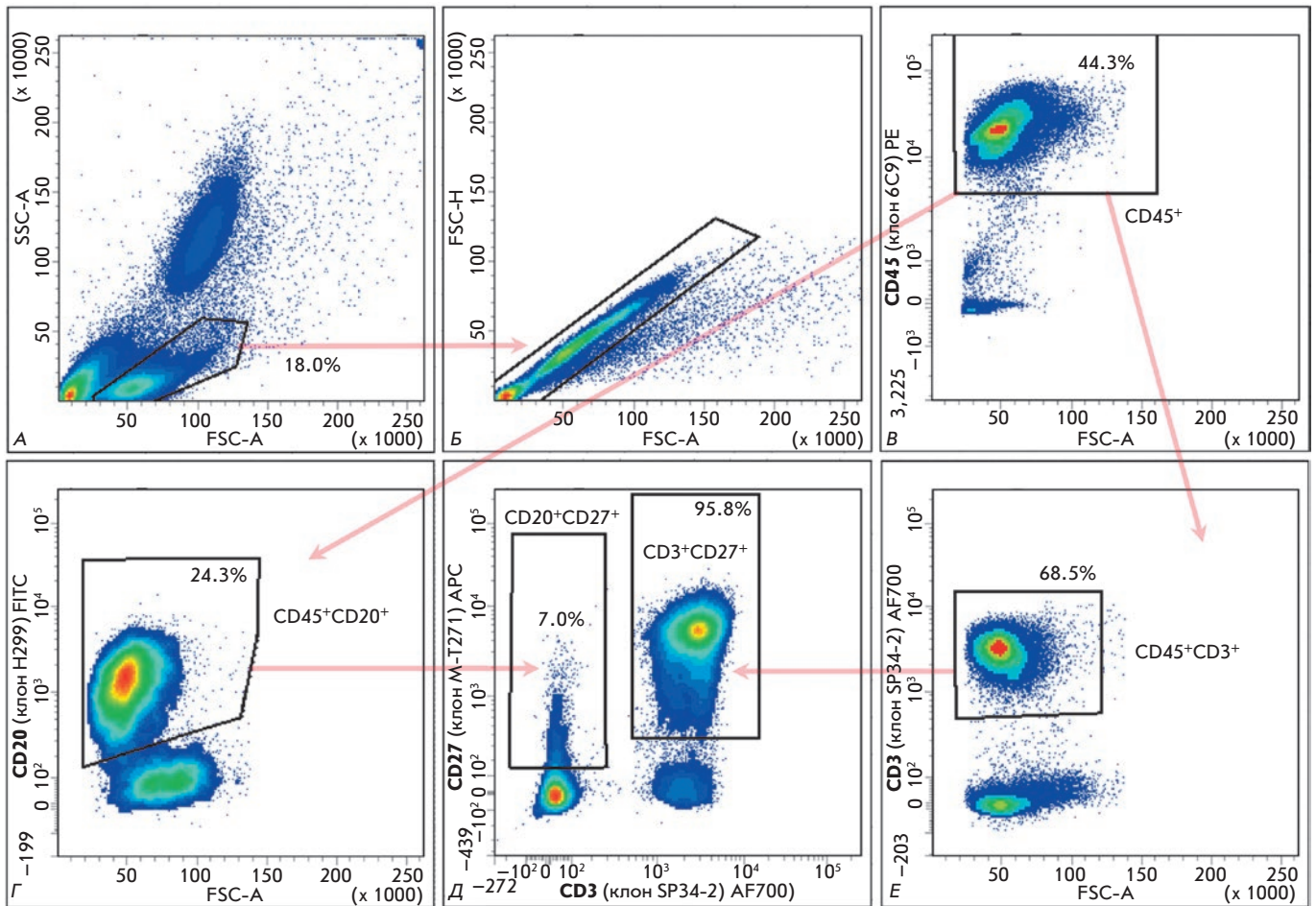


Рис. 1. Выделение популяций и результаты окрашивания популяций Т- и В-клеток intactных мармозет (ID 4540). Графики светорассеивания FSC-A/SSC-A (А) и исключения одиночных клеток (Б) использовали для выделения популяции CD45⁺ лейкоцитов (В). Доли окрашенных CD45⁺CD20⁺ (Г) и CD45⁺CD3⁺ (Е) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяции CD45⁺. Доли окрашенных клеток CD3⁺CD27⁺ и CD20⁺CD27⁺ (Д) представлены в соответствующих полях относительно популяций CD3⁺ и CD20⁺ клеток соответственно. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент позитивно окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением одного тестируемого (контроль ФМО). В каждом случае при цитометрии оценивали 150 000 событий

а также показателям, характерным для здоровых людей [23, 24].

Маркеры активации и созревания лимфоцитов были представлены в ранее упомянутых субпопуляциях клеток в следующих соотношениях: CD62L (L-селектин; сигнал хоуминга лимфоцитов, расщепляется в ходе активации клеток): на $54.0 \pm 10.7\%$ CD3⁺CD4⁺ клеток и на $74.4 \pm 12.1\%$ CD3⁺CD8⁺ клеток; CD69 (ранний маркер Т-клеточной активации): на $2.7 \pm 1.2\%$ CD3⁺CD4⁺ клеток и $1.2 \pm 0.5\%$ CD3⁺CD8⁺ клеток; CD45RO (активированные Т-клетки памяти): на $1.6 \pm 0.6\%$ CD3⁺CD4⁺ клеток и $1.8 \pm 0.7\%$ CD3⁺CD8⁺ клеток; CD107a (активированные Т-клетки): на $0.7 \pm 0.5\%$ CD3⁺CD4⁺ клеток и $0.5 \pm 0.3\%$ CD3⁺CD8⁺ клеток; CD27 (представитель суперсемейства ре-

цепторов фактора некроза опухолей-7 (TNFRSF7); В-клетки памяти, зрелые Т-клетки): на $94.6 \pm 2.1\%$ Т-клеток (CD20⁻CD3⁺). Значения находились в пределах, описанных в недавно опубликованном исследовании распределения различных популяций и субпопуляций иммунных клеток, проведенном Neumann и соавт. [21].

В то же время мы обнаружили более низкое, в сравнении с [21], относительное количество В-клеток памяти CD45⁺CD20⁺CD27⁺ ($8.9 \pm 3.9\%$), что свидетельствует о низком уровне активации В-клеток. Мы объясняем эти наблюдения более молодым, чем в [21], средним возрастом мармозет, вошедших в наше исследование (29.3 ± 8.0 месяцев, *таблица*). Наряду с этим, доли субпопуляций Т-клеток CD62L⁺CD4⁺

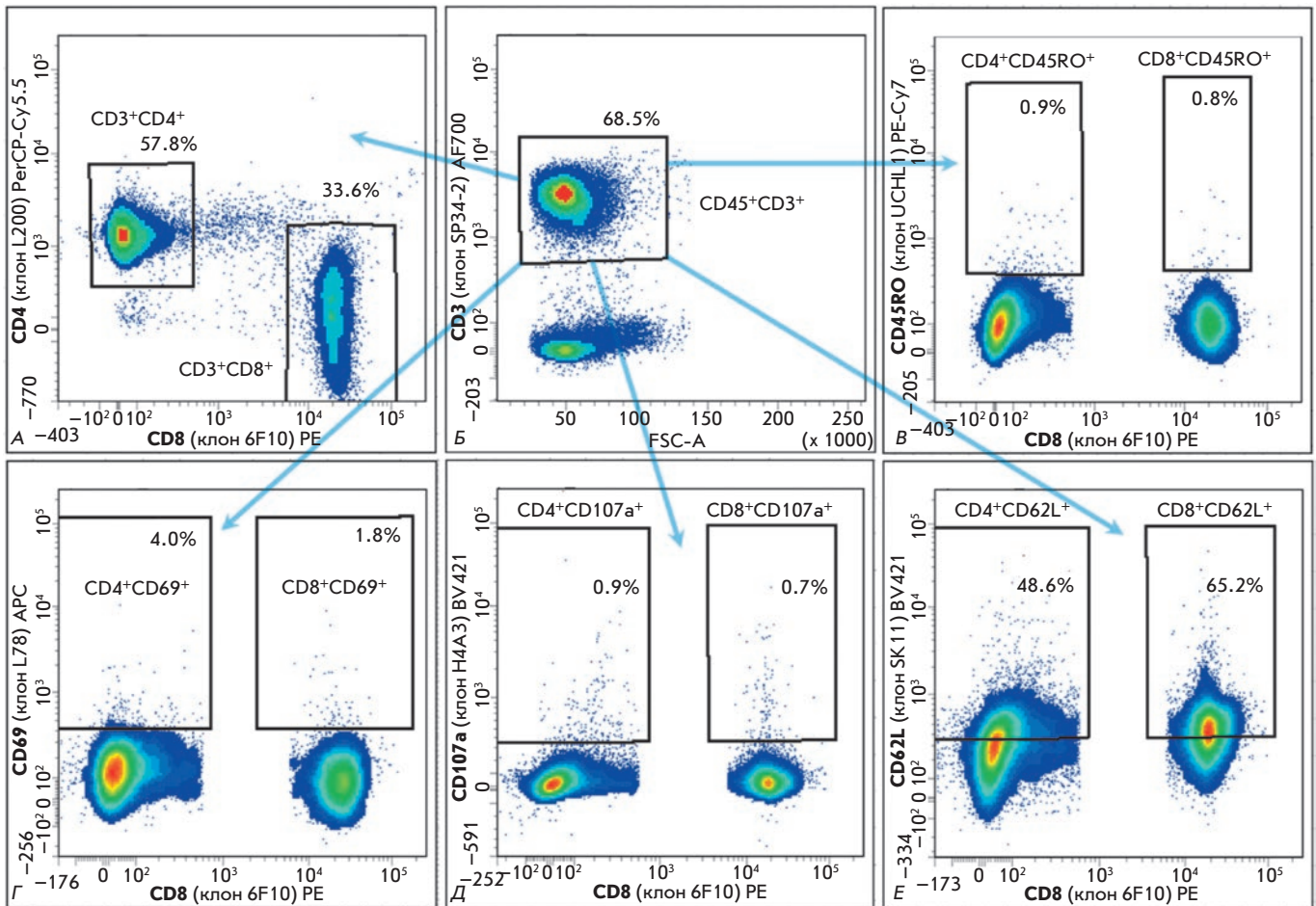


Рис. 2. Результаты выявления маркеров созревания и активации у интактных мармозет (ID 4540). Доля окрашенных $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ (А) клеток представлена в соответствующих полях относительно популяции $CD45^+CD3^+$ (Б) клеток. Доли окрашенных $CD45RO^+$ (В), $CD69^+$ (Г), $CD107a^+$ (Д) и $CD62L^+$ (Е) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяций $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ клеток. Реактивность каждого моноклонального антитела определяли как процент позитивно окрашенных клеток по сравнению с клетками, окрашенными всеми другими антителами, за исключением одного тестируемого (контроль ФМО). В каждом случае при цитометрии оценивали 150 000 событий

и $CD62L^+CD8^+$ в нашей работе были ниже, чем в работе Yoshida и соавт. [25], что может указывать на активацию Т-клеток. Интересно, что доля активированных В-клеток $CD20^+CD27^+$ коррелировала с долей неактивных Т-хелперов $CD3^+CD4^+CD62L^+$, но не цитотоксических Т-лимфоцитов $CD3^+CD8^+CD62L^+$ ($r = 0.902$; $p = 0.006$; тест ранговой корреляции Спирмена). Других признаков системной иммунной активации выявлено не было.

Как состав субпопуляций лимфоцитов, так и уровни активации Т- и В-клеток были одинаковыми у самцов и самок. Единственное статистически значимое различие было выявлено в доле $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ клеток ($1.9 \pm 0.5\%$ у самок против 1.1 ± 0.2 у самцов; $t = 2.5658$, $df = 6$, $p = 0.0426$; t -тест).

Наблюдаемые доли $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ клеток у самцов и самок находились в рамках значений, описанных для интактных животных [20].

Возраст мармозет, использованных в исследовании, был неоднородным, одно животное было значительно старше других (№ 3016, таблица). В этой связи мы проанализировали взаимосвязь между возрастом и оцениваемыми иммунными параметрами. Доля В-клеток памяти $CD45^+CD20^+CD27^+$ достоверно коррелировала с возрастом животных ($r = 0.923$, $p = 0.0011$; тест ранговой корреляции Спирмена). Более того, статистически значимая корреляция наблюдалась и при исключении из анализа данных мармозеты № 3016 ($r = 0.798$; $p = 0.03$). Наблюдаемая корреляция подтверждает наше предположение

Доля окрашенных периферических клеток крови у интактных мармозет

Параметр	ID, параметр, %										Итого, M±σ, %
	Самки					Самцы					
	2996	2998	0519	3016	2997	M±σ	2994	4540	4520	M±σ	
Возраст, месяцы	29	29	23	48	25	30.8 ± 10.0	30.0	25.0	25.0	26.7 ± 2.9	29.3 ± 8.0
CD45 ⁺ *	67.5	64.5	62.3	43.5	43.2	56.2 ± 11.9	42.1	44.3	66.6	51.0 ± 13.6	54.3 ± 11.8
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD20 ⁺	28.7	32.4	17.7	17.5	20.4	23.3 ± 6.8	22.3	24.3	18.4	21.7 ± 3.0	22.7 ± 5.5
CD45 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺	8.3	11.8	5.9	17	7.9	10.2 ± 4.4	8.9	7.0	4.7	6.9 ± 2.1	8.9 ± 3.9
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD20 ⁻	62.4	57.6	69.6	74.7	64.4	65.7 ± 6.6	66.5	68.5	76.9	70.6 ± 5.5	67.6 ± 6.3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD27 ⁺	93.9	93.2	96.2	98.4	93.2	95.0 ± 2.3	91.8	95.8	94.6	94.1 ± 2.1	94.6 ± 2.1
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	39.2	32.7	34.4	40	32.9	35.8 ± 3.5	33.2	33.6	28.5	31.8 ± 2.8	34.3 ± 3.7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁺	72.7	81.2	89.3	86.7	51.8	76.3 ± 15.1	76.4	65.2	72.0	71.2 ± 5.6	74.4 ± 12.1
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	0.9	1.1	1.6	1.9	0.3	1.2 ± 0.6	1.2	1.8	1.0	1.3 ± 0.4	1.2 ± 0.5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	2	2.4	1.8	1.8	0.8	1.8 ± 0.6	2.0	0.8	0.7	1.2 ± 0.7	1.8 ± 0.7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺	0.9	0.5	0.8	0.5	0	0.5 ± 0.4	0.2	0.7	0.2	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.3
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	49.9	57.7	51.2	49.7	57.8	53.3 ± 4.1	55.5	57.8	66.1	59.8 ± 5.6	55.7 ± 5.5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺	47.3	56	73.8	66	43	57.2 ± 12.8	49.1	48.6	47.8	48.5 ± 0.7	54.0 ± 10.7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	1.1	2.3	3.8	4.2	1.7	2.6 ± 1.3	2.0	4.0	2.7	2.9 ± 1.0	2.7 ± 1.2
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	2	1.7	2.3	2.4	1.1	1.9 ± 0.5**	1.3	0.9	1.0	1.1 ± 0.2**	1.6 ± 0.6
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD107a ⁺	1.2	0.6	1.5	0.9	0.2	0.9 ± 0.5	0.2	0.9	0.4	0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.5

*Среди популяции лимфоцитов, гейтированных на основе графика FSC-A/SSC-A при исключении неодинокных клеток.

**Статистически значимые различия ($p < 0.05$).

о связи относительно низкой доли В-клеток памяти с молодым возрастом животных. Другие иммунологические параметры иммунного статуса мармозет не зависели от возраста ($p > 0.05$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе нами определены базовые параметры статуса иммунной системы мармозет различного пола и возраста, характерные для интактных животных и необходимые для регистрации изменений, возникающих при заболеваниях и в ходе испытаний иммунобиологических препаратов. В нашей работе доля CD45⁺CD20⁺CD27⁺ клеток (В-клетки памяти) у молодых животных была ниже в сравнении с опубликованными данными [21], что указывает на более низкий уровень активации В-клеток. В дальнейшем мы планируем оценить значимость данных наблюдений на большем количестве животных раннего возраста. Других статистически значимых изменений в параметрах иммунного статуса и уровне экспрессии маркеров иммунной дифференцировки, помимо упомянутых, обнаружено не было, что позволяет использовать в подобных исследованиях мармозет в возрасте старше 2 лет и проводить иммунное тестирование в смешанных возрастных группах.

Доля субпопуляций CD62L-позитивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, установленная в данной работе, ниже значений, представленных Yoshida и соавт.

[25]. L-селектин (CD62L) обеспечивает вход Т-клеток в лимфатические узлы. Он занижен и у Т-клеток, мигрирующих внутри лимфатических узлов, тогда как при нахождении клеток в нелимфоидных органах уровень экспрессии CD62L остается неизменным [26]. Уровень экспрессии L-селектина на поверхности Т-клеток снижается в ходе их активации до 10% от исходного значения в течение нескольких минут [27]. Таким образом, снижение доли CD62L⁺ Т-клеток может означать недавнюю или еще продолжающуюся активацию Т-клеток. Интересно, что экспрессия CD27⁺ на В-клетках мармозет коррелировала с экспрессией L-селектина/CD62L CD4⁺ Т-клетками ($p < 0.01$), т.е. активация В-клеток ассоциировалась с отсутствием активации CD4⁺ Т-клеток (характеризующейся высоким уровнем CD62L). В более ранних работах была описана ассоциация между экспрессией поверхностных маркеров активации В-клеток памяти CD27 и CD21 [28]. Рецептор комплемента II типа CD21 представлен на большинстве зрелых В-клеток. Ранее было показано, что снижение уровня CD21 В-клетками происходит одновременно с расщеплением CD62L незрелыми лимфоцитами и клетками памяти, что приводит к миграции этих клеток к месту инфицирования [29]. При этом оба процесса регулируются одной и той же группой протеаз [29]. Эти данные проливают свет на механизм опосредованной CD21 взаимосвязи между экспрессией мар-

керов активации В-клеток памяти CD27 и Т-клеток CD62L. Корреляция между уровнем экспрессии CD27 В-клетками, свидетельствующим об их активации, и уровнем экспрессии CD62L CD4⁺ Т-клетками, а точнее – обратная корреляция с деградацией CD62L, свидетельствующей об активации CD4 клеток у нечеловекообразных приматов.

В заключение нами установлены базовые параметры иммунного профиля, характерные для интактных мармозет, не имеющих маркеров системной иммунной активации. Базовая оценка этих параметров критически важна для регистрации изменений иммунного статуса мармозет вследствие применения иммунобиологических препаратов профилактического и терапевтического назначения. Представленные панели антител и методики гейтинга, позволяющие с высокой надежностью определить доли специфических

клеточных популяций и оценить их функциональный статус, могут использоваться для оценки эффективности новых иммунобиологических препаратов, включая вакцины против хронических вирусных инфекций и онкологических заболеваний. ●

Исследование иммунного статуса мармозет поддержано грантом РФФ № 15-15-30039. Поддержание колонии игрунковых обезьян финансировалось из средств Государственного задания по теме № 209 ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН». Обучение персонала работе с нечеловекообразными приматами и сопутствующие расходы на мобильность покрывались грантами Шведского института TP 09272/2013 и PI 19806_2016 (INNOVIMMUNE). Участие в работе Стефана Петкова поддержано грантом EU Horizon2020 проект VACTRAIN № 692293.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moi M.L., Ami Y., Muhammad Azami N.A., Shirai K., Yoksan S., Suzaki Y., Kitauro K., Lim C.K., Saijo M., Suzuki R., et al. // J. Gen. Virol. 2017. V. 98. № 12. P. 2955–2967.
- Orsi A., Rees D., Andreini I., Venturella S., Cinelli S., Oberto G. // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2011. V. 59. № 1. P. 19–27.
- Carrion R., Patterson J.L. // Curr. Opin. Virol. 2012. V. 2. № 3. P. 357–362.
- Arrand J.R. // Immunotherapy and vaccination against Epstein-Barr virus-associated cancer. Cancer vaccines / Eds Stern P., Carroll M., Beverley P. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2000. P. 174–194.
- Abbott D.H., Barnett D.K., Colman R.J., Yamamoto M.E., Schultz-Darken N.J. // Comp. Med. 2003. V. 53. № 4. P. 339–350.
- Cadavid L.F., Shufflebotham C., Ruiz F.J., Yeager M., Hughes A.L., Watkins D.I. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 26. P. 14536–14541.
- van der Wiel M.K., Otting N., de Groot N.G., Doxiadis G.G.M., Bontrop R.E. // Immunogenetics. 2013. V. 65. № 12. P. 841–849.
- Antunes S.G., de Groot N.G., Brok H., Doxiadis G., Menezes A.A., Otting N., Bontrop R.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 20. P. 11745–11750.
- Gough A.W., Barsoum N.J., Gracon S.I., Mitchell L., Sturgess J.M. // Lab. Anim. Sci. 1982. V. 32. № 1. P. 87–90.
- Mätz-Rensing K., Jentsch K.D., Rensing S., Langenhuyzen S., Verschoor E., Niphuis H., Kaup F.J. // Vet. Pathol. 2003. V. 40. № 4. P. 405–411.
- Moi M.L., Takasaki T., Omatsu T., Nakamura S., Katakai Y., Ami Y., Suzaki Y., Saijo M., Akari H., Kurane I. // J. Gen. Virol. 2014. V. 95. № 3. P. 591–600.
- McIntosh G.H., Giesecke R., Wilson D.F., Goss A.N. // Vet. Pathol. 1985. V. 22. № 1. P. 86–88.
- Haworth R., Jones S., Sanchez-Morgado J., Pilling A. // Vet. Rec. 2003. V. 153. № 11. P. 332–333.
- Zöller M., Mätz-Rensing K., Fahrion A., Kaup F.-J. // Vet. Pathol. 2008. V. 45. № 1. P. 80–84.
- Miller A.D., Kramer J.A., Lin K.C., Knight H., Martinot A., Mansfield K.G. // Vet. Pathol. 2010. V. 47. № 5. P. 969–976.
- Laufs R., Steinke H., Gisela S., Petzold D. // J. Natl. Cancer Inst. 1974. V. 53. № 1. P. 195–199.
- Wolfe L.G., Deinhardt F. // Primates Med. 1978. V. 10. № 1. P. 96–118.
- Wright J., Falk L.A., Wolfe L.G., Ogden J., Deinhardt F. // J. Natl. Cancer Inst. 1977. V. 59. № 5. P. 1475–1478.
- Neubert R., Foerster M., Nogueira A.C., Helge H. // Life Sci. 1995. V. 58. № 4. P. 317–324.
- Brok H.P.M., Hornby R.J., Griffiths G.D., Scott L.A.M., Hart B.A. // Cytometry. 2001. V. 45. № 4. P. 294–303.
- Neumann B., Shi T., Gan L.L., Klippert A., Daskalaki M., Stolte-Leeb N., Stahl-Hennig C. // J. Med. Primatol. 2016. V. 45. № 3. P. 139–146.
- Nelson M., Loveday M. // J. Immunol. Res. 2014. ID 913632. P. 1–8.
- Reichert T., DeBruyère M., Deneys V., Tötterman T., Lydyard P., Yuksel F., Chapel H., Jewell D., Van Hove L., Linden J., et al. // Clin. Immunol. Immunopathol. 1991. V. 60. № 2. P. 190–208.
- Chng W.J., Tan G.B., Kuperan P. // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004. V. 11. № 1. P. 168–173.
- Yoshida T., Omatsu T., Saito A., Katakai Y., Iwasaki Y., Kurosawa T., Hamano M., Higashino A., Nakamura S., Takasaki T., et al. // Arch. Virol. 2013. V. 158. № 6. P. 1209–1220.
- Klinger A., Gebert A., Bieber K., Kalies K., Ager A., Bell E.B., Westermann J. // Int. Immunol. 2009. V. 21. № 4. P. 443–455.
- Galkina E., Tanousis K., Preece G., Tolaini M., Kioussis D., Florey O., Haskard D.O., Tedder T.F., Ager A. // J. Exp. Med. 2003. V. 198. № 9. P. 1323–1335.
- Das A., Xu H., Wang X., Yau C.L., Veazey R.S., Pahar B. // PLoS One. 2011. V. 6. № 1. e16524.
- Sengstake S., Boneberg E.-M., Illges H. // Int. Immunol. 2006. V. 18. № 7. P. 1171–1178.

УДК 577.2

Сверхэкспрессия аденовирусного E1A сенсibiliзирует клетки, трансформированные E1A+Ras, к действию ингибиторов гистоновых деацетилаз

М. В. Иготти*, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

*E-mail: marie.igotti@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2018

Принята к печати 23.10.2018

РЕФЕРАТ Аденовирусный белок E1A рассматривается в качестве потенциального средства комплексной терапии злокачественных опухолей. Наибольший цитотоксический эффект E1A в опухолевых клетках наблюдается при совместном применении с ингибиторами гистоновых деацетилаз (ИГД). Однако ранее мы установили, что ИГД не вызывают апоптотической гибели клеток, трансформированных E1A и активированным *cHa-ras*. В представленной работе показано, что в таких клетках ИГД подавляют транскрипцию с собственного промотора гена E1A, что приводит к развитию клеток преимущественно по *cHa-ras*-зависимому пути, который вызывает активацию антиапоптотических каскадов PI3K/Akt и NF- κ B. Однако ИГД способны индуцировать апоптотическую гибель клеток E1A+Ras при условии высокой нерегулируемой экспрессии E1A с цитомегаловирусного промотора, активность которого не подавляется ИГД. Таким образом, для эффективного цитотоксического воздействия ИГД и E1A на клетки опухоли оптимальной является экспрессия гена E1A с промотора, независимого от ИГД.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирус, апоптоз, E1A, *cHa-ras*, ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД), трансформированные клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИГД – ингибиторы гистоновых деацетилаз; mERas – эмбриональные фибробласты мышцы, трансформированные *cHa-ras* и E1A; NaBut – бутират натрия.

ВВЕДЕНИЕ

Ранний ген E1A аденовируса человека типа 5 экспрессируется в инфицированной клетке и обеспечивает условия для репликации вируса [1]. В первое время E1A считали онкогеном из-за его способности immortalizировать клетки грызунов и в кооперации с другими онкогенами трансформировать их [2, 3]. Позднее обнаружили, что E1A проявляет противоопухолевую активность [4], в связи с чем его иногда рассматривают как опухолевый супрессор.

Трансформирующая активность E1A определяется его способностью дерегулировать клеточный цикл, связываясь и изменяя активность таких клеточных факторов, как белки семейства pRb [5–7], а также ингибиторы циклинзависимых киназ p21Waf1 [8, 9] и p27Kip1 [10]. E1A взаимодействует также с белками, ремоделирующими хроматин, включая гистон-ацетилтрансферазы (p300/CBP) [11] и гистоновые деацетилазы [12], что приво-

дит к изменению транскрипции ряда генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла. Известно, что ДНК и белок E1A аденовируса обнаруживаются в клетках легочного эпителия пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [13]. Однако, как уже сказано, E1A обладает противоопухолевой активностью и является объектом клинических исследований [14, 15]. Многие экспериментальные данные свидетельствуют о том, что экспрессия аденовирусного белка E1A повышает чувствительность раковых клеток млекопитающих к действию ряда цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, цисплатин, таксаны и др. [16–19]. При этом совместное действие E1A-генотерапии и ИГД приводило к более существенному повышению уровня гибели раковых клеток при минимальном негативном воздействии на нормальные клетки, чем действие таксола или этопозида [19].

Аденовирусный E1A способствует апоптотической гибели клеток, модулируя экспрессию генов, регулирующих апоптоз [17–19], активацию MAP-киназы p38 [17] и подавление антиапоптотического фактора NF-κB [20, 21]. Также E1A стабилизирует p53 через модификацию убиквитин-протеасомного механизма [16, 22], в результате чего в клетках, экспрессирующих белок E1A аденовируса, устанавливается повышенное содержание белка p53, что приводит к p53-зависимому апоптозу [16].

Уровень апоптоза в клетках, экспрессирующих E1A, может быть снижен комплементирующим трансформирующим онкогеном *ras*, который, стимулируя киназный каскад Ras/Raf/MEK/ERK, активирует антиапоптотический каскад PI3K/Akt и NF-κB [23]. Антиапоптотические функции Ras связаны также с его способностью стимулировать экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-XL [23]. Так, действие проапоптотического белка E1A и онкогенного Ras сбалансировано в эмбриональных фибробластах мыши, стабильно трансформированных вектором, кодирующим *cHa-ras*, и плазмидой, кодирующей белок E1A аденовируса человека типа 5 [24].

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) подавляют рост опухолевых клеток, вызывая остановку клеточного цикла, старение или апоптоз, не оказывая при этом токсического воздействия на нормальные клетки [25, 26]. Поэтому ИГД рассматривают как вещества, имеющие перспективы в качестве противоопухолевых препаратов.

Ранее мы показали, что ИГД вызывают остановку клеточного цикла и старение клеток, трансформированных онкогенами *cHa-Ras* и *E1A* [27–29], но не индуцируют их гибель, что в значительной степени отличает эти клетки от ряда опухолевых клеток, где ИГД стимулируют апоптотическую гибель [25, 26]. Поэтому мы изучали причины отсутствия апоптотической гибели клеток, экспрессирующих E1A с активированным Ras, при действии ИГД. Установлено, что способность клеток, трансформированных E1A и *cHa-ras*, избежать гибели при воздействии ИГД обусловлено ИГД-зависимым снижением экспрессии E1A и активации антиапоптотического фактора NF-κB. Соответственно индукция апоптоза в E1A+Ras-трансформированных клетках ингибиторами гистоновых деацетилаз возможна только при условии нерегулируемой экспрессии E1A.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Исследования проводили на линии эмбриональных фибробластов мыши, стабильно трансформированных вектором, кодирующим *cHa-ras*, и плазмидой p1A,

содержащей нуклеотиды 1–1634 генома аденовируса человека типа 5, кодирующие белок E1A [16, 24]. Клетки обрабатывали NaBut (4 мМ) в течение 24–72 ч.

Распределение клеток по содержанию ДНК

Распределение клеток по содержанию ДНК изучали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки промывали раствором PBS (0.14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄, 1.5 мМ KH₂PO₄, pH 7.2), пермеабелизировали сапонином в конечной концентрации 0.01% в течение 20 мин и многократно отмывали от сапонины раствором PBS. Затем клетки инкубировали в присутствии РНКазы А (100 мкг/мл) и йодида пропидия (10 мкг/мл, 15 мин при 37°C) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter Epicks XL (Becton, США).

Жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в плотности 2×10^3 клеток на ячейку и культивировали в присутствии или в отсутствие соответствующих ингибиторов в течение 24 ч. Жизнеспособность определяли спектрофотометрически, оценивая метаболическую активность клеток по способности восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) (Sigma) в нерастворимый пурпурный формазан. Клетки инкубировали в растворе МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл, приготовленном на PBS (1.5 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе), после чего удаляли среду культивирования, а клетки суспендировали в диметилсульфоксиде (ДМСО). Определяли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм на Multiscan-EX (Labsystems), используя ДМСО в качестве нулевого контроля.

Иммуноблоттинг белков

Клетки лизировали в буфере, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз и фосфатаз. Белки разделяли электрофоретически, переносили на мембрану PVDF (Millipore) и анализировали с помощью соответствующих специфических антител. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США). Использовали антитела против белков E1A (M73) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), Gapdh (14C10) (Cell Signalling, США) и pan-Ras (Oncogene Sci., США).

Анализ транскрипции генов

Клеточную РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США). Реакцию обратной транскрипции

проводили, используя 2 мкг РНК. Реакцию амплификации (ПЦР) проводили в присутствии 100 нг соответствующих праймеров к кДНК генов *e1a* и *gapdh* мыши: 5'-TG TG ATGGGTGTGAACCACG-3'/5'-CCAGTGAGTTCCCGTTTCAG-3'. ПЦР в пределах линейной амплификации фрагментов ДНК продолжалась в течение 25–35 циклов. Специфический продукт реакции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

Активность каспазы-3

Активность каспазы-3 *in vitro* оценивали по разрезанию специфического колориметрического субстрата Ac-DEVD-pNA (Calbiochem). Клетки лизировали в течение 20 мин при +4°C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 120 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% NP-40 и ингибиторы протеаз. Активность каспаз определяли на 96-луночных плато в 40 мкл лизатов, смешанных с 160 мкл реакционного буфера (20% глицерин; 0.5 мМ EDTA; 5 мМ ДТТ; 100 мМ HEPES, рН 7.5) с субстратом Ac-DEVD-pNA. Эффективность разрезания субстрата определяли спектрофотометрически по накоплению *n*-нитроанилида при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan-EX (Labsystems).

Временные трансфекции и анализ люциферазной активности

Клетки трансфицировали, используя реагент Lipofectamine-2000 (Invitrogen), по протоколу фирмы-производителя. Для трансфекции использовали люциферазный репортерный вектор, содержащий три копии NF-κB-связывающих последовательностей (3 × κB-luc). В качестве внутреннего контроля использовали экспрессию люциферазы Renilla. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали 4 мМ NaBut, а через 48 ч подвергали процессингу согласно инструкции производителя для измерения активности люциферазы. Люциферазную активность определяли на люцинометре TD-20/20 (Turner Designs). Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия подавляет экспрессию аденовирусного E1A

Чтобы выяснить причины отсутствия ожидаемого цитотоксического эффекта ИГД в E1A-экспрессирующих клетках, мы проанализировали влияние ИГД бутирата натрия (NaBut) на экспрессию трансформирующих онкогенов. Представленные на *рис. 1* данные показывают, что экспрессия E1A снижается в присутствии NaBut. Так в ЭФК, транс-

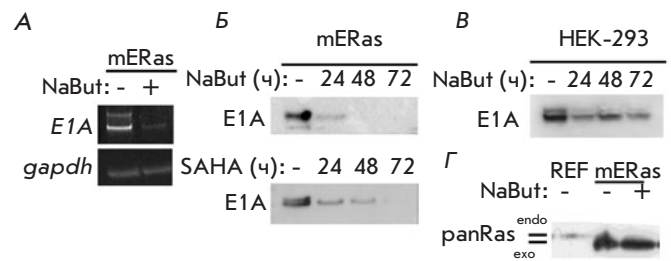


Рис. 1. Снижение экспрессии E1A при действии NaBut в клетках, экспрессирующих E1A. А – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции гена *E1A* в клетках mERas, необработанных (-) и обработанных в течение 16 ч NaBut (+). Б – иммуноблоттинг белков из клеток mERas, необработанных или обработанных NaBut в течение 24–72 ч (верхняя панель) или 2.5 мкМ SAHA (нижняя панель) с антителами против E1A аденовируса человека типа 5 (E1A5Ad). В – иммуноблоттинг белков из клеток HEK-293 с антителами против E1A5Ad. Г – иммуноблоттинг белков из клеток mERas с антителами против panRas

формированных онкогенами E1A и сHa-Ras (линия mERas), уже в первые часы действия NaBut снижается как транскрипция гена *E1A* (*рис. 1A*), так и количество белкового продукта E1A (*рис. 1B*). Специфичен ли наблюдаемый эффект для конкретной клеточной линии и используемого ИГД? Чтобы понять это, мы проанализировали экспрессию E1A в трансформированных линиях человека, а также использовали альтернативные ИГД. Оказалось, что вальпроевая кислота (VA), трихостатин А (TSA) (данные не представлены) и вориностат также приводили к уменьшению E1A в трансформантах mERas (*рис. 1B*, нижняя панель). Результаты, приведенные на *рис. 1B*, показывают, что снижение экспрессии E1A при действии ИГД не является специфичным только для линии mERas. Методом иммуноблоттинга показано, что в присутствии NaBut уменьшается количество белка E1A в трансформированных клетках почечного эпителия человека HEK-293. Результаты иммуноблоттинга показывают, что экспрессия белка Ras не изменяется при действии NaBut (*рис. 1Г*). Таким образом, установлено, что ИГД подавляют экспрессию аденовирусного E1A, тогда как экспрессия Ras не модулируется ИГД.

Выявленное нами снижение содержания белка E1A при действии ИГД может приводить к сдвигу баланса активностей трансформирующих белков в клетках mERas. При этом доминирующим становится действие онкогенного Ras. Мы предположили, что низкий уровень апоптотической гибели клеток, трансформированных E1A+Ras, в присутствии ИГД связан со снижением экспрессии проапоптотического

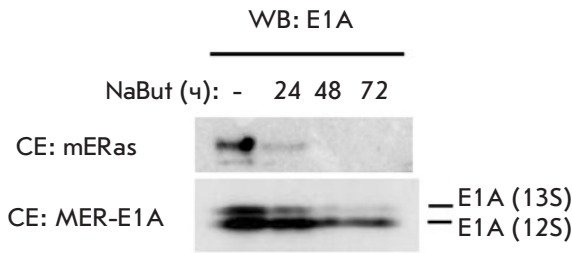


Рис. 2. Иммуноблоттинг белков клеток mERas (верхняя панель) и MER-E1A (нижняя панель), обработанных NaBut в течение 24–72 ч, с антителами против E1A5Ad

белка E1A и активацией антиапоптотического каскада Ras/Akt/NF-κB.

Получение E1A+Ras-трансформированной клеточной линии, с нерегулируемой ИГД экспрессией E1A

Клеточную линию mERas-1A получали с использованием плазмиды p1A, которая содержит нуклеотиды 1–1634 генома аденовируса человека типа 5, кодирующие белок E1A [16, 24]. В этих клетках экспрессия гена E1A регулируется собственным промотором. Чтобы проверить гипотезу, согласно которой снижение экспрессии E1A необходимо для уменьшения индуцируемого ИГД апоптоза, мы сначала на основе клеток mERas создали клеточную линию MER-E1A, которая дополнительно экспрессирует белок E1A 12S под контролем нерегулируемого в этих условиях промотора цитомегаловируса (CMV). Регуляция и активность вирусных промоторов CMV и Ad5 имеют существенные различия. Это позволяет использовать их с различной целью в клетках-мишенях. Высокоактивный промотор CMV удобен для эффективной экспрессии трансгена.

На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга, показывающие как NaBut влияет на экспрессию белка E1A в исходной клеточной линии mERas (верхняя панель) и в новой клеточной линии MER-E1A с конститутивной экспрессией E1A под контролем промотора CMV (нижняя панель). В контрольных клетках mERas экспрессия E1A снижается практически до нуля уже в первые часы действия NaBut и находится на низком уровне на протяжении всего времени исследования (до 72 ч). Однако в клетках линии MER-E1A белок E1A 12S экспрессируется на высоком уровне независимо от NaBut.

Таким образом, нами получена линия трансформированных клеток грызунов, экспрессирующая аденовирусный ген E1A под контролем промотора CMV, в которой экспрессия E1A не снижается при действии ИГД.

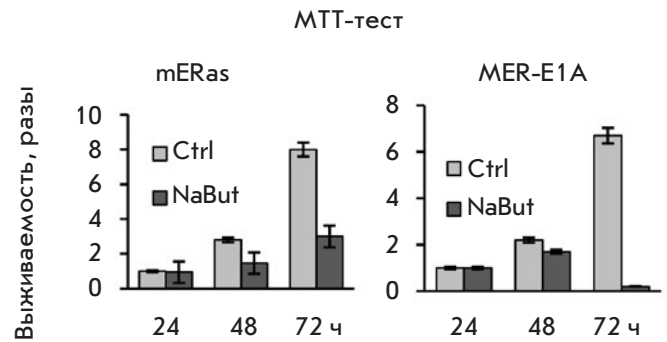


Рис. 3. NaBut подавляет жизнеспособность клеток mERas и MER-E1A в разной степени. Контрольные клетки mERas и клетки MER-E1A, стабильно экспрессирующие E1A, обрабатывали NaBut в течение 24–72 ч и определяли их жизнеспособность с помощью МТТ-теста. Изменение жизнеспособности (разы) оценивали относительно жизнеспособности необработанных клеток через 24 ч после посева

Бутират натрия индуцирует апоптоз только в E1A+Ras-трансформированных клетках, количество E1A в которых не снижается при действии ИГД

Далее сравнили влияние ИГД на пролиферацию E1A+Ras-трансформированных клеток, в которых E1A экспрессируется под контролем собственного промотора, и в клетках, где экспрессия E1A регулируется промотором CMV. Мы оценили влияние NaBut на жизнеспособность клеток в зависимости от характера экспрессии E1A. Контрольные клетки mERas и клетки MER-E1A с нерегулируемой экспрессией E1A обрабатывали NaBut в течение 24–72 ч и определяли их жизнеспособность, используя тест МТТ. Как показано на рис. 3, жизнеспособность контрольных клеток mERas, обработанных NaBut, снижается сильнее, чем необработанных. Однако количество формазана, характеризующего жизнеспособность клеток, повышается при увеличении продолжительности воздействия NaBut на клетки mERas, отражая тот факт, что клетки не делятся, но остаются живыми. Количество жизнеспособных клеток MER-E1A при этом снижается ниже стартового уровня, что указывает на их гибель.

Чтобы проверить предположение об индукции гибели клеток с нерегулируемой экспрессией E1A под действием NaBut, мы проанализировали распределение клеток по содержанию ДНК на проточном цитофлуориметре. На рис. 4А приведено распределение клеток после временной трансфекции. Видно, что NaBut не вызывает увеличения субдиплоидного пика в клетках, трансфицированных

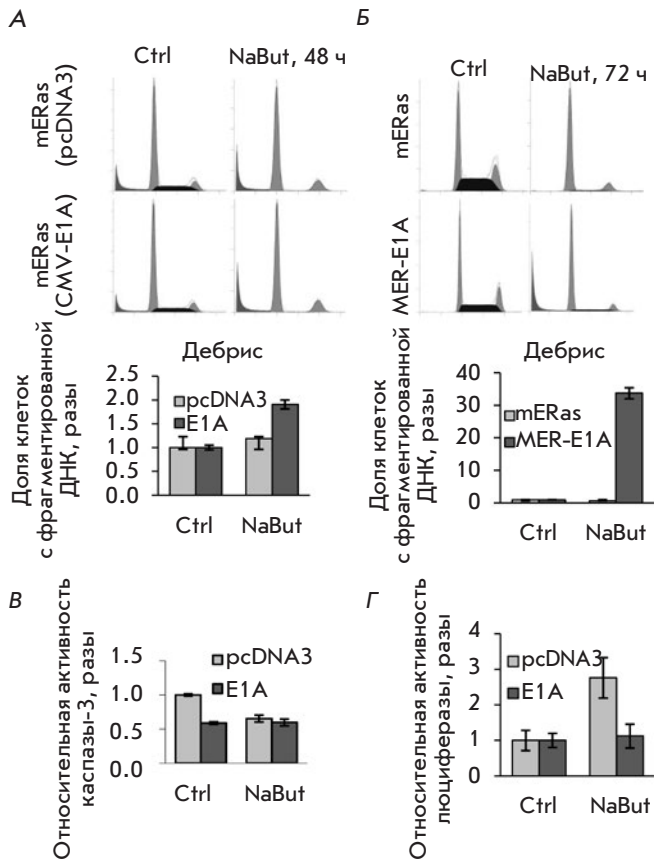


Рис. 4. Аденовирусный E1A изменяет влияние NaBut на трансформированные клетки. А – распределение клеток по содержанию ДНК. Клетки mERas трансфицировали контрольным вектором pcDNA3 (верхняя панель) или экспрессионным вектором CMV-E1A (нижняя панель) и через 24 ч обрабатывали NaBut в течение 48 ч. Б – распределение стабильных клонов по содержанию ДНК. Контрольные клетки mERas или клетки MER-E1A, стабильно экспрессирующие E1A, обрабатывали NaBut в течение 72 ч. В – относительная активность каспазы-3 в клетках mERas, трансфицированных pcDNA3 (светло-серые столбики) или CMV-E1A (темные столбики), необработанных (Ctrl) или обработанных NaBut в течение 24 ч. Г – относительная активность люциферазы, транскрибируемой с NF-κB-регулируемого промотора. Клетки mERas котрансфицировали репортерным вектором 3×κB-luc совместно с пустым вектором pcDNA3 (светло-серые столбики) или с экспрессионным вектором CMV-E1A (темные столбики) и обрабатывали NaBut спустя 24 ч после трансфекции в течение 24 ч

пустым контрольным вектором pcDNA3 (рис. 4А, верхняя панель). При этом в клетках, трансфицированных CMV-E1A, доля клеток с субдиплоидным содержанием ДНК увеличивается в 2 раза уже через 48 ч после действия NaBut (рис. 4А, нижняя панель).

Полученные данные указывают на существенную разницу в характере ответа клеток на ИГД в зависимости от того, как ИГД модулируют экспрессию E1A.

Соответствующие результаты получены в стабильных клонах со сверхэкспрессией E1A под промотором CMV (MER-E1A). В контрольных клетках mERas NaBut и через 72 ч не вызывал характерного для гибнущих клеток увеличения субдиплоидного пика в гистограмме распределения по содержанию ДНК (рис. 4Б). При этом в клетках линии MER-E1A через 72 ч после действия NaBut 35% клеток содержали фрагментированную ДНК.

Таким образом, показано, что NaBut индуцирует гибель только тех Ras-трансформированных клеток, в которых экспрессия E1A не снижается при действии NaBut.

Мы проанализировали активность каспазы-3, опосредующей передачу апоптотического сигнала. Для этого клетки, трансфицированные pcDNA3 или CMV-E1A, оставляли необработанными или обрабатывали NaBut в течение 24 ч, после чего определяли активность каспазы-3 *in vitro* в клеточных лизатах. Оказалось, что в контрольных клетках, трансфицированных pcDNA3, NaBut вызывает снижение активности каспазы-3, как в исходных клетках mERas [30]. При этом в клетках, трансфицированных CMV-E1A, активность каспазы-3 не снижается при действии NaBut (рис. 4В). Различия в регуляции активности каспазы-3 ИГД в зависимости от модуляции экспрессии E1A соответствуют полученным нами данным о различиях в пролиферативном ответе таких клеток на ИГД.

Активность NF-κB не возрастает при действии NaBut в клетках с нерегулируемой экспрессией E1A

Ранее было показано, что ИГД активируют антиапоптотический фактор NF-κB в клетках, трансформированных E1A и cHa-ras [30]. Это позволяет трансформантам избегать апоптоза при действии ИГД. Поэтому мы сравнили влияние ИГД на активность NF-κB в клетках с регулируемой и нерегулируемой экспрессией E1A. Для этого исходные клетки mERas котрансфицировали вектором 3×κB-luc, содержащим ген люциферазы под промотором, регулируемым NF-κB, а также либо экспрессионным вектором CMV-E1A, либо пустым вектором pcDNA3 в качестве контроля. Спустя 24 ч после трансфекции клетки оставляли необработанными, либо обрабатывали NaBut в течение 24 ч, и измеряли активность люциферазы в лизатах. Оказалось, что в контрольных клетках (pcDNA3) NF-κB-зависимая транскрипция увеличивалась при действии NaBut в 3 раза, тогда как в клетках с нерегулируемой высокой экспресси-

ей E1A (CMV-E1A) активность NF- κ B не изменялась (рис. 4Г). Нами установлено, что нерегулируемая высокая экспрессия аденовирусного E1A с промотора CMV препятствует ИГД-зависимой активации антиапоптотического фактора NF- κ B. Таким образом, подавление активности NF- κ B аденовирусным E1A является одной из причин индукции апоптоза ИГД в этих клетках.

Клетки с нерегулируемой экспрессией E1A не накапливают маркер клеточного старения SA- β -Gal при действии NaBut

Клеточное старение и апоптоз – альтернативные антипролиферативные программы, которые индуцируются цитотоксическими стресс-факторами. Ранее было показано, что ИГД индуцируют старение клеток, трансформированных онкогенами *cHa-Ras* и E1A [27–29]. Запуск программы старения в этих клетках, вероятно, связан с тем, что под действием ИГД снижается уровень экспрессии E1A, что приводит к доминированию процессов, индуцируемых активированным Ras, а именно, программы клеточного старения [31]. Чтобы проверить предположение, согласно которому клеточное старение не индуцируется в тех E1A+Ras-трансформированных клетках, экспрессия E1A в которых не подавляется ИГД, мы проанализировали экспрессию маркера стареющих клеток SA- β -Gal. Результаты световой микроскопии, приведенные на рис. 5, показывают, что почти во всех контрольных трансформантах mERas через 72 ч действия NaBut выявляется SA- β -Gal, что указывает на индукцию клеточного старения. Тогда как в клетках MER-E1A маркер SA- β -Gal не накапливается. Стоит отметить, что после воздействия NaBut в течение 72 ч очень мало клеток MER-E1A оставалось прикрепленными к стеклам для дальнейшей окраски на SA- β -Gal, а большинство клеток погибало и всплывало. Таким образом, можно заключить, что NaBut индуцирует клеточное старение в клетках, трансформированных E1A и Ras, если экспрессия E1A снижается при действии NaBut, тогда как трансформанты с конститутивной экспрессией E1A подвергаются гибели, а не старению.

ОБСУЖДЕНИЕ

Аденовирусный E1A иммортализирует и трансформирует в кооперации с активированным Ras или другими онкогенами первичные клетки грызунов [2, 3]. В связи с этим E1A рассматривали как онкобелок, несмотря на то, что он не был ассоциирован ни с какой онкогенной активностью. Позднее обнаружили, что E1A проявляет противоопухолевую активность [2, 17–19]. Сверхэкспрессия E1A вызывает остановку пролиферации и апоптоз опухолевых клеток челове-

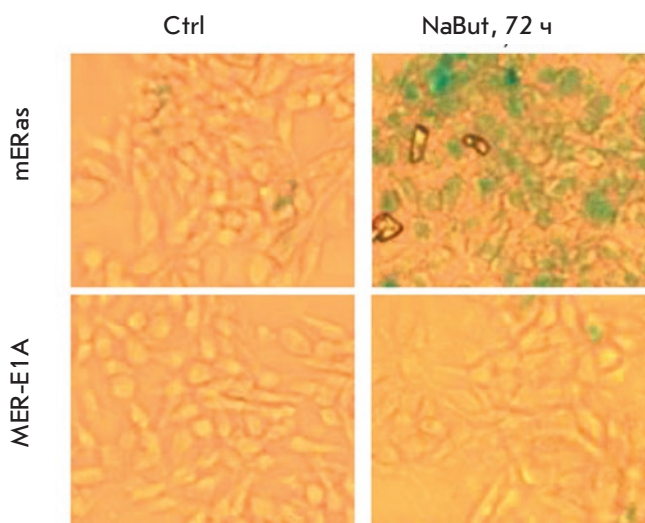


Рис. 5. Бутират натрия не вызывает старение в клетках с нерегулируемой экспрессией E1A. Окрашивание SA- β -Gal. Клетки mERas и MER-E1A обрабатывали NaBut в течение 72 ч, после чего фиксировали и окрашивали на SA- β -Gal

ка *in vitro* [4, 16]. Причем именно апоптоз играет ключевую роль в противоопухолевой активности E1A. В ряде доклинических исследований было показано, что липосомная или аденовирусная доставка гена E1A подавляет рост и метастазирование опухолей у животных [17, 32]. Клинические испытания генной моно-, а также комбинированной терапии с применением E1A при раке различной локализации показали рациональность такого подхода [14, 33, 34]. В последнее время усилия многих ученых направлены на изучение возможности терапии с использованием онколитических вирусов на основе аденовируса типа 5 человека (Ad5) [35]. По данным портала ClinicalTrials.gov Национального института здоровья, к настоящему моменту проведено более 180 клинических испытаний с использованием аденовирусов в той или иной форме. Основной мишенью при создании онколитических аденовирусов с ограниченной репликативной способностью является ген, кодирующий E1A, благодаря способности белка E1A побуждать покоящуюся клетку к делению за счет секвестрирования опухолевого супрессора pRb. Принимая во внимание потенциальную значимость аденовирусов и аденовирусного E1A в противоопухолевой терапии, подробное изучение функционирования и регуляции E1A, приводящие к сенсibilизации клеток к действию цитостатиков, является актуальной задачей молекулярной биологии.

Многие исследования указывают на усиление цитотоксического эффекта при совместном исполь-

зовании ИГД и аденовирусного E1A в опухолевых клетках [19, 36, 37]. ИГД не вызывали гибель использованных нами клеток, трансформированных онкогенами *cHa-ras* и *E1A*. Однако бутират натрия индуцировал апоптоз в этих клетках, если аденовирусный *E1A* экспрессировался под ИГД-нерегулируемым промотором. В работах, описывающих усиление цитотоксического эффекта при совместном использовании *E1A* и ИГД, *E1A* экспрессировался не с собственного промотора, а с промотора цитомегаловируса (CMV) или каталитической субъединицы теломеразы (TERT), активность которых не подавляется, а стимулируется ИГД [19, 38–40]. Следовательно, наши результаты подтверждают данные об эффективности совместного использования ИГД и *E1A* для элиминирования злокачественно трансформированных клеток при условии повышенной нерегулируемой экспрессии *E1A*. Приоритетность наших результатов заключается в том, что мы показали способность ИГД подавлять экспрессию *E1A* на нескольких уровнях. Во-первых, при действии NaBut снижается транскрипция гена *E1A* (рис. 1А). Регуляция экспрессии *E1A* к настоящему моменту изучена недостаточно. Не опубликованы данные о роли ацетилтрансфераз или деацетилаз в регуляции транскрипции *E1A*. Ингибирование деацетилаз гистонов активирует транскрипцию генов через релаксацию структуры хроматина. С другой стороны, ИГД могут ингибировать или активировать транскрипцию, изменяя уровень ацетилованности факторов транскрипции [41]. Таким образом, показанное нами ингибирование транскрипции *E1A* опосредовано скорее модуляцией гистоновыми деацетилазами активности факторов транскрипции, вовлеченных в регуляцию экспрессии *E1A*. В энхансерной области промотора гена ранней области *E1A* наряду с иными регуляторными элементами присутствуют два участка связывания транскрипционных факторов семейства E2F [42]. Отсутствие этих участков полностью подавляет экспрессию *E1A*, что указывает на исключительную значимость E2F-связывающих областей в регуляции транскрипции *E1A*. Ранее мы показали, что NaBut подавляет *транс*-активирующую способность фактора E2F [28, 43]. Следовательно, можно предположить, что наблюдаемое снижение экспрессии *E1A* отчасти обусловлено NaBut-зависимым ингибированием фактора E2F. Известно, что активности других часто используемых в генной инженерии вирусных промоторов – цитомегаловирусного и полиомавирусного (SV40), стимулируются ИГД [38]. Вирусные промоторы, несмотря на ряд схожих особенностей, существенно отличаются характером регуляции их активности. Например, промотор CMV положительно регулируется белком *E1A* [44], тогда как собствен-

ный промотор гена *E1A*, а также промотор HIV-LTR репрессируются белком *E1A* [45, 46]. Поэтому можно предположить, что регуляция активности вирусных промоторов ингибиторами деацетилаз также не является универсальной.

Во-вторых, наши данные свидетельствуют о том, что ИГД вызывают снижение содержания белка *E1A* как в клетках mERas, так и в линии трансформированных клеток НЕК-293 эмбриональной почки человека (рис. 1Б). Причем содержание белка *E1A* снижается более интенсивно, чем транскрипция гена *E1A*, что указывает на модуляцию стабильности белка *E1A* ингибиторами деацетилаз. Как и многие клеточные белки, белки, кодируемые вирусами, также служат субстратами ацетилтрансфераз и деацетилаз. Белок *E1A* способен связываться с p300/CBP и может ацетилироваться p300 и PCAF [47]. Ацетилирование изменяет характер взаимодействия *E1A* с белками-партнерами [48] и определяет его внутриклеточную локализацию [47]. Так, ацетилирование *E1A* препятствует ядерному импорту и соответственно приводит к накоплению *E1A* в цитоплазме. Однако показано, что ингибирование деацетилаз бутиратом натрия в клетках НЕК-293, экспрессирующих *E1A*, не увеличивало количество ацетилированного *E1A* и не приводило к накоплению *E1A* в цитоплазме [47]. Эти данные предполагают, что *E1A* подвергается быстрой деградации, следующей за ацетилированием белка. Деградация *E1A* может осуществляться в протеасомах [48]. Также показано, что белки раннего района 1А аденовирусов типа 2 и 12 (Ad2 и Ad12 *E1A*) расщепляются каспазами-3 и -7 в процессе индуцированного апоптоза в трансформированных аденовирусом клетках человека и мыши [49]. В соответствии со сказанным можно заключить, что усиленное ацетилирование белка *E1A*, индуцированное ИГД, может быть одним из факторов, определяющих деградацию *E1A*.

Сравнение ответа трансформированных клеток с регулируемой и нерегулируемой экспрессией *E1A* на ИГД показало, что апоптоз индуцировался только в клетках с нерегулируемой повышенной экспрессией *E1A*, тогда как в контрольных клетках mERas, где содержание *E1A* снижалось, запускалась программа клеточного старения (рис. 5). Мы показали, что избегание контрольными клетками mERas апоптотической гибели связано со снижением экспрессии проапоптотического белка *E1A* и активацией антиапоптотического каскада NF-κB. При этом доминирующим становится действие онкогенного Ras, который индуцирует старение. В свою очередь, индукция апоптотической гибели в присутствии NaBut на фоне сверхэкспрессии *E1A* связана с подавленной и нерегулируемой активностью антиапоптотического

комплекса NF- κ B. Опубликованы данные о репрессии активности NF- κ B онкобелком E1A [18, 20, 21]. Так, E1A конкурентно связывает и инактивирует протеинкиназу A, которая должна фосфорилировать NF- κ B и таким образом активировать его [21]. Также E1A подавляет активность ИКК, что приводит к снижению деградации И κ B – ингибитора, регулирующего функционирование NF- κ B [20]. Таким образом, принимая во внимание сказанное, а также данные о синхронизированном во времени уменьшении содержания E1A и активации NF- κ B [30], можно предположить, что в клетках, трансформированных E1A+Ras, ИГД влияет на активность NF- κ B, модулируя экспрессию E1A.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность опухолевых клеток к агентам, индуцирующим апоптоз [18], в связи с чем E1A представляет большой интерес в качестве потенциального компонента комбинированной терапии

опухолей. Совместное использование E1A и ИГД приводит к усилению цитотоксического эффекта во многих раковых клетках с минимальным негативным влиянием на нормальные клетки [19]. Однако ИГД не индуцируют апоптоз в трансформированной онкогенами *cHa-Ras* и E1A клеточной линии, в которой E1A экспрессируется под контролем собственного вирусного промотора. В представленной работе нами показано, что ИГД подавляют экспрессию аденовирусного E1A. Апоптотическая гибель клеток E1A+Ras может быть индуцирована ИГД, если E1A экспрессируется на нерегулируемом высоком уровне. Иными словами, избегание апоптотической гибели Ras-трансформированными клетками, экспрессирующими E1A, связано со снижением экспрессии E1A в присутствии ИГД. В свою очередь, форсированная экспрессия E1A, независимая от ИГД, создает условия для индукции апоптоза. ●

*Работа проведена при поддержке Российского
научного фонда (грант № 14-50-00068).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Flint J., Shenk T. // *Annu. Rev. Genet.* 1989. V. 23. № 1. P. 141–161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2533472>
- Frisch S.M., Mymryk J.S. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. № 6. P. 441–452. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042766>
- Ruley H.E. // *Nature.* 1983. V. 304. № 5927. P. 602–606. <http://www.nature.com/doi/10.1038/304602a0>
- Frisch S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 20. P. 9077–9081. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1833772>
- Pelka P., Ablack J.N.G., Fonseca G.J., Yousef A.F., Mymryk J.S. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 15. P. 7252–7263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385237>
- Chinnadurai G. // *Trends Microbiol.* 2011. V. 19. № 4. P. 174–183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330137>
- Zamanian M., La Thangue N.B. // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 7. P. 2603–2610. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385776>
- Keblusek P., Dorsman J.C., Teunisse A.F., Teunissen H., van der Eb A.J., Zantema A. // *J. Gen. Virol.* 1999. V. 80. № 2. P. 381–390.
- Bulavin D.V., Tararova N.D., Aksenov N.D., Pospelov V.A., Pospelova T. V. // *Oncogene.* 1999. V. 18. № 41. P. 5611–5619. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523840>
- Mal A., Poon R.Y.C., Howe P.H., Toyoshima H., Hunter T., Harter M.L. // *Nature.* 1996. V. 380. № 6571. P. 262–265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637577>
- Ferrari R., Pellegrini M., Horwitz G.A., Xie W., Berk A.J., Kurdistani S.K. // *Science.* 2008. V. 321. № 5892. P. 1086–1088. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719284>
- Miura T.A., Cook J.L., Potter T.A., Ryan S., Routes J.M. // *J. Cell. Biochem.* 2007. V. 100. № 4. P. 929–940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063489>
- Keicho N., Higashimoto Y., Bondy G.P., Elliott W.M., Hogg J.C., Hayashi S. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. № 3 Pt 1. P. L523–L532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484459>
- Madhusudan S., Tamir A., Bates N., Flanagan E., Gore M.E., Barton D.P.J., Harper P., Seckl M., Thomas H., Lemoine N.R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 9. P. 2986–2996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131034>
- Yoo G.H., Hung M.C., Lopez-Berestein G., LaFollette S., Ensley J.F., Carey M., Batson E., Reynolds T.C., Murray J.L. // *Clin. Cancer Res.* 2001. V. 7. № 5. P. 1237–1245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350889>
- Lowe S.W., Ruley H.E. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 4. P. 535–545. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384579>
- Liao Y., Hung M.-C. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 17. P. 5938–5942. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342371>
- Radke J.R., Siddiqui Z.K., Figueroa I., Cook J.L. // *Cell Death Discov.* 2016. V. 2. № 1. P. 16076. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27833761>
- Yamaguchi H., Chen C.-T., Chou C.-K., Pal A., Bornmann W., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. // *Oncogene.* 2010. V. 29. № 41. P. 5619–5629. <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2010.295>
- Shao R., Tsai E.M., Wei K., von Lindern R., Chen Y.H., Makino K., Hung M.C. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 20. P. 7413–7416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606372>
- Guan H., Jiao J., Ricciardi R.P. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 1. P. 40–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959673>
- Nakajima T., Morita K., Tsunoda H., Imajoh-Ohmi S., Tanaka H., Yasuda H., Oda K. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 32. P. 20036–20045. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685342>
- Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. № 11. P. 761–774. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993244>
- Pospelova T.V., Medvedev A.V., Kukushkin A.N., Svetlikova S.B., van der Eb A.J., Dorsman J.C., Pospelov V.A. // *Gene Expr.* 1999. V. 8. № 1. P. 19–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543728>

25. Bolden J.E., Shi W., Jankowski K., Kan C.-Y., Cluse L., Martin B.P., MacKenzie K.L., Smyth G.K., Johnstone R.W. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. № 2. P. e519. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449455>
26. Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 9. P. 769–784. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955068>
27. Romanov V.S., Abramova M.V., Svetlikova S.B., Bykova T.V., Zubova S.G., Aksenov N.D., Fornace A.J., Pospelova T.V., Pospelov V.A. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 19. P. 3945–3955.
28. Abramova M.V., Pospelova T.V., Nikulenkov F.P., Hollander C.M., Fornace A.J., Pospelov V.A. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 30. P. 21040–21051.
29. Igotti-Abramova M.V., Pojidaeva A.K., Filippova E.A., Gnedina O.O., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014. V. 51. № 6. P. 102–110.
30. Abramova M.V., Zatulovskiy E.A., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 42. № 11. P. 1847–1855.
31. Kilbey A., Terry A., Cameron E.R., Neil J.C. // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 15. P. 2333–2340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677118>
32. Ueno N.T., Bartholomeusz C., Xia W., Anklesaria P., Bruckheimer E.M., Mebel E., Paul R., Li S., Yo G.H., Huang L., et al. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 22. P. 6712–6716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438271>
33. Hortobagyi G.N., Ueno N.T., Xia W., Zhang S., Wolf J.K., Putnam J.B., Weiden P.L., Willey J.S., Carey M., Branham D.L., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2001. V. 19. № 14. P. 3422–3433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454891>
34. Villaret D., Glisson B., Kenady D., Hanna E., Carey M., Gleich L., Yoo G.H., Futran N., Hung M.-C., Anklesaria P., et al. // *Head Neck.* 2002. V. 24. № 7. P. 661–669. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112540>
35. Larson C., Oronsky B., Scicinski J., Fanger G.R., Stirn M., Oronsky A., Reid T.R. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 24. P. 19976–19989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280277>
36. Hulin-Curtis S.L., Davies J.A., Jones R., Hudson E., Hanna L., Chester J.D., Parker A.L. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 41. P. 26328–26341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29899862>
37. Marchini A., Scott E., Rommelaere J. // *Viruses.* 2016. V. 8. № 1. P. 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26751469>
38. Lai M.-D., Chen C.-S., Yang C.-R., Yuan S.-Y., Tsai J.-J., Tu C.-F., Wang C.-C., Yen M.-C., Lin C.-C. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 17. № 3. P. 203–211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851354>
39. Balakrishnan L., Milavetz B. // *Virol. J.* 2008. V. 5. P. 43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353181>
40. Takakura M., Kyo S., Sowa Y., Wang Z., Yatabe N., Maida Y., Tanaka M., Inoue M. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 14. P. 3006–3011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452025>
41. Chueh A.C., Tse J.W.T., Tögel L., Mariadason J.M. // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 23. № 1. P. 66–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512308>
42. Kirch H.C., Pützer B., Schwabe G., Gnauck H.K., Schulte Holthausen H. // *Cell. Mol. Biol. Res.* 1993. V. 39. № 8. P. 705–716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951410>
43. Abramova M.V., Zatulovskiy E.A., Svetlikova S.B., Kukushkin A.N., Pospelov V.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391. № 1. P. 142–146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900401>
44. Metcalf J.P., Monick M.M., Stinski M.F., Hunninghake G.W. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994. V. 10. № 4. P. 448–452. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136160>
45. Schaack J., Allen B., Orlicky D.J., Bennett M.L., Maxwell I.H., Smith R.L. // *Virology.* 2001. V. 291. № 1. P. 101–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11878880>
46. Song C.Z., Loewenstein P.M., Green M. // *J. Virol.* 1995. V. 69. № 5. P. 2907–2911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707515>
47. Madison D.L., Yaciuk P., Kwok R.P.S., Lundblad J.R. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38755–38763. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161448>
48. Turnell A.S., Grand R.J., Gorbea C., Zhang X., Wang W., Mymryk J.S., Gallimore P.H. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 17. P. 4759–4773. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970867>
49. Grand R.J.A., Schmeiser K., Gordon E.M., Zhang X., Gallimore P.H., Turnell A.S. // *Virology.* 2002. V. 301. № 2. P. 255–271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359428>

УДК 577.21

Варианты митохондриального генома и риск развития рассеянного склероза у русских

М. С. Козин^{1,2*}, О. Г. Кулакова^{1,2}, И. С. Киселёв^{1,2}, О. П. Балановский³, А. Н. Бойко¹,
О. О. Фаворова^{1,2}

¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

²Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, 15а

³Биобанк Северной Евразии, 115201, Москва, ул. Котляковская, 3, стр. 12

*E-mail: kozinmax1992@gmail.com

Поступила в редакцию 10.09.2018

Принята к печати 28.11.2018

РЕФЕРАТ Впервые у этнических русских проведен анализ ассоциации с развитием рассеянного склероза (РС) гаплогрупп Н, J, K и U митохондриального генома, а также отдельных полиморфных вариантов генов митохондриальной ДНК (мтДНК), дискриминирующих эти гаплогруппы (m.1719G > A, m.7028C > T, m.9055G > A, m.10398A > G, m.12308A > G). Исследуемая выборка включала 283 неродственных больных ремиттирующей формой РС и 290 здоровых доноров. Наблюдали ассоциацию гаплогруппы J с РС ($P = 0.0055$; ОШ = 2.00 [95% ДИ 1.21–3.41]). При гендерной стратификации значимая ассоциация сохранялась у женщин ($P = 0.0083$; ОШ = 2.20 [95% ДИ 1.19–4.03]). Проведен мультилокусный анализ ассоциации с РС сочетаний гаплогрупп мтДНК и вариантов 38 ядерных генов, вовлеченных в функционирование иммунной системы. Выявлены ассоциированные с РС биаллельные сочетания гаплогруппы J с аллелями *CCL5* rs2107538*A, *PVT1* rs2114358*G, *TNFSF14* rs1077667*C и *IL4* rs2243250*C, поодиночке не ассоциированными значимо с РС. Для сочетания гаплогруппы J и аллеля *CCL5**A ($P = 0.00043$; ОШ = 5.47 [95% ДИ 1.85–16.15]) при помощи двух статистических критериев (значение P_{FLINT} в точном трехфакторном тесте, подобном точному критерию Фишера, и фактор синергии, SF) установлен эпистатический (синергический) характер взаимодействия компонентов ($P_{\text{FLINT}} = 0.025$; SF = 4.32 [95% ДИ 1.20–15.60]). Сочетание гаплогруппы J с аллелем *PVT1**G характеризуется $P_{\text{FLINT}} = 0.084$; SF = 3.05 [95% ДИ 1.00–9.31] и также может быть эпистатическим. Таким образом, впервые показано взаимодействие компонентов ядерного и митохондриального геномов при формировании риска развития РС.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генетический полиморфизм, митохондриальный геном, мультилокусный анализ, рассеянный склероз, ядерный геном.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ FLINT – точный трехфакторный тест, подобный точному критерию Фишера (Fisher-like interaction numeric test); GWAS – широкогеномный поиск ассоциаций (genome-wide association study); SF – фактор синергии (synergy factor); SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism); ДИ – доверительный интервал; мтДНК – митохондриальная ДНК; NAD – никотинамидадениндинуклеотид; ОШ – отношение шансов; ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов; ПЦР – полимеразная цепная реакция; РС – рассеянный склероз; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь.

ВВЕДЕНИЕ

Рассеянный склероз (РС) – нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы, в патогенезе которого большую роль играет хронический воспалительный процесс. РС, как правило, поражает людей в трудоспособном возрасте и, начавшись с единичных проявлений неврологической симптоматики, в конечном итоге приводит к тяжелой инва-

лидации [1]. По данным ВОЗ, в мире насчитывается около 2.5 млн больных РС. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в понимании природы РС, и создание препаратов, модулирующих его течение, это заболевание остается одним из наиболее социально значимых.

РС – заболевание с генетической компонентой; риск его развития у членов семьи зависит от генети-

ческого расстояния до пробанда и достигает самых высоких значений у ближайших родственников последнего [2], однако не подчиняется менделевским закономерностям. Такой тип наследования свойствен заболеваниям полигенной природы, когда существует множество независимых или взаимодействующих полиморфных вариантов генов, каждый из которых может лишь в незначительной степени влиять на предрасположенность к заболеванию, причем эффект часто специфичен для отдельных популяций (например, этнических групп). К настоящему времени благодаря многолетним исследованиям с помощью традиционного подхода «ген-кандидат» и современного метода широкогеномного поиска ассоциаций (GWAS) удалось выявить более 200 независимых хромосомных локусов ядерного генома, из которых лишь область главного комплекса гистосовместимости класса II на хромосоме 6 сильно влияет на риск РС, а каждый из остальных вносит небольшой вклад в предрасположенность к РС [3]. Однако в совокупности вариативность всех найденных локусов ядерного генома может объяснить лишь около 38% наследуемости РС [4].

Одной из возможных причин этого явления, получившего название «недостающей» наследуемости, может быть неучтенное влияние вариативности митохондриального генома на риск развития полигенного заболевания. В случае РС это предположение хорошо согласуется с известными данными о том, что нарушение функционирования митохондрий служит одним из ключевых факторов, приводящих к нейродегенерации при РС [5]. Как известно, основными отличительными чертами митохондриального генома являются наследование только от матери и отсутствие рекомбинации. Это позволило объединить различные варианты мтДНК в гаплогруппы – группы родственных гаплотипов, присутствующих у людей, которые имеют общего предка по материнской линии, и все унаследовали одну или несколько нуклеотидных замен. Сочетание таких замен специфично для разных гаплогрупп, на практике для отнесения образца к гаплогруппе достаточно и одной специфичной замены [6]. Тип наследования от одного родителя приводит к четырехкратному усилению действия дрейфа генов по сравнению с аутосомными маркерами, в результате в различных популяциях частоты гаплогрупп сильно варьируют.

К настоящему времени проведено около 20 исследований, посвященных анализу ассоциации с РС вариантов митохондриального генома – как индивидуальных полиморфизмов, так и гаплогрупп, причем выборки в ряде случаев относительно невелики (ссылки см. в обзоре [7]). Среди этих работ две выполнены методом GWAS, а остальные – с использовани-

ем подхода «ген-кандидат». Представленные в этих публикациях данные часто противоречивы, что может быть связано с этнической принадлежностью испытуемых. Поэтому актуальной представляется задача проведения исследований ассоциации вариантов митохондриального генома с риском РС на гомогенных по этническому составу выборках.

Целью нашей работы было исследование ассоциации наиболее распространенных в европейских популяциях гаплогрупп H, J, K и U митохондриального генома [8, 9] и входящих в их состав дискриминирующих полиморфизмов в генах *MT-RNR2*, *COX1*, *ATP6*, *MT-ND3* и *MT-TL2* [10] с риском развития РС у этнических русских. Принимая во внимание взаимодействие продуктов митохондриальных и ядерных генов, мы провели также мультилокусный анализ ассоциации с РС сочетаний гаплогрупп мтДНК и полиморфных вариантов ряда ядерных генов, частоты которых в использованной выборке были определены ранее, и исследовали характер этого эффекта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование было включено 283 неродственных больных РС, среди них 198 женщин и 85 мужчин, у которых согласно международным критериям Макдональда [11] диагностировали ремиттирующую форму РС. Средний возраст больных РС на момент взятия крови составил 38.0 ± 10.5 лет, средний возраст дебюта заболевания – 28.0 ± 9.1 лет. Все больные проходили лечение в Московском центре рассеянного склероза или Московском межокружном отделении рассеянного склероза при ГБУЗ «ГКБ № 24 ДЗМ». В контрольную группу, сопоставимую с группой больных по гендерному составу (197 женщин и 93 мужчины) и возрасту (средний возраст 40.9 ± 12.9 лет), вошли неродственные здоровые индивиды. Все включенные в исследование индивиды были этническими русскими (по данным анкетирования все члены семьи в двух поколениях были русскими) и проживали в европейской части России. От всех индивидов получено информированное согласие на проведение исследования. Проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ.

Геномное типирование

Суммарную ДНК выделяли из образцов крови с использованием коммерческих наборов (QIAamp DNA BloodMidiKit).

Геномное типирование однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) *m.1719G > A*, *m.7028C > T*, *m.9055G > A*, *m.10398A > G*, *m.12308A > G* мтДНК (табл. 1) проводили методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для SNP

Таблица 1. Полиморфизмы митохондриального генома, анализированные в настоящем исследовании и использованные для определения принадлежности индивидов к гаплогруппам H, J, K и U

SNP	rs ID	Ген	Продукт гена	Принадлежность к гаплогруппам (аллель)
m.1719G > A	rs3928305	MT-RNR2	16S рибосомная РНК	I, N1, X2 (1719A)
m.7028C > T	rs2015062	COX1	Субъединица 1 цитохром-с-оксидазы (комплекс IV ЭТЦ)	H (7028C)
m.9055G > A	rs193303045	ATP6	Субъединица 6 АТФ-синтазы	K (9055A)
m.10398A > G	rs2853826	MT-ND3	Субъединица 4 NADH-дегидрогеназы (комплекс I ЭТЦ)	K, J, I (10398G)
m.12308A > G	rs2853498	MT-TL2	Лейцин-специфичная тРНК	U, K (12308G)

m.7028C > T, m.10398A > G и m.12308A > G проводили анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) в соответствии с методикой, описанной в [10], за тем исключением, что рестриктаза DdeI была заменена на ее изоизомер – BstDEI. Типирование полиморфизма m.9055G > A осуществляли методом ПЦР-ПДРФ с использованием праймеров 5'-ТТААГГСГАСГАТТТСТ-3' и 5'-ТАСТГСАГГССАСТАТСА-3' и эндонуклеазы рестрикции AspLEI. Полиморфизм m.1719G > A типировали методом ПЦР в режиме реального времени. Амплификацию исследуемого участка осуществляли с помощью праймеров 5'-ГСТАААСТАГСССАААСС-3' и 5'-ГСГССАГГТТТСААТТТСТА-3'. Анализ SNP проводили с помощью зондов, специфичных к аллелям А (5' НЕХ-ССТТАСТАССАГАСА-АСТТААССААСС-3'ВНQ1) и G (5' FАМ-ССТТАСТАССАГАСААССТТАГССАААСС-3'ВНQ1).

Принадлежность к гаплогруппам митохондриального генома H, J, K и U определяли по сочетанию маркерных SNP, представленных в табл. 1, согласно [10]. Гаплогруппу H определяли как протяженный гаплотип G1719, C7028, G9055, A10398, A12308; гаплогруппу J – как гаплотип G1719, T7028, G9055, G10398, A12308; гаплогруппу K – как гаплотип G1719, T7028, A9055, G10398, G12308 и гаплогруппу U – как гаплотип G1719, T7028, G9055, A10398, G12308.

Статистический анализ

Поиск ассоциаций с РС отдельных SNP митохондриального генома, митохондриальных гаплогрупп и сочетаний гаплогрупп с носительством аллелей/генотипов ряда генов ядерного генома, определенных ранее (неопубликованные данные), проводили с помощью программного обеспечения APSampler [12], использующего метод Монте-Карло Марковскими цепями и Байесовскую непараметрическую статистику [13]. Уровень значимости найденных ассоци-

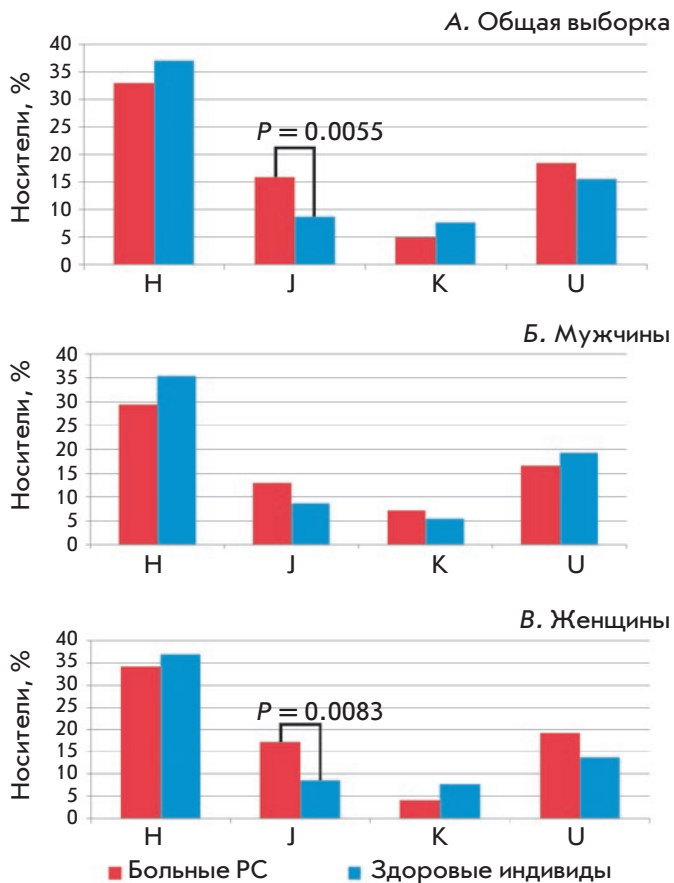
аций оценивали программными средствами для валидации, входящими в программу APSampler, на основании точного критерия Фишера, оценки соответствующего отношения шансов (ОШ) и его 95% доверительного интервала (ДИ). Значимыми считали ассоциации, для которых значение P было менее 0.05 при условии, что значения 95% ДИ для ОШ не пересекают 1.

Возможное нелинейное взаимодействие (эпистаз) между аллелями в найденных биаллельных сочетаниях выявляли с использованием подхода, предложенного ранее [14]. В его основе лежит оценка характера взаимодействия между аллелями (или генотипами) двух локусов при их совместном носительстве с помощью двух ранее описанных статистических критериев: по значению P_{FLINT} в точном трехфакторном тесте, подобном точному критерию Фишера (the exact three-way Fisher-like interaction numeric test, FLINT) [15], и исходя из значений фактора синергии (synergy factor, SF) и его 95% ДИ [16]. Значения P_{FLINT} , SF и его 95% ДИ оценивали с помощью программных средств, входящих в программу APSampler. Взаимодействие между аллелями в сочетании оценивали как эпистатическое, если величина P_{FLINT} была менее 0.05, а значение 95% ДИ для SF не пересекало 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У больных РС и индивидов контрольной группы, русских по этнической принадлежности, проведен анализ частот вариантов митохондриального генома m.1719G > A, m.7028C > T, m.9055G > A, m.10398A > G, m.12308A > G. Не выявлено значимых различий в частотах этих SNP ни при сравнении совокупных выборок больных РС и индивидов контрольной группы, ни при сравнении больных и здоровых мужчин и женщин порознь (данные не представлены).

Принадлежность к гаплогруппам митохондриального генома H, J, K и U определяли на основа-



Частоты гаплогрупп H, J, K и U у больных РС и здоровых индивидов. А – общая выборка (283 больных РС, 290 здоровых индивидов); Б – мужчины (85 больных РС, 93 здоровых индивидов); В – женщины (198 больных РС, 197 здоровых индивидов)

нии результатов генотипирования перечисленных маркерных SNP исходя из их сочетаний. Частота гаплогруппы J у больных РС (15.9%) почти в 2 раза превышает частоту этой гаплогруппы у индивидов контрольной группы (8.6%) и значимо ассоциирована с риском развития РС ($P = 0.0055$; ОШ = 2.00 [95% ДИ 1.21–3.41]). Ассоциации гаплогрупп H, K, U с РС не выявлено (рис. А).

В связи с тем, что РС значительно чаще встречается у женщин, чем у мужчин, и имеют место гендерные различия в генетических факторах риска заболевания [17], анализ ассоциации гаплогрупп H, J, K, U с РС проводили также отдельно для мужчин и женщин. У мужчин не выявлено значимых ассоциаций ни одной из исследуемых гаплогрупп (рис. Б). В то же время у женщин, как и в общей выборке, выявлена ассоциация с РС гаплогруппы J: ($P = 0.0083$; ОШ = 2.20 [95% ДИ 1.19–4.03]) (рис. В).

Современные данные свидетельствуют о том, что функционирование митохондрий меняется при хроническом нейровоспалении, характерном для РС [7]. Для оценки возможного взаимодействия генов митохондриального и ядерного геномов с использованием программы APSampler мы провели мультилокусный анализ ассоциации с РС носительства сочетаний каждой из исследованных гаплогрупп мтДНК с полиморфными вариантами 37 ядерных генов, вовлеченных в функционирование иммунной системы.

Среди них ген главного комплекса гистосовместимости HLA-DRB1, «главный» ген предрасположенности к РС, а также гены CD58, VCAM1, EVI5, EOMES, CD86, IL7RA, TCF7, IL22RA2, IRF5, PVT1, IL2RA, CD6, CXCR5, TNFRSF1A, CLEC16A, IRF8, STAT3, TYK2, TNFSF14 и CD4, ассоциация которых с РС показана методом GWAS. Для этих генов выполнялись следующие условия: ассоциация каждого из них с РС наблюдалась не менее чем в двух независимых GWAS; при этом по меньшей мере в одном исследовании достигнут полногеномный уровень значимости ($P \leq 5 \times 10^{-8}$), а в другом/других значение P было не более 1×10^{-5} [18]. Особый интерес для нас представлял ген CLEC16A, который находится в относительно богатой генами области хромосомы 16, содержащей три блока сцепления. Эта область включает в себя также ген SOCS1, один из важнейших регуляторов экспрессии цитокинов [19], поэтому мы включили в анализ два полиморфных участка, расположенных в прилегающей к нему межгенной области хромосомы, – CLEC16A-SOCS1 (rs1640923) и SOCS1-TNP2 (rs243324). Продукты остальных включенных в исследование генов участвуют в процессе воспаления и/или же описаны как ассоциированные с различными аутоиммунными заболеваниями, в том числе и с РС. Среди них гены, кодирующие компоненты цитокин-хемокиновой сети – IL4, IL6, IL17A, IFNB1, IFNG, TNF, TGFB1, CCL5, IFNAR, IFNAR2, CCR5, а также гены, продукты которых участвуют в регуляции активности Т-лимфоцитов, а именно: ген костимулирующей молекулы CTLA4 и ген субъединицы иммунопротеасомы PSMB9, необходимой для процессинга пептидов перед их презентацией в составе МНС класса I. Ген глипикана 5 (GPC5) включен в исследование, поскольку известно, что полиморфизмы в его составе ассоциированы с характером ответа больных РС на терапию иммуномодулирующим препаратом – интерфероном бета [20]. У всех исследуемых полиморфных участков частота минорного аллеля была не менее 0.05. Частоты носительства аллелей и генотипов ядерных генов в исследуемой выборке были определены нами ранее.

Таблица 2. Ассоциация с РС сочетаний гаплогруппы J митохондриального генома с носительством аллелей/генотипов генов ядерного генома (по результатам мультилокусного анализа)

Гаплогруппа, аллель или генотип	Число носителей, %		P	ОШ [95% ДИ]
	Больные РС (N = 283)	Здоровые доноры (N = 290)		
Отдельные генетические варианты				
Гаплогруппа J	45 (15.9)	25 (8.6)	0.0055	2.00[1.19–3.37]
<i>CCL5</i> rs2107538*A	110 (38.8)	105 (36.2)	0.44	1.04[0.74–1.46]
<i>PVT1</i> rs2114358*G	169 (59.7)	170 (58.6)	0.43	1.04[0.75–1.46]
<i>TNFSF14</i> rs1077667*C	266 (93.9)	261 (90.0)	0.064	1.72[0.90–3.27]
<i>IL4</i> rs2243250*C	267 (94.3)	264 (91.0)	0.14	1.52[0.79–2.92]
<i>CLEC16A-SOCS1</i> rs1640923*A/A	221 (78.0)	203 (70.0)	0.020	1.51[1.03–2.20]
Сочетания генетических вариантов				
Гаплогруппа J + <i>CCL5</i>*A	21 (7.4)	4 (1.4)	0.00043	5.47[1.85–16.15]
Гаплогруппа J + <i>PVT1</i>*G	35 (12.4)	14 (4.8)	0.00093	2.78[1.46–5.29]
Гаплогруппа J + <i>TNFSF14</i>*C	44 (15.5)	21 (7.2)	0.0013	2.35[1.35–4.07]
Гаплогруппа J + <i>IL4</i>*C	44(15.5)	21 (7.2)	0.0013	2.35[1.35–4.07]
Гаплогруппа J + <i>CLEC16A-SOCS1</i>*A/A	39 (13.7)	17 (5.9)	0.0011	2.56[1.41–4.63]

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые ассоциации.

Сочетания с аллелями ядерного генома, значительно ассоциированные с риском РС, найдены только для гаплогруппы J (табл. 2). В качестве второго компонента в состав этих биаллельных сочетаний входили аллели *CCL5* rs2107538*A, *PVT1* rs2114358*G, *TNFSF14* rs1077667*C и *IL4* rs2243250*C, поодиночке значимо не ассоциированные с РС, и генотип *CLEC16A-SOCS1* rs1640923*A/A, ассоциация которого с РС была значимой ($P = 0.020$ и ОШ = 1.51 [95% ДИ 1.03–2.20]). Все эти сочетания характеризовались высоким уровнем значимости (P в диапазоне от 0.00043 до 0.0011), превышающим по меньшей мере в 5 раз значимость ассоциации с РС одной гаплогруппы J. Параллельно наблюдали возрастание величины ОШ; у самого значимого сочетания (гаплогруппа J + *CCL5**A) ОШ было равно 5.47, что без малого в 3 раза превышает значение ОШ, найденное для гаплогруппы J поодиночке.

Возрастание уровня значимости ассоциаций с РС, наблюдаемое при совместном носительстве гаплогруппы J и аллелей (или генотипов) ядерных генов, может происходить вследствие суммирования их взаимно независимых вкладов или же в результате позитивного эпистатического (синергического) взаимодействия между ними. Чтобы оценить, возникают ли такие взаимодействия в случае найденных сочетаний, мы определили значения SF и P_{FLINT} для них. Для сочетания гаплогруппы J с аллелем rs2107538*A гена *CCL5* значение $P_{FLINT} = 0.025$, а фактор синергии SF равен 4.32 [95% ДИ = 1.2–15.6] (табл. 3). Таким

образом, показано, что увеличение риска развития РС, наблюдаемое при носительстве индивидом гаплогруппы J в сочетании с аллелем *CCL5**A, связано с синергическим эпистатическим взаимодействием между этими генетическими вариантами. Сочетание гаплогруппы J с *PVT1**G характеризуется значением SF = 3.05, ДИ при котором не пересекает 1, и по этому критерию оно подпадает под определение эпистатического. Однако значение P_{FLINT} (0.084) не достигло уровня значимости, и мы не можем сделать окончательного вывода, что это сочетание является эпистатическим. Значения SF с 95% ДИ и величины P_{FLINT} , полученные для других сочетаний, оказались незначимыми.

ОБСУЖДЕНИЕ

РС – клинически и генетически гетерогенное заболевание [21]. Поэтому большое значение для достоверности полученных результатов имеют критерии формирования выборки. Можно констатировать, что исследуемая группа пациентов была достаточно репрезентативной. У всех диагностировали наиболее распространенную ремиттирующую форму РС, для которой характерны чередования обострений и ремиссий. Соотношение больных женщин и мужчин и средний возраст дебюта РС были близки к описанному [22]. Соотношение полов и возраст индивидов в контрольной группе не отличались существенно от таковых в группе больных. Частоты гаплогрупп митохондриального генома в контрольной группе

Таблица 3. Анализ характера взаимодействий между компонентами сочетаний: носительством гаплогруппы J митохондриального генома и аллелей/генотипов генов ядерного генома

Сочетание генетических вариантов	P_{FLINT}	SF [95% ДИ]
Гаплогруппа J + <i>CCL5</i> *A	0.025	4.32[1.20–15.60]
Гаплогруппа J + <i>PVT1</i> *G	0.084	3.05[1.00–9.31]
Гаплогруппа J + <i>TNFSF14</i> *C	0.31	4.25[0.38–47.60]
Гаплогруппа J + <i>IL4</i> *C	0.14	6.85[0.65–72.30]
Гаплогруппа J + <i>CLEC16A-SOCS1</i> *A/A	0.34	2.24[0.63–7.97]

Примечание. Жирным шрифтом выделены значимые критерии.

были близки к частотам, определенным ранее для европейской части России [8, 9].

В нашей работе впервые проведен анализ ассоциации SNP митохондриального генома (m.1719G > A, m.7028C > T, m.9055G > A, m.10398A > G, m.12308A > G) и гаплогрупп мтДНК (H, J, K, U) с РС у этнических русских. Из исследованных нами SNP анализировали ассоциацию SNP m.1719G > A, m.10398A > G и m.9055G > A с РС в трех европейских популяциях (испанцы, норвежцы, немцы); ни в одной из них не наблюдали значимой ассоциации с РС [23], что согласуется с нашими результатами. Однако SNP m.9055G>A (гаплогруппа K) показал значимую ассоциацию с заболеванием у белых американцев [24], что, возможно, отражает их генетические отличия от европейцев.

Обнаруженная в нашей работе значимая ассоциация гаплогруппы J с РС ранее была выявлена у некоторых европейских этносов [23, 25–27] (но не у всех исследованных), а также у американцев европейского происхождения [28] и у персов из Ирана [29]. Таким образом, мы реплицировали у этнических русских данные об ассоциации гаплогруппы J с риском развития РС, полученные ранее. При стратификации нашей выборки по полу ассоциация гаплогруппы J с РС оставалась значимой у женщин, но не у мужчин, однако уровень значимости ассоциации у женщин был ниже, чем в выборке, не разделенной по гендерному признаку. Возможно, эти результаты объясняются недостаточной численностью подгруппы мужчин. Опубликованные ранее данные о связи гаплогруппы K с РС в американской [24] и персидской популяции [30] в нашей работе на русской популяции воспроизведены не были.

Повышение риска развития РС у носителей гаплогруппы J, вероятно, связано с ее особым влия-

нием на функционирование митохондрий и клеток в целом. Действительно, в исследованиях, выполненных с использованием «цибридов» – клеток, имеющих идентичный ядерный геном, но разные митохондрии, установлено, что именно носительство гаплогруппы J приводит к значимым изменениям в клетках. Так, показано [31], что глобальный уровень метилирования ДНК в клетках периферической крови носителей гаплогруппы J выше, чем у носителей других гаплогрупп; выше он также и в цибридах, содержащих этот вариант мтДНК (J-цибриды), по сравнению с другими цибридами. При этом концентрация АТФ и продукция свободных радикалов в J-цибридах были снижены [31]. Показано, что полиморфизм m.295C > T контрольного региона мтДНК (один из SNP, определяющих гаплогруппу J) влияет на процессы транскрипции и репликации мтДНК, в частности, при носительстве аллеля T усиливается связывание с мтДНК митохондриального фактора транскрипции А (TFAM), а также вдвое увеличивается содержание мтДНК в J-цибридах в сравнении с H-цибридами [32]. К сожалению, авторы работы не приводят данных микроскопического исследования клеток, в связи с чем неясно, каким из ранее описанных феноменов определяется увеличение количества мтДНК: возрастанием числа митохондрий или же увеличением числа копий мтДНК в отдельных митохондриях. Однако можно предположить, что увеличение содержания мтДНК у носителей гаплогруппы J является компенсаторной реакцией на снижение продукции АТФ. Одна из ключевых особенностей РС – увеличение энергозатрат на поддержание структурной целостности и функционирования аксонов в участках демиелинизации, которое на начальных этапах заболевания может компенсироваться увеличением количества митохондрий и размеров стационарных митохондрий, а также повышением скорости аксонального транспорта митохондрий [33]. Можно предположить, что носитель гаплогруппы J использовал компенсаторный резерв нейронов еще до манифестации заболевания.

С помощью мультилокусного анализа нами показано вовлечение в развитие РС ряда сочетаний гаплогруппы J с отдельными, поодиночке не ассоциированными с РС, аллелями генов *CCL5*, *PVT1*, *TNFSF14* и *IL4*; эти сочетания характеризуются большей значимостью ассоциации с заболеванием, чем одна гаплогруппа J. Независимо от того, возникает ли наблюдаемый кумулятивный эффект при суммировании независимых вкладов двух компонентов каждого из сочетаний или же вследствие эпистатических взаимодействий между ними [34], полученные результаты позволяют предположить, что выявленные только в составе сочетаний с гаплогруппой

J ядерные гены вовлекаются в формирование предрасположенности к РС.

Вошедшие в сочетания с гаплогруппой J белок-кодирующие гены *CCL5*, *TNFSF14* и *IL4* объединяет сходная роль их продуктов, которые участвуют в функционировании цитокиновой-хемокиновой сети. *CCL5* – хемокин, действующий как хемоаттрактант моноцитов, Т-клеток памяти и эозинофилов. Повышение концентрации *CCL5* в цереброспинальной жидкости может служить одним из маркеров активного течения РС [35]. Провоспалительный цитокин *TNFSF14* – четырнадцатый член суперсемейства факторов некроза опухоли – может функционировать как костимулятор при активации лимфатических клеток, стимулировать пролиферацию Т-клеток и вызывать апоптоз некоторых типов опухолевых клеток. *IL4* – один из ключевых цитокинов, регулирующих дифференцировку наивных (Th0) Т-хелперов в Th2-клетки, а В-клеток – в плазматические клетки. Мультилокусный анализ вариантов митохондриального и ядерного геномов позволил нам реплицировать у этнических русских ранее полученные для других популяций данные об ассоциации rs2107538 в гене *CCL5* [36], rs1077667 в гене *TNFSF14* [37] и rs2243250 в гене *IL4* [38, 39] с риском развития РС.

Еще один ген, выявленный нами в составе ассоциированного с РС сочетания с гаплогруппой J, *PVT1*, кодирует длинную некодирующую РНК, возможно, вовлеченную в регуляцию клеточного цикла [40], и содержит кластер из шести генов микроРНК [41]. Включенный в наше исследование SNP rs2114358 находится в интроне 5 гена *PVT1*, в котором локализуется ген *MIR1206*, и, как показано *in silico*, влияет на структуру зрелой miR-1206 [42]. Методом GWAS показана ассоциация с РС другого полиморфизма в гене *PVT1* – rs4410871 [37], который, как и rs2114358, входит в состав гена

микроРНК (*MIR1204*, локализованный в интроне 1 гена *PVT1*).

Нами установлен факт синергического взаимодействия между носительством гаплогруппы J и аллеля rs2107538*А гена *CCL5*. Выяснить молекулярный механизм этого взаимодействия – задача на будущее, однако известно, что хемокин *CCL5* играет существенную роль в метаболизме глутаминовой кислоты в центральной нервной системе, модулируя глутаматергическую передачу сигнала [43], а синтез глутамата осуществляется при непосредственном участии митохондриальных ферментов [44]. Более того, установлено, что гомеостаз глутамата нарушается в местах повреждения при РС [45], причем развивающаяся при этом глутаматная эксайтотоксичность является одним из механизмов повреждения нейронов [46]. Эти процессы могут лежать в основе наблюдаемого нами синергического влияния сочетания гаплогруппы J и аллеля *CCL5**А на развитие РС. Выявленное в нашей работе другое ассоциированное с риском РС биаллельное сочетание, включающее гаплогруппу J и аллель rs2114358*G гена *PVT1*, отвечало только одному из двух использованных нами критериев нелинейности взаимодействия между генетическими вариантами. Хотелось бы предположить, что расширение размеров выборки позволит доказать синергическую природу этого сочетания.

Таким образом, получены данные, свидетельствующие об эпистатическом взаимодействии гаплогруппы J с геном *CCL5* и, возможно, еще и с геном *PVT1*. Тем самым впервые показано взаимодействие компонентов ядерного и митохондриального геномов при формировании риска развития РС. Полученные результаты безусловно нуждаются в воспроизведении на независимой выборке. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 17-04-01293).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Karussis D. // *J. Autoimmun.* 2014. V. 48–49. P. 134–142.
2. Oksenberg J.R. // *Expert Rev. Neurother.* 2013. V. 13. № 12. P. 11–19.
3. Baranzini S.E., Oksenberg J.R. // *Trends Genet.* 2017. V. 33. № 12. P. 960–970.
4. Patsopoulos N.A., Baranzini S.E., Santaniello A., Shoostari P., Cotsapas C., Wong G., Beecham A.H., James T., Replogle J., Vlachos I., et al. // *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/143933>.
5. Campbell G., Mahad D.J. // *FEBS Lett.* 2018. V. 592. № 7. P. 1113–1121.
6. Pakendorf B., Stoneking M. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2005. V. 6. № 1. P. 165–183.
7. Козин М.С., Кулакова О.Г., Фаворова О.О. // *Биохимия*. 2018. Т. 83. № 7. С. 1002–1021.
8. www.mitomap.org
9. Балановский О.П. Изменчивость генофонда в пространстве и времени: синтез данных геногеографии митохондриальной ДНК и Y-хромосомы. М.: ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, 2012.
10. Terrazzino S., Deantonio L., Cargnini S., Donis L., Pisani C., Masini L., Gambaro G., Canonico P.L., Genazzani A.A., Krengli M. // *Clin. Oncol.* 2016. V. 28. № 6. P. 365–372.
11. Polman C.H., Reingold S.C., Banwell B., Clanet M., Cohen J.A., Filippi M., Fujihara K., Havrdova E., Hutchinson M., Kappos L., et al. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. № 2. P. 292–302.
12. <http://apsampler.sourceforge.net>
13. Favorov A.V., Andreevski T.V., Sudomoina M.A., Favorova O.O., Parmigiani G., Ochs M.F. // *Genetics.* 2005. V. 171. № 4. P. 2113–2121.
14. Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V., Matveeva N.A., Shakhnovich R.M., Sukhinina T.S., Kukava N.G., Ruda M.Y.,

- Karamova I.M., Nasibullin T.R., et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. P. 1–16.
15. White D.R., Pesner R., Reitz K.P. // *Cross-Cultural Res.* 1983. V. 18. № 2. P. 103–122.
16. Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. // *BMC Res. Notes*. 2009. V. 2. P. 1–7.
17. Bashinskaya V.V., Kulakova O.G., Kiselev I.S., Baulina N.M., Favorov A.V., Boyko A.N., Tsareva E.Y., Favorova O.O. // *J. Neuroimmunol.* 2015. V. 282. P. 85–91.
18. Bashinskaya V.V., Kulakova O.G., Boyko A.N., Favorov A.V., Favorova O.O. // *Hum. Genet.* 2015. V. 134. № 11–12. P. 1143–1162.
19. Zuvich R.L., Bush W.S., McCauley J.L., Beecham A.H., De Jager P.L., Ivinson A.J., Compston A., Hafler D.A., Hauser S.L., Sawcer S.J., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2011. V. 20. № 17. P. 3517–3524.
20. Cénit M.D., Blanco-Kelly F., de las Heras V., Bartolomé M., de la Concha E.G., Urcelay E., Arroyo R., Martínez A. // *Mult. Scler.* 2009. V. 15. № 8. P. 913–917.
21. Гусев Е.И., Завалишин И.А., Бойко А.Н. Рассеянный склероз и другие демиелинизирующие заболевания. М.: Миклош, 2004. 540 с.
22. Kaminsky Z., Wang S.C., Petronis A. // *Ann. Med.* 2006. V. 38. № 8. P. 530–544.
23. Yu X., Koczan D., Sulonen A.M., Akkad D.A., Kroner A., Comabella M., Costa G., Corongiu D., Goertsches R., Caminata T.M., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 2. P. 1–7.
24. Vyshkina T., Sylvester A., Sadiq S., Bonilla E., Canter J.A., Perl A., Kalman B., Avenue I. // *Clin. Immunol.* 2009. V. 129. № 1. P. 31–35.
25. Tranah G.J., Santaniello A., Caillier S.J., Alfonso S.D., Hauser S.L., Oksenberg J.R. // *Neurology*. 2015. P. 325–330.
26. Mihailova S.M., Ivanova M.I., Quin L.M., Naumova E.J. // *Eur. J. Neurol.* 2007. V. 14. № 1. P. 44–47.
27. Otaegui D., Sáenz A., Martínez-Zabaleta M., Villoslada P., Fernández-Manchola I., Álvarez de Arcaya A., Emparanza J.I., López de Munain A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 5. P. 532–535.
28. Kalman B., Li S., Chatterjee D., O'Connor J., Voehl M.R., Brown M.D., Alder H. // *Acta Neurol. Scand.* 1999. V. 99. № 1. P. 16–25.
29. Houshmand M., Sanati M.H., Babrzadeh F., Ardalan A., Teimori M., Vakilian M., Akuchekian M., Farhud D., Lotfi J. // *Mult. Scler.* 2005. V. 11. № 6. P. 728–730.
30. Hassani-Kumleh H., Houshmand M., Panahi M.S.S., Riazi G.H., Sanati M.H., Gharagozli K., Ghabaee M. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006. V. 26. № 2. P. 119–125.
31. Bellizzi D., D'Aquila P., Giordano M., Passarino A.M. G. // *Epigenomics*. 2012. V. 4. № 1. P. 17–27.
32. Suissa S., Wang Z., Poole J., Wittkopp S., Feder J., Shutt T.E., Wallace D.C., Shadel G.S., Mishmar D. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 5. e1000474.
33. Kiryu-Seo S., Ohno N., Kidd G.J., Komuro H., Trapp B.D. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 19. P. 6658–6666.
34. Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. // *Acta Naturae*. 2012. T. 4. № 3. C. 62–75.
35. Tomioka R., Matsui M. // *Intern. Med.* 2014. V. 53. № 5. P. 361–365.
36. Gade-Andavolu R., Comings D.E., MacMurray J., Vuthoori R.K., Tourtellotte W.W., Nagra R.M., Cone L.A. // *Mult. Scler.* 2004. V. 10. № 5. P. 536–539.
37. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Beecham A.H., Patsopoulos N.A., Xifara D.K., Davis M.F., Kempainen A., Cotsapas C., Shah T.S., Spencer C., Booth D., Goris A., Oturai A., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 11. P. 1353–1360.
38. Akkad D.A., Arning L., Ibrahim S.M., Epplen J.T. // *Genes Immun.* 2007. V. 8. № 8. P. 703–706.
39. Zhang Z., Wang L., Sun X., Zhang L., Lu L. // *J. Neurol. Sci.* 2016. V. 363. P. 107–113.
40. Colombo T., Farina L., Macino G., Paci P. // *Biomed Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 17–21.
41. Huppi K., Pitt J.J., Wahlberg B.M., Caplen N.J. // *Front. Genet.* 2012. V. 3. № APR. P. 1–11.
42. Martin-Guerrero I., Gutierrez-Camino A., Lopez-Lopez E., Bilbao-Aldaiturriaga N., Pombar-Gomez M., Ardanaz M., Garcia-Orad A. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. P. 2–13.
43. Pittaluga A. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. № SEP. P. 1–13.
44. Miller K.E., Hoffman E.M., Sutharshan M., Schechter R. // *Pharmacol Ther.* 2011. V. 130. № 3. P. 283–309.
45. Werner P., Pitt D., Raine C.S. // *Ann. Neurol.* 2001. V. 50. № 2. P. 169–180.
46. Kostic M., Zivkovic N., Stojanovic I. // *Rev. Neurosci.* 2013. V. 24. № 1. P. 71–88.

УДК 577.29

Механизм тушения флуоресценции белковых фотосенсибилизаторов на основе miniSOG в процессе интернализации рецептора HER2

Е. О. Кузичкина*, О. Н. Шилова, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: kuzichkinazhenya@mail.ru

Поступила в редакцию 04.08.2018

Принята к печати 04.10.2018

РЕФЕРАТ Белковый фотосенсибилизатор miniSOG является перспективным агентом для фотодинамической терапии. Генетически кодируемые фототоксины 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG способны специфически связываться с онкомаркером HER2, который сверхэкспрессируется на поверхности раковых клеток, а также способствовать его интернализации. Установлено, что попадание белков в комплексе с этим рецептором в эндосомы приводит к падению флуоресцентного сигнала фототоксического модуля. С целью выяснения механизма угасания флуоресценции проанализировано влияние таких факторов, как низкие значения pH, протеолиз, восстановление кофактора и др. Обнаружено, что значимый вклад в изменение флуоресцентных свойств вносит экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки, в том числе цитохромом c.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресные белковые фотосенсибилизаторы, интернализация, miniSOG, рецептор HER2, флуоресценция.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антитела; DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); FITC – флуоресцеинизотиоцианат; FMN – флавиномононуклеотид; IPTG – изопропил-β-D-тиогактопиранозид; ПААГ – полиакриламидный гель; PBS – фосфатно-солевой буфер; GSH – глутатион.

ВВЕДЕНИЕ

Направленная доставка противораковых агентов для фотодинамической терапии приобретает все большее значение в современной тераностике. Этот подход позволяет повысить селективное накопление фотосенсибилизатора в опухоли и обеспечить его доставку в желаемый внутриклеточный компартмент [1, 2]. В качестве нацеливающих фрагментов могут использоваться моноклональные антитела, фрагменты антител и другие белки, селективно связывающиеся с опухолевыми антигенами.

Поверхностный клеточный рецептор HER2/neu, также известный как ErbB2, является значимым опухолевым маркером и наиболее изученной мишенью для разработки новых терапевтических агентов, поскольку он сверхэкспрессируется во многих типах опухолей, в том числе в клетках рака молочной железы человека, и ассоциирован с агрессивным фенотипом [3, 4].

Ранее в лаборатории молекулярной иммунологии ИБХ РАН были получены и охарактеризованы генетически кодируемые адресные фототоксины 4D5scFv-miniSOG [5] и DARPin-miniSOG [6]. В качестве нацеливающих модулей использовали фрагмент моноклонального антитела 4D5scFv и искусственный белок DARPin_9-29, селективно распознающие внеклеточный домен рецептора эпидермального фактора роста человека HER2/neu. В качестве фототоксического модуля в обоих случаях использовали фотоактивируемый флуоресцентный флавопротеин miniSOG [7]. Оба белка показали избирательный фототоксический эффект *in vitro*: для HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 IC₅₀ составила 160 нМ в случае 4D5scFv-miniSOG и 0.8 мМ в случае DARPin-miniSOG. Также оба белка обладали способностью вызывать рецептор-опосредованный эндоцитоз [4–6], однако скорость интернализации DARPin-

miniSOG в комплексе с HER2 оказалась выше, чем у комплекса с 4D5scFv-miniSOG [8]. Поскольку константы диссоциации фототоксинов и рецептора, определенные с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса, имеют сравнимые значения, был сделан вывод о том, что решающее значение для эффективности данных фотосенсибилизаторов имеет скорость интернализации, определяющая время нахождения токсина на мембране.

Быстрая оценка динамики интернализации данных белков стала возможной благодаря тому, что miniSOG обладает собственной флуоресценцией, интенсивность которой падает при попадании фототоксинов в эндосомы. Однако механизм угасания флуоресценции miniSOG при попадании в клетку до сих пор не был установлен, и, исходя из процессов, происходящих в эндосоме, можно сформулировать несколько гипотез, объясняющих данное явление. Подобное угасание флуоресценции некоторых флуорофоров в эндосоме может быть связано с протонированием при понижении pH. Так, флуоресцеинизотиоцианат (FITC) реагирует на изменение кислотности и используется для изучения интернализации клеточных рецепторов [9]. Основой хромофора miniSOG является флавиномононуклеотид (FMN), который также способен подвергаться протонированию, что может служить причиной падения флуоресценции [9, 10]. Флуоресцентные свойства белка miniSOG определяются его кофактором, поэтому протеолиз в эндосоме или лизосоме считается менее вероятной причиной этого явления. Наконец, падение интенсивности флуоресценции фототоксинов может быть следствием экранирования miniSOG и поглощения его флуоресценции хромофорами цитоплазмы.

Данная работа посвящена изучению причин падения интенсивности флуоресценции белковых фототоксинов 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG. Угасание miniSOG в эндосоме делает этот модуль удобным инструментом для изучения динамики интернализации, однако важно понимать причины этого явления, так как флуоресцентные свойства miniSOG неразрывно связаны с его токсическими свойствами, и физико-химические процессы, происходящие с ним в различных компартментах клетки, должны учитываться при разработке систем доставки фототоксина к терапевтическим мишеням.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и условия культивирования

Клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующие поверхностный рецептор HER2, и клетки яичников китайского хомячка CHO (Chinese hamster ovary) культивировали

в среде McCoy's 5A (Life Technologies, США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка (FBS) (HyClone, Бельгия) и 2 mM L-глутамин («ПанЭко», Россия) в атмосфере 5% CO₂ при 37°C.

Получение рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG

Белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG нарабатывали в бактериях *Escherichia coli* штамм BL21(DE3). Клетки трансформировали плазмидой pET22b, содержащей ген соответствующего белка. Трансформированные бактерии растили в жидкой питательной среде LB (1% триптона, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% NaCl) до достижения оптической плотности OD₆₀₀ = 0.5. Экспрессию индуцировали 1 mM изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (IPTG, Merck, Германия), после чего биомассу растили при 25°C в течение 24 ч. Полученную биомассу осаждали центрифугированием (10000g, при 4°C) в течение 10 мин, ресуспендировали в 60 мл 20 mM фосфатного буфера (3.2 mM NaH₂PO₄, 16.8 mM Na₂HPO₄, 0.3 M NaCl, pH 7.5) и лизировали при помощи ультразвука на дезинтеграторе VCX120 (Sonic and Materials Inc., США) в импульсном режиме (30 с – импульс, 30 с – охлаждение, амплитуда – 70%) в течение 5 мин. Для разделения растворимой и нерастворимой фракций лизат центрифугировали (50000g, при 10°C) в течение 30 мин, осадок отделяли от супернатанта, из которого выделяли целевые белки.

Из растворимой фракции белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG выделяли с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF 1 мл (GE Healthcare, США), содержащей Ni²⁺-NTA-сефарозу. Элюцию белков проводили ступенчатым изменением концентрации имидазола от 15 до 500 mM в 20 mM фосфатном буфере (pH 7.5) с рабочей скоростью 0.5 мл/мин с использованием УФ-ячейки (RD2:250-280, Reach Devices, США), детектирующей светопоглощение при 260 и 280 нм. После хроматографии белковые фракции анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. Концентрацию целевых белков определяли биуретовой реакцией в присутствии бицинониновой кислоты при помощи набора Pierce BSA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя.

Подтверждение специфичности связывания 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2

Присутствие рецептора HER2 на клетках и специфичность связывания с ним белков 4D5scFv-

miniSOG и DARPin-miniSOG анализировали с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) со следующими параметрами: мощность лазера 20 мВт, длина волны 488 нм, фильтры 533/30 BP (FL1-канал) для детекции флуоресценции белков и 585/40 BP (FL3-канал) для детекции флуоресценции йодида пропидия. Данные анализировали с использованием программного обеспечения BD Accuri C6 Software и обрабатывали в программе FlowJo. В эксперименте использовали HER2-положительные клетки SK-BR-3 и HER2-отрицательные клетки CHO. На каждую пробу брали ~ 10⁵ клеток, инкубировали их с белками 4D5scFv-miniSOG, DARPin-miniSOG, 4D5scFv, конъюгированным с FITC (4D5scFv-FITC), или бета-лактоглобулином, конъюгированным с FITC (β -LG-FITC) (все белки в концентрации 2 мкМ) в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина («Диаэм», Россия), в течение 15 мин в темноте на льду. После окрашивания клеточную суспензию дважды отмывали в PBS, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. Для исключения из анализа мертвых клеток перед измерением пробу в течение 5 мин инкубировали с йодистым пропидием в концентрации 2.5 мкг/мл. При измерении флуоресценции выделяли популяции одиночных клеток по параметрам светорассеяния (FSC-H/FSC-A), затем среди них выбирали для анализа живые клетки, не окрашенные йодидом пропидия. Для каждого образца собирали не менее 10⁴ событий.

Изучение скорости интернализации DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG

Для оценки скорости рецептор-опосредованной интернализации использовали клетки SK-BR-3, окрашенные DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG. Флуоресценцию образцов измеряли с помощью проточного цитометра BD Accuri C6 (Becton Dickinson, США) как описано выше. Выделяли две группы образцов: первую группу после окрашивания инкубировали при температуре 4°C (условия, при которых отсутствует рецептор-опосредованная интернализация), вторую – при 37°C. Показания снимали в нескольких временных точках: 5, 10, 30 и 60 мин. Для каждого образца собирали не менее 10⁴ событий.

Изучение механизма угасания фототоксинов на основе miniSOG в эндосоме

Влияние pH и воздействия протеаз на DARPin-miniSOG, 4D5scFv-miniSOG и FMN оценивали, измеряя интенсивность флуоресценции, возбуждаемой светом с длиной волны 488 нм и детектируемой при 535 нм, на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария). Белки в концен-

трации 35 мкМ инкубировали при температуре 37°C в буфере (100 мМ Трис-HCl), доведенном до нужного значения pH, а также с протеолитическими ферментами в концентрации 40 мкМ (трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин (Sigma, США)) и восстановителями (дитиотреитол, глутатион (восстановленная форма), аскорбиновая кислота, NADH, NaBH₄ (Sigma, США)) в концентрации 10 мМ. Показания снимали сразу после добавления белка и через 1 и 2 ч инкубации.

Для оценки влияния присутствия других хромофоров на интенсивность флуоресценции FMN, DARPin-miniSOG в сравнении с DARPin-FITC использовали краситель трипановый синий («ПанЭко», Россия) в концентрации 0.1% и цитохром c в концентрации 300 мкМ (Sigma, США). Интенсивность флуоресценции образцов измеряли на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария), флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 488 нм и детектировали в диапазоне длин волн 525–545 нм. Показания снимали сразу после добавления хромофоров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективной работы противоопухолевого агента в фотодинамической терапии важно обеспечить его селективную доставку к мишени. Так, в нашем случае для доставки цитотоксического модуля miniSOG использовали две адресные молекулы: белок неиммуноглобулиновой природы (DARPin₉₋₂₉) и одноцепочечный варибельный фрагмент (scFv) антитела 4D5, нацеленные на поверхностный рецептор HER2. Фототоксический модуль miniSOG является флавопротеином, способным за счет связанного FMN под действием синего света генерировать активные формы кислорода. Для получения рекомбинантных белков клетки *E. coli* BL21(DE3) трансформировали соответствующими плазмидами pET22b-4D5scFv-miniSOG и pDARPin-miniSOG. Из растворимой фракции белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG выделяли с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии на основе Ni²⁺-NTA с элюцией растворами имидазола. Для подтверждения активности полученных белковых фотосенсибилизаторов методом проточной цитофлуориметрии оценивали специфичность связывания гибридных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG с рецептором HER2/neu на поверхности клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, сверхэкспрессирующей HER2/neu. Это позволило проверить как селективность связывания адресного модуля DARPin с рецептором, так и функциональность флавопротеина, поскольку токсический модуль miniSOG обладает собственными флуоресцентными свойствами, и его связывание с клетками можно детектировать напрямую [11].

Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов \pm ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 \pm 400	3700 \pm 900
+ β -LG-FITC	5700 \pm 600	3300 \pm 400
+ 4D5scFv-FITC	$2.7 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$	3200 \pm 500
+ 4D5scFv-miniSOG	$2.3 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$	4600 \pm 400
+ DARPIn-miniSOG	$1.71 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3000 \pm 400

Наличие на поверхности клеток рецептора HER2/neu было подтверждено их окрашиванием 4D5scFv, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (4D5scFv-FITC). В качестве отрицательного контроля использовали бета-лактоглобулин, конъюгированный с FITC (β -LG-FITC), не связывающийся с HER2 на поверхности клеток. Показано, что HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала после инкубации с белками 4D5scFv-FITC, β -LG-FITC и целевыми белками 4D5scFv-miniSOG, DARPIn-miniSOG (таблица).

Таким образом, показано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPIn-miniSOG высокоспецифично связываются с поверхностным рецептором HER2/neu на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы человека.

Обнаружено, что после связывания белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG с рецептором на поверхности клеток SK-BR-3 при температуре +4°C рецептор-опосредованной интернализации белков не происходит. Однако при +37°C комплекс рецептор-белок подвергается интернализации, о чем свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции Δ MFI (разность между средними значениями флуоресценции окрашенных и неокрашенных клеток) (рис. 1). При этом рекомбинантный белок DARPIn-miniSOG интернализуется в комплексе с рецептором быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, так как Δ MFI для DARPIn-miniSOG снижается вдвое по сравнению с начальной точкой в течение первых 10 мин, в то время как для 4D5scFv-miniSOG это занимает 40 мин. Полученные данные согласуются с опубликованными: 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность по сравнению с DARPIn-miniSOG [5, 6], так как дольше локализован на мембране. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фототоксинов, является некроз, по-

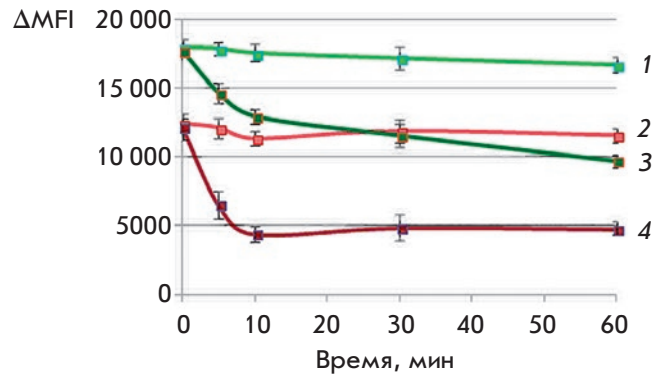


Рис. 1. Изменение интенсивности флуоресценции фототоксичных белков в условиях интернализации в комплексе с HER2 (+37°C) и в условиях, препятствующих интернализации (+4°C). 1 — 4D5scFv-miniSOG, +4°C; 2 — DARPIn-miniSOG, +4°C; 3 — 4D5scFv-miniSOG, +37°C; 4 — DARPIn-miniSOG, +37°C. Δ MFI — разница в интенсивности флуоресценции между окрашенными клетками и неокрашенным образцом, инкубированным в тех же условиях

вреждение мембраны вносит решающий вклад в токсичность адресных белков. Однако падение интенсивности флуоресценции miniSOG может свидетельствовать о реакциях с участием хромофора, что также должно повлиять на его эффективность в качестве фототоксина.

Для того чтобы выяснить причины падения интенсивности флуоресценции и токсичности белков на основе miniSOG при их интернализации, мы оценили воздействие разных факторов на флуоресцентные свойства miniSOG. Было выдвинуто предположение, что угасание флуоресценции DARPIn-miniSOG в процессе интернализации может быть связано с изменением pH среды при попадании комплекса рецептор-белок в эндосомы и лизосомы. На рис. 2 показана зависимость интенсивности флуоресценции белков DARPIn-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG и флавинового кофактора (FMN) от pH раствора при температуре +37°C. Достоверное и значительное снижение флуоресцентного сигнала (более чем в 2 раза) наблюдалось при pH 3 и менее существенное при pH 4. В то же время известно [12], что в эндосомах и лизосомах минимальное значение pH составляет 4.8, поэтому тушение флуоресценции miniSOG при его интернализации не может объясняться реакцией на закисление среды эндосом. Кроме того, изменение температуры в диапазоне от +4°C до +37°C не является причиной падения интенсивности флуоресценции FMN и DARPIn-miniSOG.

Для проверки гипотезы о возможном влиянии протеолиза в эндосоме на интенсивность флуоресценции DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG были созданы искусственные условия протеолиза такими ферментами, как трипсин, папаин, химотрипсин, подобный эндосомному катепсину G [13], и пепсин, соответствующий по активности катепсинам D и E лизосом [14], при оптимальных для них значениях pH. FMN использовали в качестве контроля. Значительное падение интенсивности сигнала флуоресценции FMN, DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG наблюдалось только при обработке целевых белков пепсином (рис. 3). Однако, основываясь на приведенных выше данных (рис. 2), можно сделать вывод о том, что причиной тушения флуоресценции является низкое значение pH. Эта гипотеза подтверждается и тем, что падение флуоресценции произошло и в реакционной смеси, содержащей вместо белковых фототоксинов FMN, не чувствительный к протеолизу. При этом обработка другими протеазами не привела к снижению флуоресцентного сигнала в 2 или более раз, что наблюдалось при интернализации (рис. 1). Расщепление DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG в экспериментальных условиях подтверждено при помощи электрофореза в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по методу Лэммли: через 1 ч инкубации наблюдалось полное расщепление белковых фототоксинов.

Еще одной причиной падения интенсивности флуоресценции miniSOG при рецептор-опосредованной интернализации могло быть восстановление кофактора (флавинонуклеотида) реакционно-способными молекулами клетки. Известно, что интенсивность флуоресценции FMN падает при его восстановлении [15], и, если при наработке miniSOG в бактериях в белок включается заметная доля окисленной формы кофактора или он легко окисляется при хранении, то восстановление может объяснять угасание флуорофора в клетке. Изучено воздействие на DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG следующих восстановителей: дитиотреитола, глутатиона (восстановленная форма, GSH), аскорбиновой кислоты, NADH, борогидрида натрия (NaBH_4) (рис. 4A,Б) и FMN в отсутствие белковой составляющей (рис. 4B). Установлено, что свободный FMN может быть восстановлен NaBH_4 и аскорбиновой кислотой, вследствие чего происходит падение флуоресцентного сигнала примерно в 2 раза. В то же время восстановление кофактора флавинонуклеотида в составе DARPin-miniSOG происходит только при повышенных концентрациях NaBH_4 (от 10 мМ). Поскольку физиологически более релевантные восстановители не показали такого эффекта, был сделан вывод о том, что восстановление кофактора не игра-

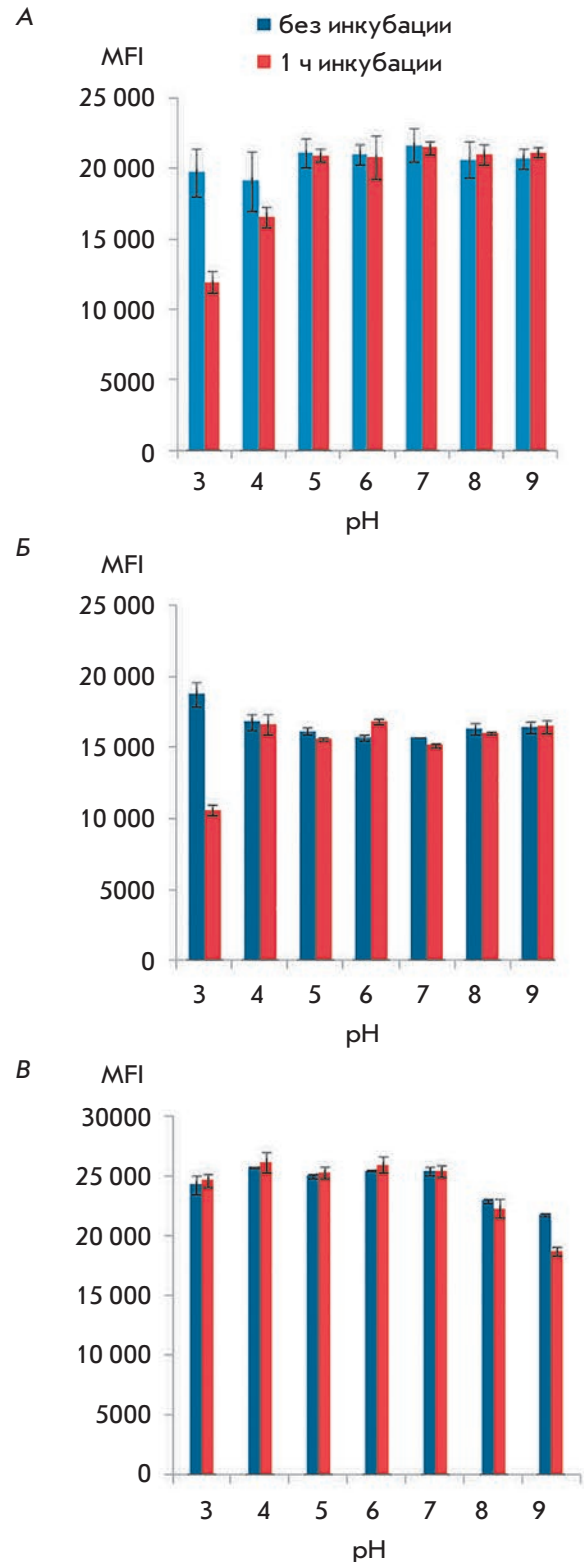


Рис. 2. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от pH среды при 37°C в течение 1 ч. Здесь и на рис. 3–5 MFI – интенсивность флуоресценции; $M \pm m, n = 3$

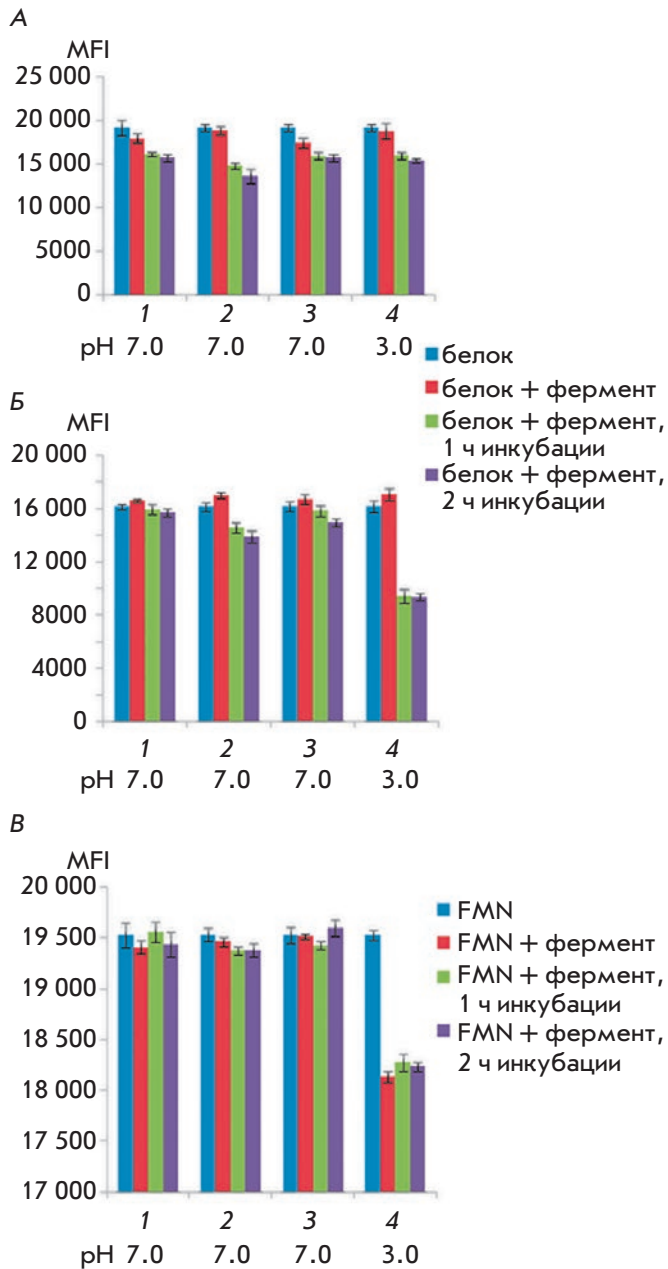


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от обработки специфическими протеазами при 37°C в течение 1 ч. 1 – трипсин; 2 – химотрипсин; 3 – папаин; 4 – пепсин

ет значимой роли в изменении интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке. Кроме того, оценено воздействие внутриклеточных восстановителей на интенсивность флуоресцентного сигнала DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG после обработки протеазами при оптимальных для данных ферментов значениях pH, что также не повлияло на флуоресцентные свойства белков на основе miniSOG.

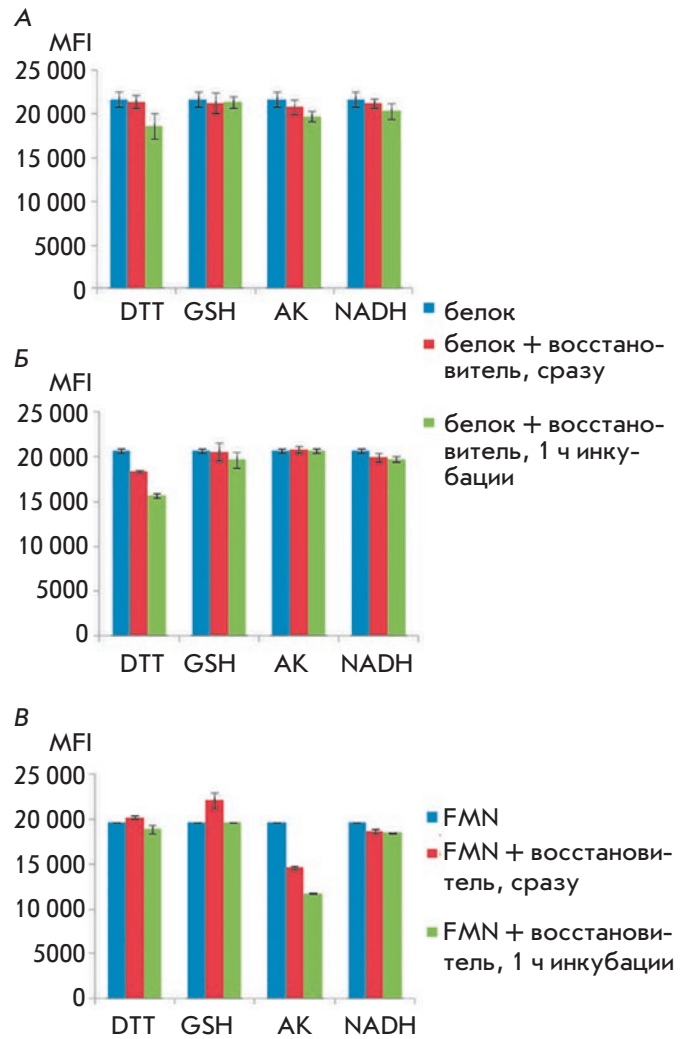


Рис. 4. Зависимость интенсивности флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б) и FMN (В) от воздействия внутриклеточных восстановителей при 37°C в течение 1 ч. DTT – дитиотреитол; АК – аскорбиновая кислота

В качестве еще одной гипотезы, объясняющей снижение интенсивности флуоресценции miniSOG в клетке, рассматривали экранирование молекулы белка и поглощение ее флуоресценции хромофорами клетки. В качестве модельной молекулы, способной поглощать флуоресценцию miniSOG *in vitro*, был протестирован краситель трипановый синий, который способствовал полному гашению флуоресцентного сигнала как DARPin-miniSOG, так и 4D5scFv-miniSOG. Нативными перехватчиками излучения miniSOG внутри клетки могут быть гемопротеины, такие, как цитохром с. Показано, что при возбуждении флуоресценции в присутствии

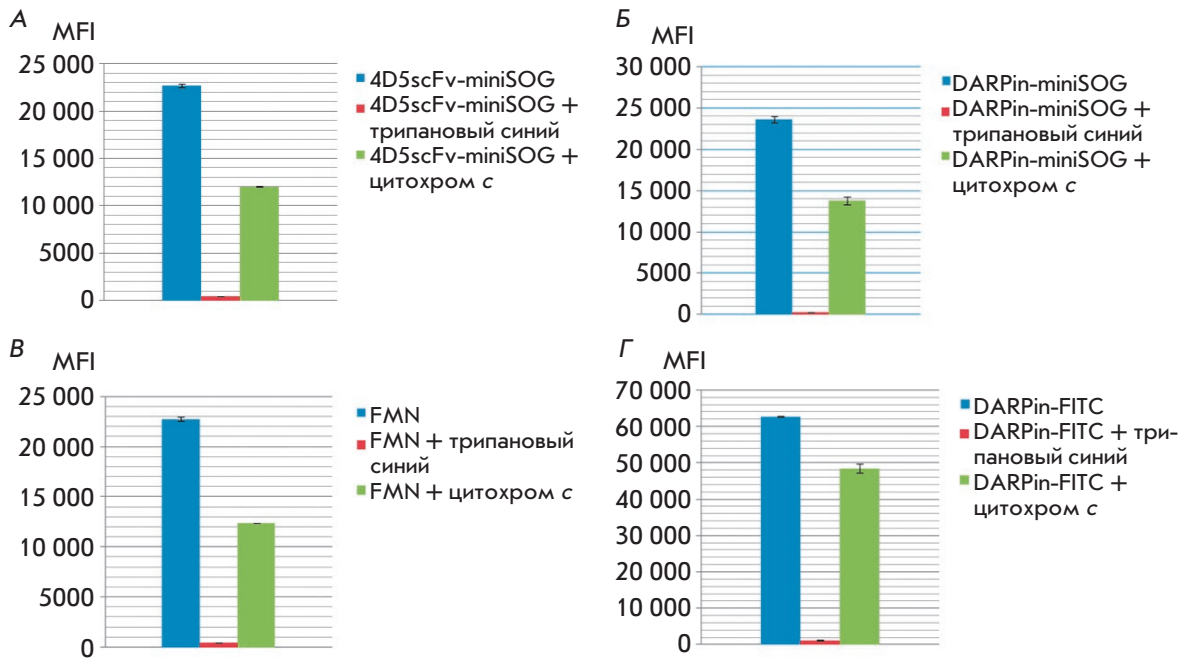


Рис. 5. Влияние разных хромофоров на интенсивность флуоресценции 4D5scFv-miniSOG (А), DARPin-miniSOG (Б), FMN (В) и DARPin-FITC (Г)

цитохрома как в случае FMN, так и в случае целевых белков происходит падение флуоресцентного сигнала в 2 раза, при этом DARPin, конъюгированный с FITC, стандартным флуоресцентным красителем, не показал такого результата (рис. 5).

Стоит отметить, что флуоресценция FITC изменяется также в эндосомах и лизосомах в зависимости от значений pH среды. В настоящее время краситель используется в качестве сенсора для измерения pH эндосом клеток [9, 10]. Цитотоксический модуль miniSOG, как и FITC, может использоваться для детекции интернализации HER2, но при этом причины падения флуоресцентных сигналов разные.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной причиной снижения интенсивности флуоресценции фототоксинов на основе miniSOG являются их экранирование и поглощение флуоресценции miniSOG флуорофорами клетки. Устойчивость miniSOG внутри клетки делает его перспективным компонентом для создания тераностических агентов, так как спектральные свойства данного фототоксина позволяют использовать его в паре с люциферазой NanoLuc, которая решает проблему экранирова-

ния miniSOG [16]. Нами обнаружено, что цитотоксический модуль miniSOG в составе рекомбинантных белков 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG, как и FITC, может использоваться для детекции интернализации HER2, но при этом причины падения флуоресцентных сигналов разные.

Понимание механизма тушения флуоресценции фотосенсибилизатора позволяет адекватно интерпретировать данные по динамике интернализации тераностических агентов в комплексе с рецептором HER2. Это важно для рационального дизайна фототоксических агентов направленного действия, поскольку установлено [17], что их эффективность зависит от локализации и накопления в раковых клетках. ●

Работа поддержана грантами РФФИ КОМФИ № 17-00-00121 (получение адресных рекомбинантных белков), РФФ № 14-24-00106 (исследования на опухолевых клетках).

Работа выполнена с использованием ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kuimova M.K., Bhatti M., Deonarain M., Yahioglu G., Levitt J.A., Stamati I., Suhling K., Phillips D. // Photochem. Photobiol. Sci. 2007. V. 6. № 9. P. 933–939.
- Wu D., Yotnda P. // J. Vis. Exp. 2011. № 57. P. 3357.
- Green D.R., Llambi F. // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2015. V. 7. № 12. P. a006080.

- Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 3. P. 126–132.
- Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
- Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 116–122.

7. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. 1–10.
8. Shilova O.N., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 475. № 1. P. 256–258.
9. Brabec M., Schober D., Wagner E., Bayer N., Murphy R.F., Blaas D., Fuchs R. // *J. Virology.* 2005. V. 79. № 2. P. 1008–1016.
10. Jin T., Sasaki A., Kinjo M., Miyazaki J. // *Chem. Commun.* 2011. V. 46. № 14. P. 2408–2410.
11. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. // *Cytometry. Part A.* 2017. V. 91. № 9. P. 917–925.
12. Geisow M.J., Evans W.H. // *Exp. Cell Res.* 1984. V. 150. № 1. P. 36–46.
13. Thomas M.P., Whangbo J., McCrossan G., Deutsch A.J., Martinod K., Walch M., Lieberman J. // *J. Immunol.* 2014. V. 192. № 11. P. 5390–5397.
14. Stoka V., Turk V., Turk B. // *Ageing Res. Rev.* 2016. V. 32. P. 22–37.
15. Benson R.C., Meyer R.A., Zaruba M.E., McKhann G.M. // *J. Histochem. Cytochem.* 1979. V. 27. № 1. P. 44–48.
16. Shramova E.I., Proshkina G.M., Chumakov S.P., Khodarovich Y.M., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 4. P. 118–123.
17. Shramova E.I., Proshkina G.M., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2017. V. 474. № 1. P. 228–230.

УДК 612.017.1:612.112.31

Иммуномакс – агонист TLR4 – влияет на фенотип легочных макрофагов при респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у мышей

А. А. Никонова^{1,2*}, А. В. Пичугин¹, М. М. Чулкина¹, Е. С. Лебедева¹, А. Р. Гайсина¹, И. П. Шиловский¹, Р. И. Атауллаханов¹, М. Р. Хаитов¹, Р. М. Хаитов¹

¹Государственный научный центр Институт иммунологии ФМБА России, 115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5А

*E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Поступила в редакцию 06.10.2018

Принята к печати 08.11.2018

РЕФЕРАТ В экспериментах *in vitro* и *in vivo* изучено действие Иммуномакса – агониста TLR4 растительного происхождения. В частности, с использованием культуры макрофагов, выделенных из костного мозга мышей, показано, что Иммуномакс переводит макрофаги мыши из состояния M0 и M2 в M1 (для определения фенотипа использовали данные об экспрессии мРНК генов *ARG1* и *iNOS*). Профилактическое (противовирусное) действие Иммуномакса изучено как на модели инфекции мышцей респираторно-синцитиальным вирусом (РСВ), так и на модели обострения бронхиальной астмы на фоне РСВ-инфекции. В эксперименте с вирусиндуцированным обострением бронхиальной астмы выявили достоверное снижение вирусной нагрузки в гомогенатах легких мышцей, обработанных Иммуномаксом, а также тенденцию к снижению уровня Th2-зависимых овалбуминспецифических IgG1-антител в сыворотке крови, преобладание M1-фенотипа макрофагов в легких, повышение РСВ-активированных CD4⁺ Т-клеток, содержащих внутриклеточный IFN- γ (Th1-клетки), и одновременно значительное снижение CD4⁺ клеток, секретирующих внутриклеточный IL-4 (Th2-клетки), определенных в селезенках мышцей методом ELISPOT через 1.5 месяца после окончания эксперимента. Эти данные свидетельствуют о том, что применение Иммуномакса поляризует иммунный ответ в сторону Th1 и, по-видимому, может быть использовано в качестве средства для профилактики РСВ-инфекции на фоне иммунного ответа аллергического типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бронхиальная астма, респираторно-синцитиальный вирус, макрофаги, PRR, агонист TLR4.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – бронхиальная астма; ОРВИ – острые респираторные вирусные инфекции; IL – интерлейкин; РСВ – респираторно-синцитиальный вирус; TLR – Toll-подобные рецепторы; Мф – макрофаги; IFN – интерферон; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция с детекцией в режиме реального времени; аМф – альвеолярные Мф.

ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) – это заболевание, в основе которого лежит хроническое воспаление дыхательных путей. Воспаление, обуславливающее гиперреактивность бронхов, развивается под влиянием Т-хелперов второго типа (Th2-ответ). За последние 15–20 лет заболеваемость БА среди населения Российской Федерации выросла более чем в 3 раза и составила 902.8 на 100000 населения (2007 г.). Обострения БА у детей и взрослых в большинстве случаев ассоциированы с острыми респираторными

вирусными инфекциями (ОРВИ). Некоторые виды вирусов, такие, как респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), риновирусы, метапневмовирус, вирусы гриппа, парагриппа и коронавирусы, детектированы в секретах дыхательных путей в период обострения БА [1]. В связи с этим разработка новых средств профилактики ОРВИ является важной проблемой системы здравоохранения.

Альвеолярные Мф (аМф) – доминантная популяция клеток бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), отличаются способностью приобретать разнообраз-

ные фенотипы в зависимости от сигналов микро-окружения (классически активированные M1, альтернативно активированные M2). Регуляторную роль различных фенотипов Мф *in vivo* активно изучают, но накапливаются данные, свидетельствующие о том, что Мф могут участвовать в патогенезе БА [2, 3].

Среди рецепторов распознавания молекулярных образов патогенов (pathogen pattern recognition receptors, PRR) наиболее изучены Toll-подобные рецепторы (TLR), активация которых необходима для запуска механизмов врожденного иммунного ответа на инфекцию. В связи с этим считается, что агонисты TLR могут использоваться в качестве иммунотерапевтических препаратов или адъювантов вакцин для лечения инфекционных заболеваний. Выделенный из проростков картофеля [4] TLR4-агонист Иммуномакс эффективен в отношении целого ряда патогенов как вирусной (папилломавирус, герпесвирус), так и бактериальной природы, а также обладает потенциальной противоопухолевой активностью [5]. Ранее сообщалось, что иммуномодулятор Иммуномакс активирует моноциты, Мф, NK и дендритные клетки [6].

В данной работе изучена роль M2 Мф при воспалении БА, индуцированной вирусными инфекциями, а также возможность искусственного изменения поляризации Мф из M2 в M1 с помощью агонистов TLR с целью повышения эффективности иммунной защиты от РСВ на фоне иммунного ответа аллергического типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поляризация макрофагов мыши посредством препарата Иммуномакс в экспериментах *in vitro*

Макрофаги (Мф), выделенные из костного мозга мыши, помещали в 24-луночные планшеты в концентрации 10^5 клеток на лунку и в течение 7 дней культивировали в среде, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF). Через 7 дней клетки в течение 24 ч обрабатывали IL-4 для получения M2 Мф, Иммуномаксом – для получения M1 или питательной средой для M0. Через 24 ч после обработки IL-4 среду заменяли на новую с Иммуномаксом для реполяризации M2 в M1, а также добавляли Иммуномакс в M0 для реполяризации в M1. Схема эксперимента представлена на рис. 1А. Через 24 ч после обработки лизаты клеток отбирали, замораживали при -80°C и хранили до момента исследования. Далее образцы анализировали методом ПЦР-РВ, определяя при этом уровень мРНК генов *iNOS* и *ARG1* мыши.

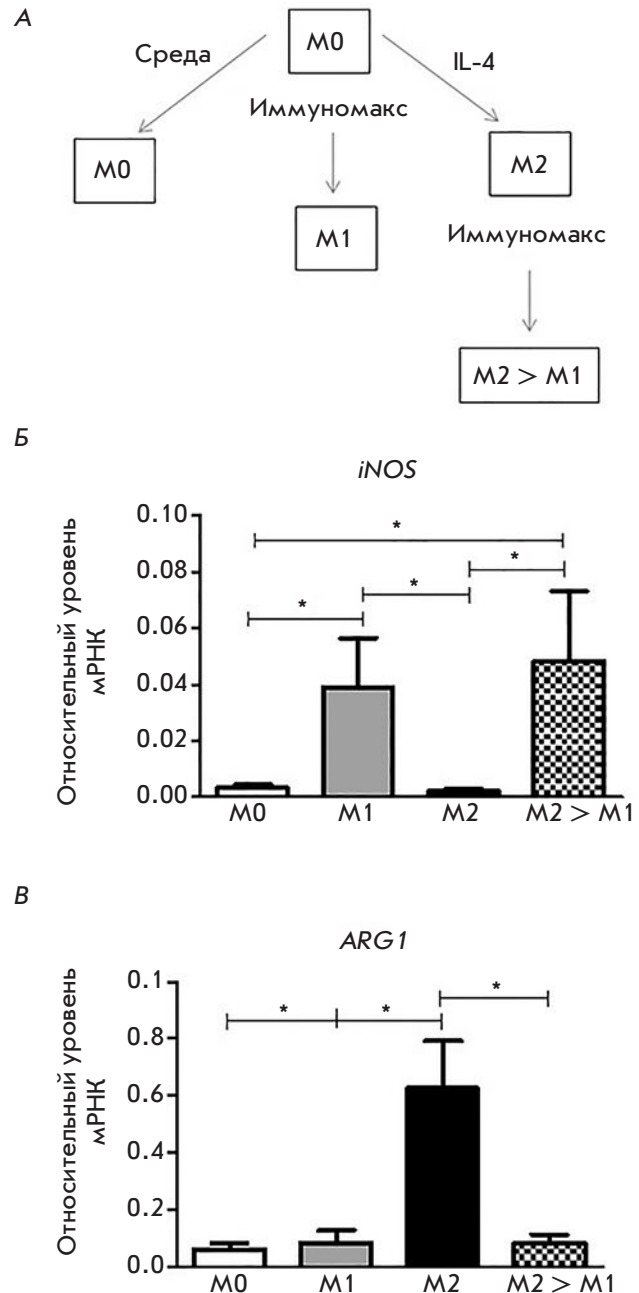


Рис. 1. TLR4-агонист Иммуномакс поляризует макрофаги мыши в M1-фенотип в условиях *in vitro*. А – дизайн эксперимента; уровень экспрессии мРНК *iNOS* (Б) и *ARG1* (В), оцененный методом ПЦР-РВ и нормированный по уровню мРНК бета-актина

Эксперименты в условиях *in vivo*

Профилактический эффект Иммуномакса *in vivo* мы оценивали на двух экспериментальных моделях: РСВ-инфекции у мышей и вирус-индуцированного обострения БА у мышей. Схема экспериментов представлена на рис. 2А и 2Б соответственно. В ка-

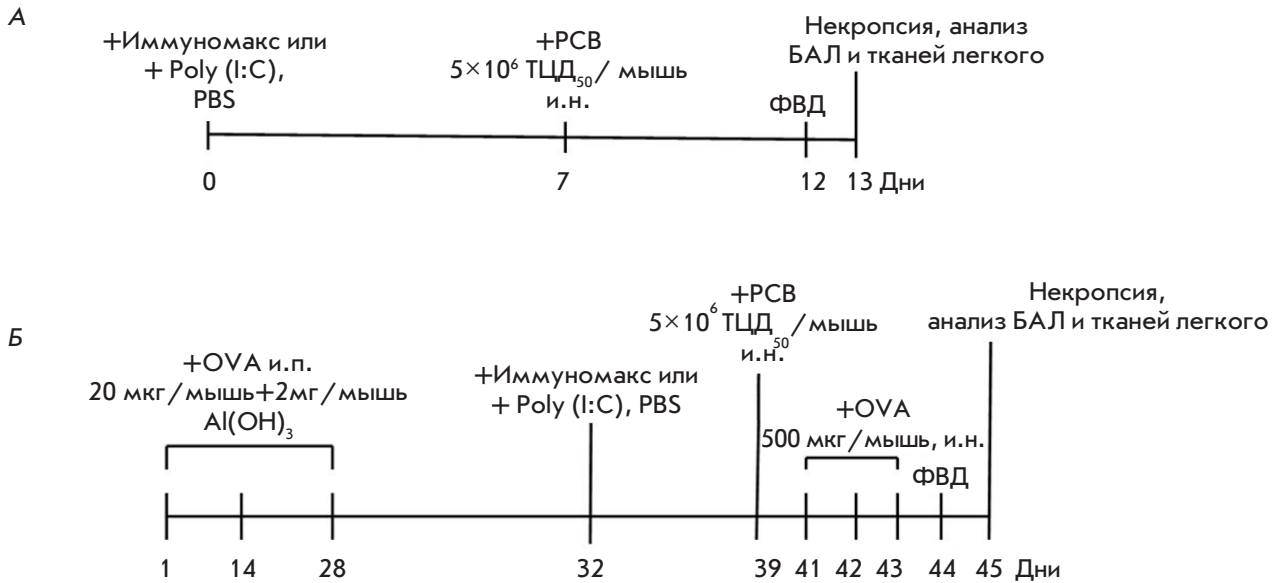


Рис.2. Схема экспериментов *in vivo*. А – модель РСВ-инфекции на мышах, Б – модель обострения бронхиальной астмы (БА) на фоне РСВ-инфекции у мышей. PBS – фосфатно-солевой буфер, и.н. – интраназальное введение, ФВД – оценка функции внешнего дыхания, OVA – овалбумин, и.п. – интраперитонеальное введение, БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж. Были сформированы следующие экспериментальные группы животных (на модели РСВ-инфекции): 1) РСВ+Иммуномакс ($N = 17$); 2) РСВ+Poly (I:C) ($N = 17$); 3) РСВ ($N = 17$); 4) интактные мыши ($N = 17$). На модели обострения БА на фоне РСВ-инфекции: 1) БА/РСВ+Иммуномакс ($N = 17$); 2) БА/РСВ+Poly (I:C) ($N = 17$); 3) БА/РСВ ($N = 17$); 4) интактные мыши ($N = 17$)

честве вирусного агента был выбран РСВ штамм А2. В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c массой 18–20 г из питомника «Столбовая», Россия.

В экспериментах были сформированы по четыре группы животных ($N = 17$) (рис. 2). По восемь мышей из каждой группы использовали для гистологического исследования и ПЦР-анализа. Часть мышей ($N = 4$) использовали для анализа фенотипов популяций макрофагов в легких (посредством комплексного клеточного анализа бронхиального лаважа и клеточного инфильтрата легких с помощью многопараметровой проточной цитометрии). Четырех мышей из каждой группы использовали для идентификации количества РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток, секретирующих IFN- γ и IL-4, методом ELISPOT через 1.5 месяца после инфекции.

На основании работы Misharin и соавт. [7] для идентификации популяций клеток миелоидного ряда мы выбрали следующее сочетание антител – CD11b Brilliant Violet 510™, CD45 AlexaFluor®, Ly-6C PE, CD11cPE/Dazzle™ 594, CD49bPerCP/Cy5.5, Ly-6GPE/Cy7, F4/80APC, I-A/I-EAPC/Cy7. Для сортировки клеток использовали проточный цитометр FACSaria II. Экспрессию мРНК генов *iNOS* и *ARG1* в отсортированных Мф оценивали методом ПЦР-РВ.

С целью оценки противовирусного эффекта агонистов TLR методом ПЦР-РВ определяли уровень РНК РСВ в лизатах клеток, выделенных из гомогенатов легких.

Для идентификации секретирующих IFN- γ и IL-4 РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток использовали коммерческие наборы Mouse IL-4 ELISPOT Set и Mouse IFN- γ ELISPOT Kit (BD Biosciences, США) согласно инструкции производителя.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism version 4.0. Данные считали статистически значимыми при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы изучали возможность Иммуномакса, агониста TLR4, переводить макрофаги мыши из состояния M0 и M2 в M1. Фенотип Мф определяли, используя информацию об экспрессии мРНК генов *iNOS* и *ARG1* – маркеров M1- и M2-фенотипов соответственно [8]. Полученные нами данные подтверждают способность Иммуномакса реполяризовать клетки в состояние M1. В частности, в обработанных Иммуномаксом M0 повышается экспрессия *iNOS* и снижается экспрессия *ARG1*. Такой же эффект мы наблюдали в M2-клетках, обработанных Иммуномаксом (повы-

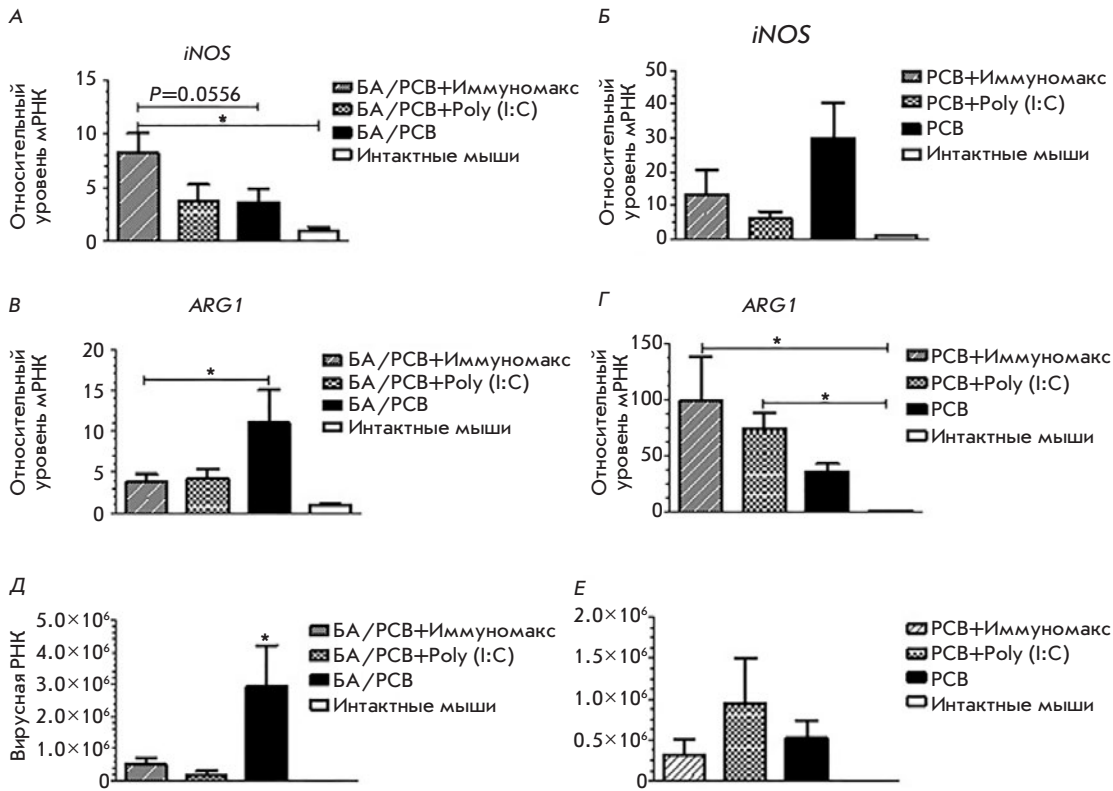


Рис. 3. Экспрессия мРНК *iNOS* (А, Б) и *ARG1* (В, Г) в альвеолярных макрофагах мыши. Д, Е – количество вирусной РНК РСВ на 1 г легочной ткани мышей, определенное методом ПЦР-РВ. А, В, Д – модель бронхиальной астмы (БА) на фоне РСВ-инфекции у мышей. Б, Г, Е – модель РСВ-инфекции на мышах

шение уровня мРНК гена *iNOS* и снижение *ARG1* (рис. 1Б, В)).

На следующем этапе мы перешли к изучению *in vivo* профилактического эффекта от применения Иммуномакса как в экспериментах с РСВ-инфекцией у мышей, так и с обострением БА на фоне РСВ-инфекции (рис. 2). В этой серии мы оценивали целый ряд параметров, таких, как функция дыхания, клеточный состав БАЛ, гистологические изменения, уровень сывороточных овальбуминспецифических антител разных классов (IgE, IgG1 и IgG2). Не выявлено статистически значимых различий в величинах этих показателей у животных экспериментальных групп (данные не представлены).

Однако следует отметить, что в эксперименте с БА+РСВ мы выявили тенденцию к снижению уровня овальбуминспецифических IgG1-антител в сыворотке крови мышей, получавших Иммуномакс (данные не представлены). Классическим носителем свойств антител являются Th2-зависимые IgG1-антитела, содержание которых может увеличиваться при аллергических заболеваниях. Снижение под воздействием Иммуномакса уровня IgG1-антител, наблюдаемое в нашем исследовании, по всей видимости, свидетельствует о развитии иммунных реакций по Th1-типу. Интересно, что эти реакции наблюда-

ются на системном уровне, несмотря на интраназальное введение препарата.

Особый интерес представлял фенотип легочных Мф мышей в разных условиях эксперимента, так как мы предполагаем, что при интраназальном введении Иммуномакс действует на клетки этого типа, переводя их в состояние М1. Чтобы проверить эту гипотезу, мы выделяли Мф из легких посредством сортировки на проточном цитометре FACSAria II и оценивали экспрессию мРНК генов *iNOS* и *ARG1*. При анализе данных ПЦР-РВ мы отметили тенденцию к повышению уровня *iNOS* (рис. 3А) и значимое снижение уровня *ARG1* (рис. 3В) в Мф мышей с БА, обработанных Иммуномаксом, на фоне РСВ-инфекции. Это указывает на поляризацию Мф в противовирусное М1-состояние. Однако в эксперименте с РСВ-инфекцией у мышей подобной тенденции не выявлено (рис. 3Б, Г).

При оценке вирусной нагрузки отмечено статистически значимое снижение количества вирусной РНК в легких мышей, обработанных Иммуномаксом, по сравнению с группой животных, не получавших лечение (рис. 3Д). Отмечена также тенденция к снижению вирусной нагрузки в группе, обработанной Poly (I : C) – агонистом TLR3. Эти данные получены в эксперименте с вирус-индуцированным обостре-

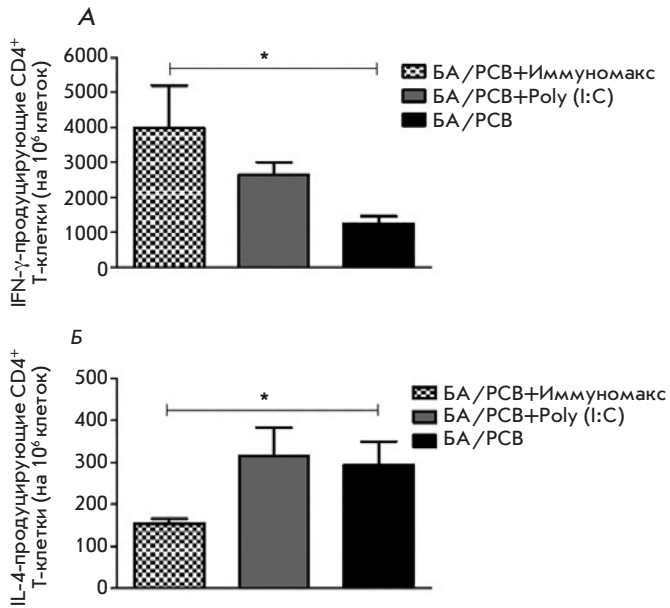


Рис. 4. Количество IFN-γ (А) и IL-4 (Б) продуцирующих CD4⁺ Т-клеток в селезенках мышей с моделируемым обострением бронхиальной астмы на фоне РСВ-инфекции. Количество РСВ-специфических CD4⁺ Т-клеток определяли методом ELISPOT (некропсию мышей проводили через 1.5 месяца после окончания эксперимента)

нием БА. Мы выявили также тенденцию к снижению вирусной нагрузки у мышей с РСВ-инфекцией, получавших исследуемый препарат (рис. 3Е).

На рис. 4 представлены результаты выявления РСВ-специфической дифференцировки Th1- и Th2-клеток методом ELISPOT. В эксперименте с моделированием обострения БА на фоне РСВ-инфекции мы наблюдали значимое повышение РСВ-активированных CD4⁺ Т-клеток, секретирую-

щих IFN-γ (Th1-клетки) (рис. 4А), и одновременно значительное снижение содержания CD4⁺ клеток, секретирующих IL-4 (Th2-клетки) (рис. 4Б) в селезенках мышей, обработанных Иммуномаксом. У мышей с РСВ-инфекцией, обработанных Иммуномаксом, выявлена тенденция к повышению содержания активированных CD4⁺ Т-клеток, секретирующих IFN-γ (Th1-клеток), при этом не обнаружено CD4⁺ клеток, секретирующих IL-4 (Th2-клетки) (данные не представлены).

Таким образом, в ходе экспериментов *in vitro* и *in vivo* показано, что агонист TLR4 Иммуномакс способен реполяризовать Th2-ответ в противовирусный Th1. Эффект от применения Иммуномакса наблюдали на модели БА, осложненной РСВ-инфекцией, где у мышей изначально посредством сенсibilизации модельным аллергеном овальбумином формировали выраженный Th2-ответ. Главной концепцией в терапии аллергических заболеваний является инверсия иммунного Th2-ответа в сторону Th1. Этот подход особенно актуален при ОРВИ у пациентов с БА, так как многочисленные данные свидетельствуют от том, что пациенты с БА переносят ОРВИ в более тяжелой форме [9]. Это связывают с доминирующим Th2-ответом, который, возможно, вызван преобладанием в легких больных активированных M2 Мф [3]. В связи с этим, полученные нами данные свидетельствуют о том, что обработка Иммуномаксом, агонистом TLR4, оказывает влияние на фенотип легочных Мф, поляризуя иммунный ответ в сторону Th1, и поэтому обладает потенциалом для использования в качестве средства для профилактики РСВ-инфекции, в том числе на фоне аллергического типа иммунного ответа. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-10188).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Царев С.В., Хаитов М.Р. // Рос. мед. журн. 2009. № 2. С. 136–139.
2. Никонова А.А., Хаитов М.Р., Хаитов Р.М. // Мед. иммунология. 2017. Т. 9. № 6. С. 657–672.
3. Melgert B.N., ten Hacken N.H., Rutgers B., Timens W., Postma D.S., Hylkema M.N. // J. Allergy Clin. Immunol. 2011. V. 127. № 3. P. 831–833.
4. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Мельникова Т.М., Хаитов Р.М. Патент, RU2013151824А, Россия, А61Р 37/02, 2013.
5. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A., Davtyan A., Hovakimyan A., Tukhvatulin A., Davtyan H., Shcheblyakov D., Logunov D., Chulkina M., et al. // J. Transl. Med. 2014. V. 29. № 12. P. 322.
6. Bagaev A., Pichugin A., Nelson E.L., Agadjanyan M.G., Ghochikyan A., Ataulakhanov R.I. // J. Immunol. 2018. V. 200. № 8. P. 2656–2669.
7. Misharin A.V., Morales-Nebreda L., Mutlu G.M., Budinger G.R., Perlman H. // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2013. V. 49. № 4. P. 503–510.
8. Murray P.J., Wynn T.A. // J. Leukoc. Biol. 2011. V. 89. № 4. P. 557–563.
9. Corne J.M., Marshall C., Smith S., Schreiber J., Sanderson G., Holgate S.T., Johnston S.L. // Lancet. 2002. V. 359. № 9309. P. 831–834.

УДК 577.112.7

Определение белков наружной мембраны митохондрий, взаимодействующих с белком AIF

Н. П. Фадеева¹, Н. В. Антипова¹, В. О. Шендер¹, К. С. Ануфриева¹, Г. А. Степанов², С. Бастола³, М. И. Шахпаронов¹, М. С. Павлюков^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

³Университет Алабамы в Бирмингеме, 35294, Бирмингем, Алабама, США

*E-mail: marat.pav@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2017

Принята в печать 24.09.2018

РЕФЕРАТ В ответ на неблагоприятные воздействия клетки многоклеточных организмов могут подвергаться запрограммированной гибели – апоптозу. Нарушения этого процесса приводят к развитию различных заболеваний человека. На сегодняшний день известно два типа апоптоза – каспаз-зависимый, при котором происходит расщепление клеточных белков, и каспаз-независимый, обусловленный разрывами молекул ДНК. Главную роль в апоптозе второго типа, по-видимому, более консервативном и эволюционно древнем, играет белок AIF. Ключевым этапом каспаз-независимого апоптоза является диссоциация AIF от наружной митохондриальной мембраны (НММ), однако механизм регуляции взаимодействия AIF с НММ до сих пор не установлен. В данной работе мы впервые показали, что AIF может закрепляться на НММ благодаря взаимодействию с белком Морталином. Нами подтверждено связывание этих белков *in vitro* и *in vivo*, а также картированы участки аминокислотной последовательности, необходимые для этого взаимодействия. Показано, что индукция апоптоза противоопухолевыми препаратами приводит к распаду комплекса AIF–Морталин и диссоциации AIF от НММ. Наконец, с использованием биоинформатического анализа установлено, что повышенная экспрессия Морталина в клетках глиобластомы коррелирует с плохим клиническим прогнозом. Все эти данные указывают на важную роль Морталина в регуляции каспаз-независимого апоптоза и позволяют предположить, что ингибирование взаимодействия AIF–Морталин приведет к диссоциации AIF от НММ и последующей гибели опухолевых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА AIF, каспаз-независимый апоптоз, глиобластома, белки теплового шока.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AIF – фактор, индуцирующий апоптоз (Apoptosis Inducing Factor); Hsp – белок теплового шока (Heat shock protein); НММ – наружная мембрана митохондрий; BiFC – бимолекулярная комплементация флуоресценции (Bimolecular Fluorescence Complementation); YFP – желтый флуоресцентный белок (Yellow Fluorescent Protein); PLA – анализ методом проксимального связывания *in situ* (proximity ligation assay).

ВВЕДЕНИЕ

Нарушение процесса апоптоза вызывает развитие широкого спектра заболеваний человека. С одной стороны, ингибирование апоптоза может способствовать опухолевой трансформации клеток [1] и инициации аутоиммунных процессов [2], с другой, избыточная активация апоптоза приводит к гибели нормальных клеток при ишемических поражениях (инфарктах и инсультах) [3]. На протяжении долгого времени предполагалось, что основными факторами апоптоза являются каспазы – цистеиновые

протеазы, расщепляющие клеточные белки, однако в последнее время накапливается все больше данных о важной роли каспаз-независимого пути апоптоза, главную роль в котором играет белок AIF (Apoptosis Inducing Factor) [4].

Известно, что многие виды опухолей устойчивы к каспаз-зависимому пути клеточной гибели, однако все они чувствительны к апоптозу, опосредованному белком AIF [4, 5]. Подобная чувствительность объясняется тем, что AIF не только вовлечен в апоптоз, но и жизненно необходим для функционирования

митохондрий. Поэтому любые опухолевые клетки содержат значительное количество белка AIF, что делает его привлекательной мишенью для разработки противоопухолевых препаратов [6]. С другой стороны, AIF играет ключевую роль при ишемических повреждениях здоровых клеток. Недавние исследования показали, что гибель мышечных и нервных клеток при инфарктах [7] и инсультах [8] происходит исключительно посредством каспаз-независимого AIF-индуцируемого апоптоза, тогда как ингибирование AIF перед моделированием инфаркта эффективно препятствует гибели клеток, позволяя полностью восстановить функции сердца через 2 недели после модельного приступа [7].

Белок AIF, кодируемый геном *aifm1*, представляет собой NAD-связывающий флавопротеин, в норме локализующийся на мембране митохондрий. Этот белок синтезируется в виде пре-пропептида с мол. массой 67 кДа, состоящего из 613 аминокислотных остатков (fAIF). На его N-конце находится последовательность митохондриальной локализации (1–30 а.о.) и гидрофобный трансмембранный сегмент (66–84 а.о.), далее расположены две последовательности ядерного импорта, а также FAD- и NAD-связывающие домены [9, 10]. Сравнительный анализ геномов различных организмов показал, что AIF чрезвычайно консервативен, а его близкие гомологи найдены у всех многоклеточных организмов, включая растения [11]. Интересно, что удаление этого белка летально уже на самых ранних стадиях развития млекопитающих [12].

Синтезированный в цитоплазме AIF встраивается во внутреннюю мембрану митохондрий, где под воздействием пептидаз от него отщепляется N-концевой сегмент и образуется митохондриальный AIF ($\Delta 1-54$) с массой 62 кДа [10]. При индукции апоптоза этот белок диссоциирует от митохондриальной мембраны и транспортируется в ядро. В ядре AIF взаимодействует с гистоном H2AX и неактивной эндонуклеазой СурА. Образовавшийся тройной комплекс расщепляет геномную ДНК на фрагменты длиной около 50 т.п.н., что вызывает гибель клетки [13].

Необычной является кинетика диссоциации AIF от мембраны митохондрий. Согласно некоторым данным, этот процесс происходит через 12–18 ч после индукции апоптоза и является следствием активации классического, управляемого каспазами, пути программируемой клеточной гибели [14]. Однако в других работах транслокацию AIF наблюдали уже через 10–20 мин после индукции апоптоза, что намного опережает активацию каспаз-зависимого пути [15]. Столь противоречивые результаты объясняются существованием двух пулов AIF внутри клетки. Часть AIF (около 70%) закреплена на внутренней мембра-

не митохондрий с помощью трансмембранного сегмента. Для диссоциации этих молекул необходимо нарушение целостности митохондриальной мембраны, активация протеаз и расщепление AIF между 96 и 120 а.о., что приводит к образованию растворимых $\Delta 1-102$ (57 кДа) или $\Delta 1-118$ фрагментов AIF (55 кДа) [10]. С другой стороны, около 30% AIF располагается на цитоплазматической поверхности наружной мембраны митохондрий (НММ). Эти молекулы связаны с мембраной намного слабее, и для их диссоциации достаточно изменения конформации AIF, вызванного взаимодействием с поли-ADP-рибозой, синтезируемой в ответ на повреждение ДНК [8, 16].

Предполагается, что именно высокоподвижная фракция AIF на НММ ответственна за каспаз-независимый путь апоптоза в опухолевых и нормальных клетках. Однако до сих пор не ясно, как именно AIF взаимодействует с НММ и почему происходит его диссоциация. Чтобы ответить на этот вопрос, мы определили белки, способные образовывать комплекс с AIF на НММ, и изучили как изменяется взаимодействие AIF с этими белками при индукции апоптоза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение наружной митохондриальной мембраны

НММ выделяли, как описано ранее [17], с небольшими модификациями. Печень четырех мышей, содержащихся без еды в течение 18 ч, промывали буфером А (70 мМ сахароза, 210 мМ D-маннитол, 0.1 мМ EDTA, 1 мМ Трис-НСl, pH 7.2), измельчали на фрагменты размером 2–4 мм и растирали тefлоновым пестиком в стеклянной ступке в 10-кратном объеме буфера А. Все операции проводили на льду. Гомогенат центрифугировали (10 мин 500g), после чего супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 9000g. Супернатант отбирали, поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера А. Осадок ресуспендировали в буфере А, раствор центрифугировали (10 мин 500g), после чего супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 9000g. Осадок ресуспендировали в буфере А и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 9000g. Супернатант отбирали, поверхность осадка аккуратно трижды промывали небольшим объемом буфера А. Осадок ресуспендировали в 35 мл буфера D (20 мМ фосфат Na, 0.02% бычий сывороточный альбумин, pH 7.2) и инкубировали в течение 20 мин во льду. Раствор центрифугировали (20 мин 35000g), осадок ресуспендировали в 35 мл буфера D и центрифугировали в течение 15 мин при 1900g. Супернатант аккуратно отбирали и центрифугировали (20 мин, 35000g).

Полученный желто-коричневый осадок представлял собой фракцию НММ. Белки НММ солиubilizировали в буфере PBS с добавлением 1% Тритона X-100, 0.1% дезоксихолата Na и 0.5 mM DTT.

Масс-спектрометрия

Нужные белковые полосы вырезали из полиакриламидного геля, обесцвечивали в растворе, содержащем 50% ацетонитрила и 50 mM бикарбонат аммония, и дегидратировали, добавляя 100% ацетонитрила. После удаления ацетонитрила проводили трипсинолиз в геле в течение 14 ч при 37°C (буфер для трипсинолиза содержал 13 нг/мкл трипсина и 10 mM бикарбоната аммония). Реакцию останавливали двумя объемами 0.1% раствора трифторуксусной кислоты. Пептиды экстрагировали из геля двумя объемами 50% раствора ацетонитрила в течение 1 ч. Полученные пептиды концентрировали до объема 5 мкл на вакуумной центрифуге. Далее 1 мкл смеси пептидов перемешивали на мишени с раствором матрицы (20 мг/мл 2,5-дигидроксибензойной кислоты, 50% ацетонитрила и 0.1% трифторуксусной кислоты). Масс-спектры получали на приборе MALDI Time-of-flight (Ultraflex TOF/TOF, Bruker Daltonik) в отражательном режиме регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне масс 500–5000 Да. Данные обрабатывали при помощи программы Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics), а пики продуктов автокаталитического расщепления трипсина использовали для калибровки масс-спектрометра. Для анализа использовали следующие параметры: точность определения массы – 100 ppm, база данных SwissProt, таксономическая категория Человек, допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином.

Конструирование плазмидных векторов

Фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный Морталин, амплифицировали с кДНК клеток линии U87MG с помощью ПЦП с праймерами Mort_for (AAAA AGA TCT ATG ATA AGT GCC AGC CGA-GC) и Mort_rev (ACCA GTC GAC CTG TTT TCT CCT-TTT GAT), клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_FULL. Фрагмент ДНК, кодирующий N-концевой фрагмент Морталина, амплифицировали с плазмиды pET28-Mort_FULL с помощью ПЦП с праймерами Mort_for и Mort_I_rev (AATA GTC-GAC TCA GCC GGC САА САС ACC TC), клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_I. Фрагмент ДНК, кодирующий C-концевой фрагмент Морталина, амплифицировали с плазмиды pET28-Mort_FULL с помощью ПЦП с праймерами Mort_II_for (GGGT-

AGA TCT ACG GAT GTG CTG CTC) и Mort_rev, клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pET28-Mort_II. Для экспрессии AIF с последовательностью HALO был создан экспрессионный вектор pET-HALO. Фрагмент ДНК, кодирующий HALO-tag, амплифицировали с плазмиды pFC20K Halo-tag T7 SP6 Flexi (Promega) с помощью ПЦП с праймерами Halo_for (ACTA ACC GGT CGC CAC CAT GGG ATC CGA-AAT CGG TAC TGG) и Halo_rev (AATT AGA TCT-ACC GGA AAT CTC CAG AGT A) и клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции NcoI и BamHI. Полученную плазмиду назвали pET-HALO. Далее фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный AIF, амплифицировали с плазмиды pEBB-AIF-YC [18] с помощью ПЦП с праймерами AIF_for (AATA GAA-TTC GCT AGC TCT GGT GCA TCA GGG G) и AIF_rev (CTGT GTC GAC TCA GTC TTC ATG AAT GTT GA) и клонировали в вектор pET-HALO по сайтам рестрикции EcoRI и SalI. Полученная плаزمида была названа pET-HALO-AIF. Для экспрессии AIF с His-tag последовательность, кодирующую AIF, клонировали из вектора pET-HALO-AIF в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции EcoRI и SalI и получили плазмиду pET28-AIF_FULL. Фрагмент ДНК, кодирующий apoAIF, амплифицировали с плазмиды pEBB-AIF-YC с помощью ПЦП с праймерами apoAIF_for (TAGA GAA TTC GGG CTG ACA CCA-GAA CAG A) и AIF_rev, клонировали в вектор pet28a+ по сайтам рестрикции EcoRI и SalI и получили плазмиду pET28-apoAIF. Для экспрессии Морталина, соединенного с N-концевой частью YFP, создали экспрессионный вектор pTagYN-N. Фрагмент ДНК, кодирующий N-концевую часть YFP, амплифицировали с плазмиды pEBB-XIAP-YN [18] с помощью ПЦП с праймерами YN_for (AAAA-GTC GAC ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG-C) и YN_rev (AAAT GCGG CCGC TCA GGA TCC-GCT CAC G) и клонировали в вектор pTagCFP-N (Evrogen) по сайтам рестрикции SalI и NotI с получением плазмиды pTagYN-N. Далее последовательность, кодирующую полноразмерный Морталин, перенесли из вектора pET28-Mort_FULL в вектор pTagYN-N по сайтам рестрикции BglII и SalI и получили плазмиду pTagYN-Mort. Отсутствие мутаций, а также правильность легирования вектора и вставки во всех случаях подтверждали с помощью секвенирования.

Индукция синтеза рекомбинантных белков в клетках *Escherichia coli*

Клетки из индивидуальных колоний *E. coli* штамм BL21(DE3) Codone+ RIL, трансформированные плазмидой, кодирующей соответствующий белок, перенос-

сили с агаризованной среды в среду LB (17 мл) с необходимым антибиотиком и инкубировали в течение ночи при перемешивании и 37°C, затем переносили в колбу объемом 750 мл с 200 мл свежей среды LB с антибиотиком и инкубировали при перемешивании при 37°C до достижения оптической плотности 0.7 при $\lambda = 600$ нм. После этого для индукции транскрипции добавляли изопропил- β -D-тиогалактозид до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 18 ч при перемешивании и комнатной температуре.

Выделение белков *E. coli*, содержащих гексагистиридиновый участок, в денатурирующих условиях

После индукции трансляции 200 мл среды LB с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 12 мл лизирующего буфера В (рН 8.0, 100 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины) и оставляли на 1.5 ч при комнатной температуре, периодически перемешивая. Лизат центрифугировали (15 мин, 15000 об/мин, 4°C, ротор JS-20 Beckman). Супернатант инкубировали с 2 мл Ni-NTA-агарозы при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Полученную суспензию переносили в колонку. После оседания Ni-NTA-агарозы осадок промывали, пропуская через колонку 10 мл буфера В и 10 мл буфера С (буфер В с рН 6.3). Затем на колонку медленно наносили 2 мл элюирующего буфера (буфер С с добавлением 250 мМ имидазола). Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре и собирали элюат. Полученный раствор диализовали в течение ночи против PBS с добавлением 1 мМ DTT.

Выделение AIF с Halo-tag из бактерий *E. coli* в неденатурирующих условиях

После индукции транскрипции 200 мл среды LB с бактериями центрифугировали (15 мин, 4000 об/мин, 4°C, ротор JS-7,5 Beckman), супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 6 мл лизирующего буфера F (рН 7.9, 50 мМ HEPES, 100 мМ NaCl, 0.5 мМ DTT, 0.5 мМ EDTA, 0.005% Igepal и коктейль ингибиторов протеаз). Суспензию переносили в охлажденные пробирки и обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, перемешивая в течение 1 мин после каждых 2 мин обработки. Полученный лизат центрифугировали (20 мин, 15000 об/мин, 5°C, ротор JS-20 Beckman). К 1.5 мл лизата добавляли 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным лигандом Halo-tag и инкубировали при постоянном перемешивании и комнатной температуре в течение 1 ч. После этого пробирки со смесью помещали в магнитную подставку, отбирали супернатант и промывали маг-

нитные частицы 1 мл буфера F 4 раза. Далее магнитные частицы с иммобилизованным белком использовали для изучения белок-белковых взаимодействий *in vitro*.

Изучение взаимодействия рекомбинантных белков *in vitro* методом pull down

Для получения белкового комплекса аликвоту раствора рекомбинантного белка, имеющего гексагистиридиновый участок, инкубировали с 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным на них белком с HALO-последовательностью. Суспензию инкубировали в течение ночи при перемешивании и температуре +4°C. Магнитные частицы промывали 3 раза PBS, связавшиеся белки элюировали буфером SLB (100 мМ Трис-НСl рН 6.8, 4% SDS, 5% β -меркаптоэтанола, 20% глицерина, 0.02% бромфенолового синего).

Изучение белок-белковых взаимодействий *in vitro* методом преципитации белков из клеточных лизатов

Для получения белкового комплекса лизат клеток U87MG или фракцию белков НММ инкубировали с 50 мкл магнитных частиц с иммобилизованным белком, имеющим гексагистиридиновый участок. Суспензию инкубировали в течение ночи при перемешивании и температуре +4°C. Для выделения белкового комплекса использовали набор Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit по инструкции производителя.

Иммуноблоттинг

Иммуноблоттинг проводили по стандартной методике [19]. Для окрашивания использовали моноклональные антитела кролика к AIF 1 : 500 (ab32516, Abcam), моноклональные антитела мыши к Морталину 1 : 250 (sc133137, Santa Cruz), конъюгированные с пероксидазой хрена моноклональные антитела мыши к γ -цепи IgG кролика 1 : 5000 (Sigma) и конъюгированные с пероксидазой хрена поликлональные антитела козы к IgG мыши 1 : 5000 (Sigma).

Культивирование клеток

Клетки линии U87MG культивировали в CO_2 -инкубаторе в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ L-глутамин и смеси пенициллина (100 ед./мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Для трансфекции использовали Lipofectamin LTX (Thermo Fisher, США) в соответствии с инструкцией производителя. Апоптоз вызывали, добавляя 50 мкМ цисплатина или 1 мкМ стауроспорина. Для оценки жизнеспособности клетки помещали в лунки 96-луночного планшета (по 6000 на лунку), на следующий день добавляли циспла-

тин или стауропорин в различных концентрациях. Через 4 дня жизнеспособность клеток определяли с помощью Аламарового голубого по инструкции производителя (Thermo Fisher, США).

Исследование белок-белковых взаимодействий методом BiFC

Для изучения взаимодействия белков методом BiFC клетки линии U87MG трансфицировали плазмидами, кодирующими AIF с С-концевой частью YFP и Морталин с N-концевой частью YFP, или белок XIAP с N-концевой частью YFP в качестве положительного контроля. Через 24 ч после трансфекции с помощью конфокального микроскопа получали изображения клеток, экспрессирующих исследуемые белки. Анализировали не менее 50 трансфицированных клеток в каждом образце.

PLA-анализ

Клетки линии U87MG, находящиеся в лунках камеры Lab-Tek II, трижды промывали PBS и фиксировали 4% раствором формалина в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого клетки пермеабилizировали 0.2% раствором Тритона X-100 в течение 15 мин. Все дальнейшие действия проводили с помощью набора Duolink In Situ Orange Starter Kit (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ранее было показано, что AIF взаимодействует с поверхностью НММ, не встраиваясь в липидный бислой [20]. Учитывая специфичность связывания AIF с НММ, а также то, что это взаимодействие ингибируется высокими концентрациями NaCl, мы предположили, что AIF локализуется на поверхности НММ благодаря связыванию с неким белком-адаптером, закрепленным на НММ. Чтобы определить этот белок, мы изучили взаимодействия рекомбинантного AIF с белками, выделенными из НММ печени мыши с помощью ультрацентрифугирования. Далее фракцию солубилизированных белков НММ пропускали через сорбент с иммобилизованным контрольным белком или с полноразмерным AIF (fAIF). После этого связавшиеся белки идентифицировали с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. Один из белков, способных взаимодействовать с AIF, но не с контрольным рекомбинантным белком, был определен как Морталин (рис. 1) – представитель семейства белков теплового шока (Hsp), ассоциированный с внешней поверхностью НММ [21].

Белок Морталин содержит два функциональных домена. С N-конца располагается АТР-связывающий домен (1–443 а.о.), а с С-конца пептидсвязывающий

домен (444–581 а.о.) [22]. Чтобы определить, какой из этих доменов важен для взаимодействия с AIF, мы проверили связывание fAIF с N- и С-концевыми фрагментами Морталина (1–433 и 433–666 а.о. соответственно, рис. 2А). С этой целью мы сконструировали плазмидные векторы, кодирующие фрагменты Морталина, несущие гексагистидиновый участок на С-конце, а также плазмиду, кодирующую fAIF с Halo-Tag на N-конце. Соответствующие рекомбинантные белки были выделены из клеток бактерий (рис. 2Б), после чего к магнитным частицам с иммобилизованным на них fAIF добавляли очищенные фрагменты Морталина. После инкубации и последующих промывок связавшиеся с сорбентом белки элюировали и разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле (рис. 2В). Показано, что фрагмент Mort II (433–666 а.о.) взаимодействует с fAIF *in vitro*, тогда как Mort I (1–433 а.о.) к такому взаимодействию не способен.

После идентификации фрагмента Морталина, способного связываться с AIF, мы решили определить участок AIF, необходимый для данного взаимодействия. С этой целью были созданы плазмиды, кодирующие полноразмерный AIF (fAIF), а также процессированный AIF (aroAIF, 103–613 а.о., рис. 2А), который возникает при индукции апоптоза и после диссоциации от митохондриальной мембраны перемещается в ядро клетки. Оба белка содержат N-концевой гексагистидиновый участок. Выделенные рекомбинантные фрагменты AIF были иммобилизованы на магнитных частицах, после чего к частицам добавляли фракцию солубилизированных белков НММ (содержащую Морталин). После инкубации и последующих промывок связавшиеся белки элюировали и проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Наличие Морталина определяли с помощью иммуоблотинга с первичными антителами на Морталин. Согласно результатам иммуодетекции (рис. 2Г), эндогенный Морталин взаимодействует с полноразмерным рекомбинантным fAIF *in vitro* и не взаимодействует с aroAIF, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными о том, что aroAIF не способен локализоваться на НММ [20].

Чтобы подтвердить, что AIF может взаимодействовать с Морталином не только *in vitro*, но и внутри живой клетки *in vivo*, был использован метод бимолекулярной комплементации флуоресценции (BiFC). Этот метод основан на том, что белок YFP способен флуоресцировать, даже если его разделить на две части, при условии, что обе половины YFP находятся достаточно близко друг к другу. По этой причине мы создали плазмиды, кодирующие Морталин, соединенный с N-концевой частью YFP (Mort-YN), и fAIF, несущий С-концевой фрагмент YFP (YS-

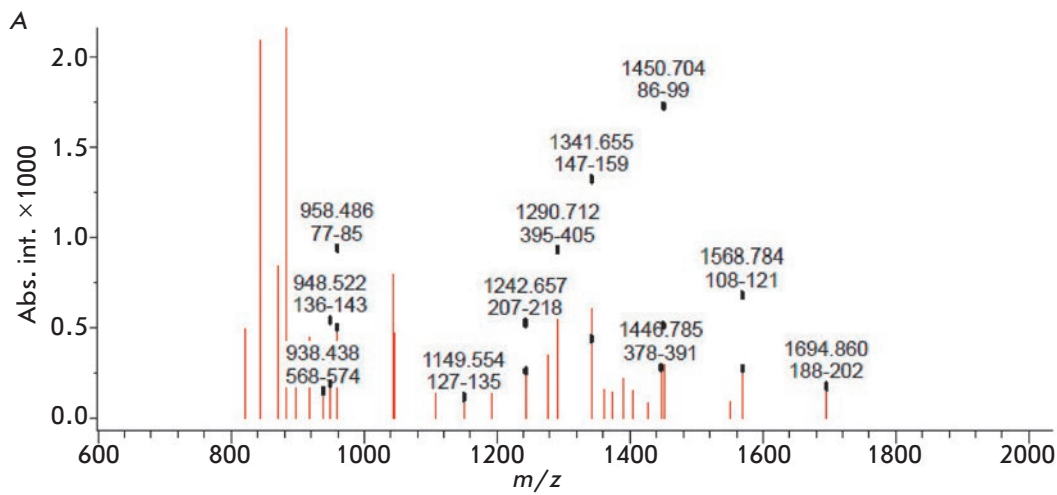


Рис. 1. Определение белка НММ, взаимодействующего с полноразмерным АИФ. А – масс-спектр белков НММ, взаимодействующих с АИФ. Указаны пептиды, относящиеся к белку Морталин. Б – полная аминокислотная последовательность Морталина и пептиды, идентифицированные с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Б

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
MISASRAAAA	RLVGTAAARS	PAARFPQGN	NGLSHEAFR	VSRROVASEA	IKGAVVGLD	GTTNSCVVM	EGHQAKVLEH	AECAATTSV	VAFADGERL	VGNFAKQAY	TNFRHFTAT
130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
KELIGRRYDD	PEVQEDYRW	PFIVRASWG	DANVEASGL	YSFSQIGAFV	LKMKETAEN	YLGHAKQAV	ITVPAYTDS	QRQATKDAQ	ISGLMVLVI	NEFTAAALAY	GLDKSDEVI
250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
DVYDLGGTF	DISILEIQNG	VFEVKSNGD	TFILGSEDFQ	ALLRHVVEF	KRETGVILTK	DNALQVRE	AAEKAKCELS	SSVQTDINLP	YLTMDASGFK	HLMKLTQRAQ	FEGITVDLHK
370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480
RTIAPCQKAM	QDAVVSZSDI	GEVILVGMT	RMEKQQQTVQ	DLFGKAPSKA	VNPDEAVIG	AAIQGGVLAG	DVTDVLLLDV	TPLSLGIETL	GGVTFKLNR	NTIIPFKKQ	VESTAADGQT
490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
QVEIKVCQGE	REMGAKLL	GQTLIGTIPP	AFRGVQIEV	TFDIDANGIV	HVSAKRWGTG	REQQIVIQSS	GGLSKDDIEN	MVKNAEKYAE	EDRRREVERVE	AVNMAEGIIEH	DIETKMEEFK
610	620	630	640	650	660	670	680				
DQLPADECNK	LKEEISVRA	LIARKDSETG	ENIRQAASSL	QQASLKLIFEM	AYKKAASERE	GGSSGTGEQ	KEDQKKEKQ				

АИФ) (рис. 3А). Этими плазмидами котрансфицировали клетки глиобластомы человека линии U87MG. Кроме того, в качестве положительного контроля клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими YC-AIF и белок XIAP с N-концевой частью YFP (YN-XIAP). Ранее было показано, что АИФ взаимодействует с XIAP в митохондриях [18]. В качестве отрицательного контроля клетки котрансфицировали плазмидами, кодирующими YC-AIF и свободную N-концевую часть YFP (YN). Через 24 ч после трансфекции с помощью конфокального микроскопа получили изображение клеток, коэкспрессирующих пары исследуемых белков. Как видно из рис. 3А, в клетках коэкспрессирующих YC-AIF и Mort-YN, а также в клетках, коэкспрессирующих YC-AIF и YN-XIAP, наблюдается яркая флуоресценция YFP. Такой результат подтверждает, что АИФ и Морталин действительно взаимодействуют друг с другом *in vivo*.

Получив результаты, говорящие о том, что АИФ способен взаимодействовать с Морталином *in vitro* и *in vivo*, мы исследовали изменение интенсивности этого взаимодействия на ранних стадиях апоптоза.

С этой целью клетки линии U87MG обрабатывали цисплатином [Pt(NH₃)₂Cl₂], широко используемым препаратом для химиотерапии многих типов опухолей. Чтобы определить концентрацию цисплатина, вызывающую апоптоз в большинстве клеток, мы оценили влияние различных количеств этого соединения на жизнеспособность клеток, окрашивая их Аламаровым голубым. Исходя из данных, представленных на рис. 3Б, для индукции апоптоза мы использовали цисплатин в концентрации 60 мкМ. Клетки обрабатывали цисплатином в течение 24 ч, после чего лизировали, и инкубировали лизат с магнитными частицами с иммобилизованным на них рекомбинантным Морталином. В качестве контроля использовали лизат нормальных, не обработанных цисплатином клеток. После инкубации и последующих промывок связавшиеся белки элюировали и проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Присутствие АИФ определяли с помощью иммуноблотинга с первичными антителами на этот белок. Из рис. 3В видно, что в нормальных клетках рекомбинантный Морталин взаимодействует с эндо-

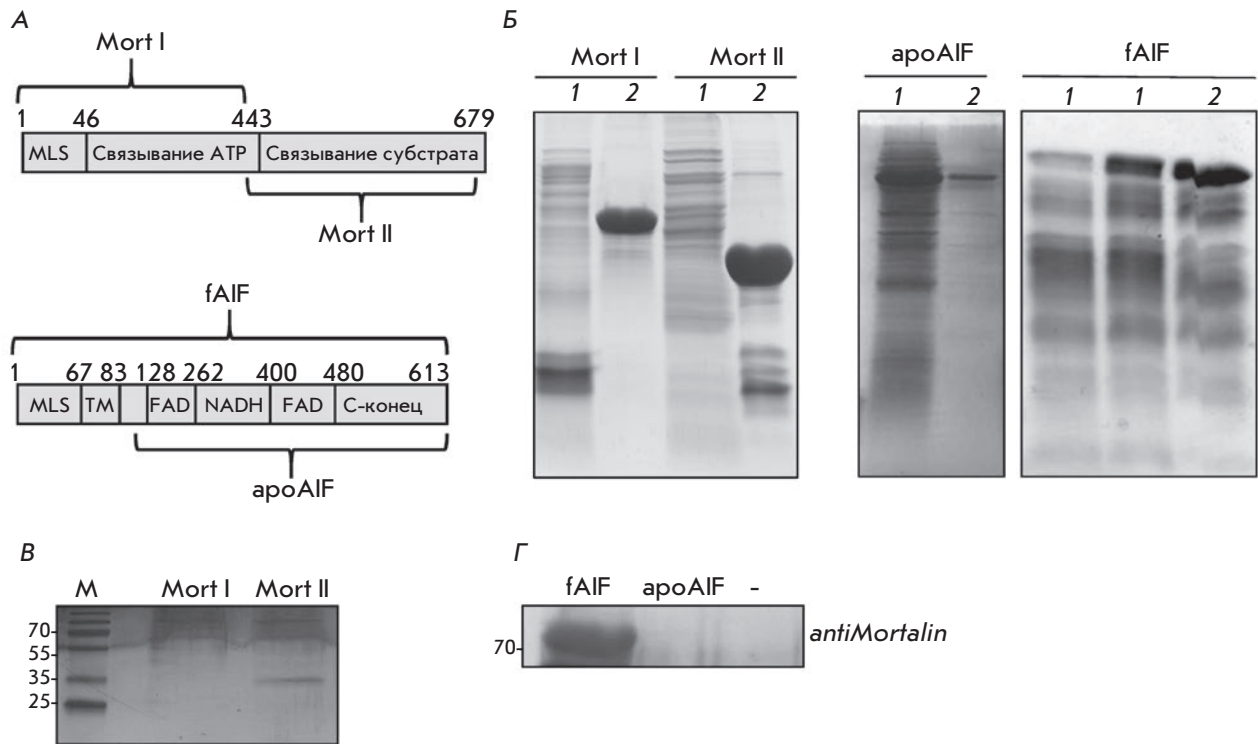


Рис. 2. Взаимодействие AIF и Морталина *in vitro*. **А** – схема белков Морталин и AIF с указанием рекомбинантных фрагментов, использованных в данной работе. **Б** – электрофореграмма, показывающая чистоту выделения рекомбинантных фрагментов Морталина и AIF из бактерий *E. coli* (1 – до оптимизации условий экспрессии и выделения; 2 – после оптимизации условий экспрессии и выделения). **В** – электрофореграмма, показывающая взаимодействие рекомбинантных фрагментов Морталина с полноразмерным AIF, иммобилизованным на магнитных частицах. **Г** – иммунодетекция эндогенного Морталина, элюированного с магнитных частиц, на которых были иммобилизованы рекомбинантные фрагменты AIF

генным полноразмерным AIF, но при индукции апоптоза интенсивность этого взаимодействия заметно снижается.

Правильность этого результата мы подтверждали с использованием метода PLA, а также широко известного индуктора апоптоза – стауроспорина. Принцип анализа PLA заключается в том, что фиксированные и пермеабелизированные клетки инкубируют с парой первичных антител к исследуемым белкам и парой вторичных антител, конъюгированных с олигонуклеотидами. Если олигонуклеотиды, соединенные с разными антителами, оказались достаточно близко друг от друга (такое происходит в случае взаимодействия исследуемых белков), то при добавлении ДНК-полимеразы на этих нуклеотидах начинается амплификация ДНК по принципу «разматывающегося кольца». Далее клетки инкубируют с флуоресцентно меченым олигонуклеотидным зондом, который отжигается в тех местах, где амплифицировалась соответствующая

ДНК. В результате внутриклеточные белок-белковые взаимодействия визуализируются в виде точечных флуоресцирующих областей, количество которых пропорционально интенсивности связывания исследуемых белков [23]. Как и в предыдущем эксперименте, мы определили концентрацию препарата, вызывающую апоптоз большинства клеток (рис. 4А). Используя PLA-анализ, мы изучили изменение интенсивности взаимодействия эндогенных AIF и Морталина после добавления стауроспорина (рис. 4Б,В). Полученные нами результаты показывают, что после индукции апоптоза интенсивность взаимодействий Морталин–AIF значительно снижается ($p < 0.05$), что соответствует данным, полученным в предыдущем эксперименте.

Исходя из результатов, описанных выше, можно предположить, что повышенное количество Морталина в раковых клетках может способствовать усилению связывания AIF с НММ, ведущему к более высокой устойчивости клеток к апоптозу и, как след-

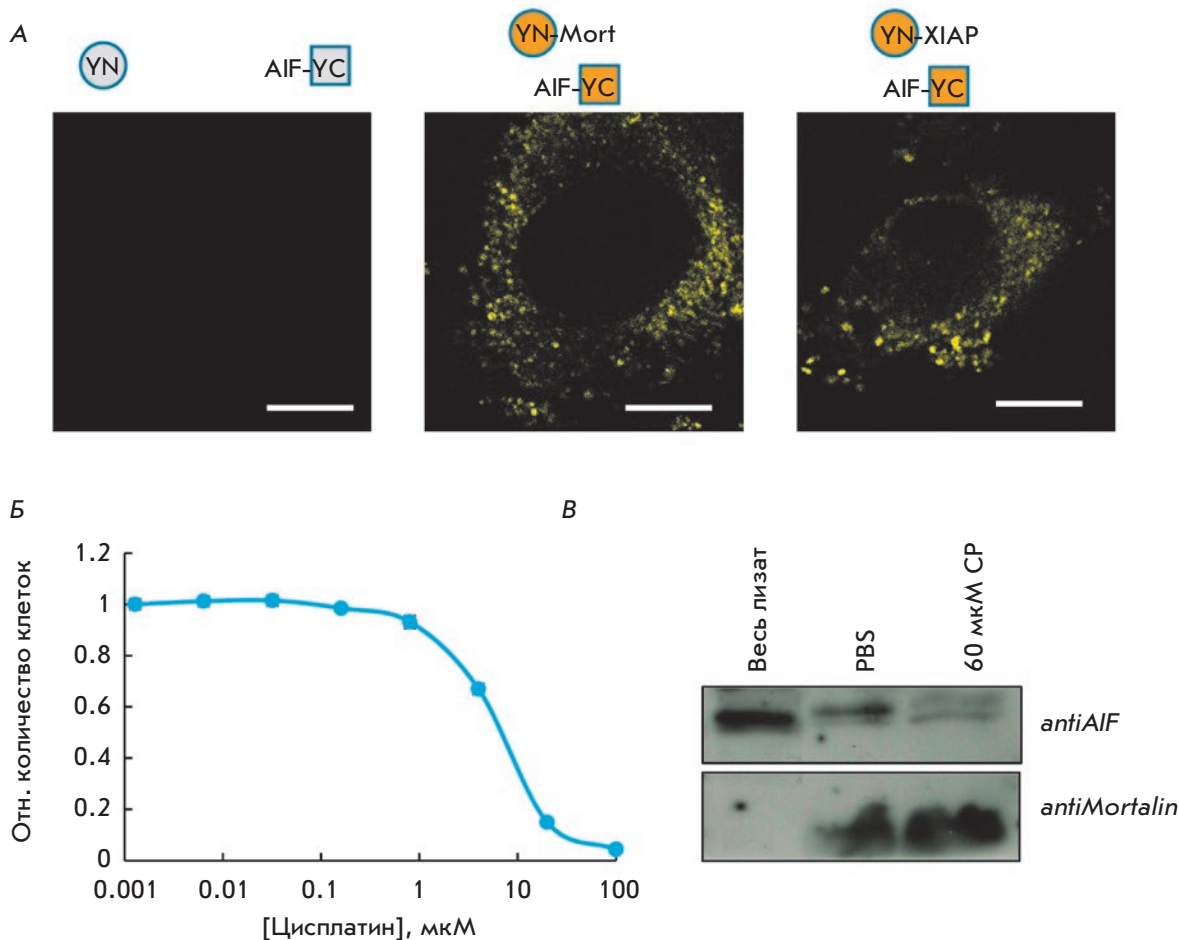


Рис. 3. Взаимодействие Морталина и AIF в живой клетке. **А** – флуоресценция YFP в клетках U87MG, коэкспрессирующих YC-AIF и YN (слева), YN-Mort (в центре) или YN-XIAP (справа). **Б** – выживаемость клеток U87MG, обработанных цисплатином в различных концентрациях. **В** – иммунодетекция эндогенного AIF из лизатов клеток U87MG, обработанных 60 мкМ цисплатина. Лизат пропускали через магнитные частицы с иммобилизованным полноразмерным Морталином, после чего связавшиеся белки элюировали и разделяли в полиакриламидном геле. В качестве контроля иммобилизации белка также проводили иммунодетекцию рекомбинантного Морталина

стве, к более агрессивному фенотипу опухоли. Возможную связь между экспрессией Морталина и выживаемостью пациентов мы проверили с использованием общедоступной базы данных Rembrandt, содержащей информацию об экспрессии генов и выживаемостью пациентов с опухолями головного мозга. Анализ этой базы данных (рис. 5) показал, что более высокая экспрессия Морталина статистически значимо коррелирует с плохой выживаемостью пациентов с глиобластомой.

ОБСУЖДЕНИЕ

Каспаз-независимый путь апоптоза состоит из двух стадий. Сначала AIF диссоциирует от митохондрии

альной мембраны, а затем цитоплазматический AIF импортируется в ядро клетки и активирует расщепление ДНК. Интересно, что вторая стадия этого процесса – перемещение AIF в ядро, ингибируется белком Hsp70, который, находясь в цитоплазме, связывается с участком AIF 150–228 а.о. [24]. Нами впервые показано, что во взаимодействии AIF с НММ участвует другой представитель семейства белков теплового шока – Морталин, связывающийся с участком 1–102 а.о. AIF. Таким образом, можно предположить, что белки теплового шока являются важными и на сегодняшний день единственными ингибиторами каспаз-независимого пути апоптоза. Белок Морталин может закреплять AIF на НММ и препят-

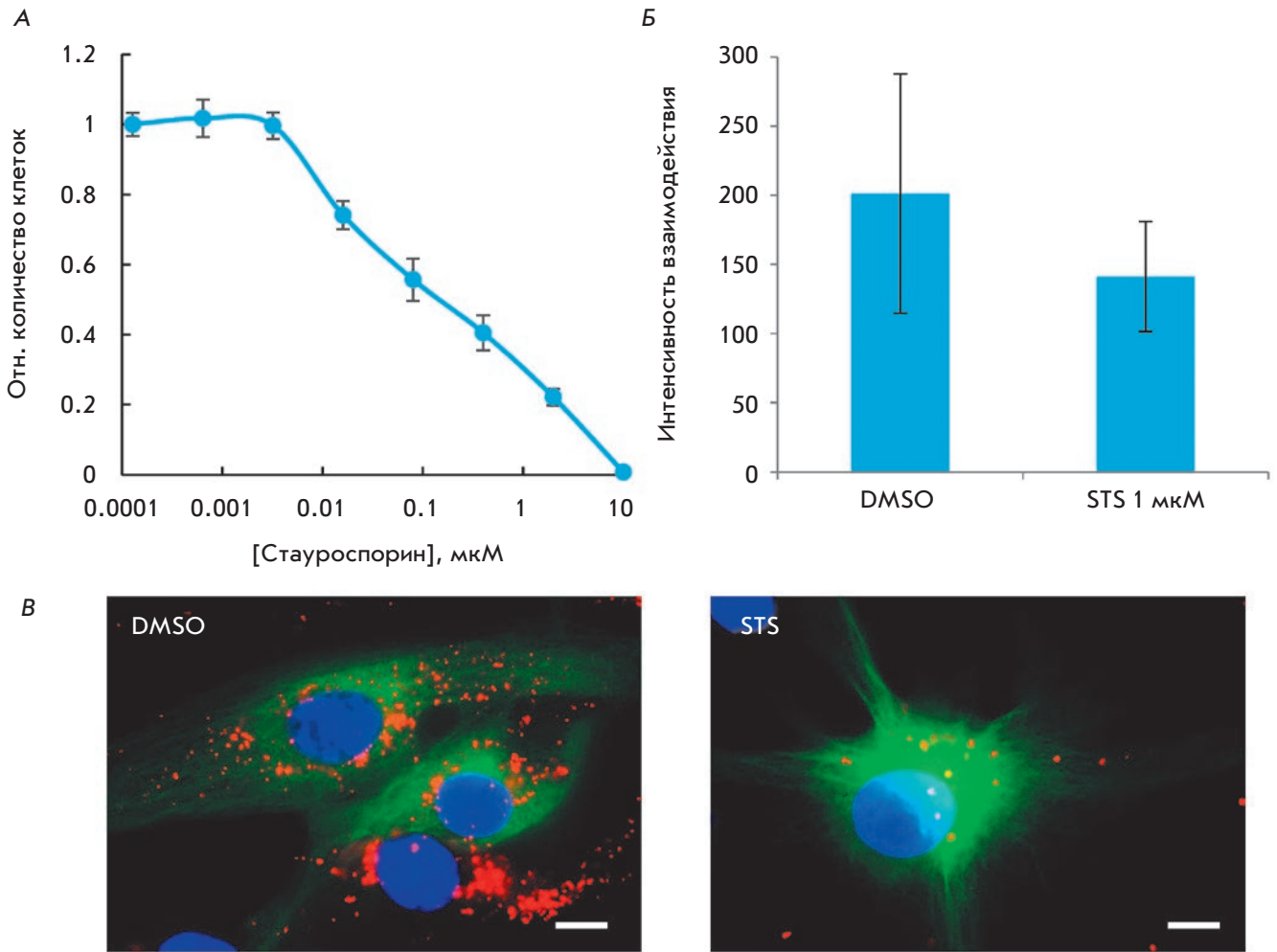


Рис. 4. Взаимодействие Морталина и AIF в фиксированных клетках. А – выживаемость клеток U87MG, обработанных различными концентрациями стауроспорина. Б – влияние стауроспорина на интенсивность взаимодействия AIF и Морталина, измеренную методом PLA, в клетках линии U87MG ($p < 0.05$). В – визуализация взаимодействия белков Морталина и AIF методом PLA после обработки 1 мкМ стауроспорина (STS) или DMSO

ствовать запуску апоптоза, однако если диссоциация AIF от НММ все-таки произошла, то белок Hsp70 ингибирует транслокацию AIF в ядро. Эта гипотеза хорошо согласуется с недавно опубликованными данными о том, что Морталин способен препятствовать апоптозу, закрепляя на внешней поверхности НММ другой важнейший белок, регулирующий ответ клетки на стресс, – HIF1a [21]. В подтверждение наших результатов мы показали, что повышенная экспрессия Морталина коррелирует с агрессивным фенотипом раковых клеток и, как следствие, является плохим прогностическим фактором для пациентов с опухолями головного мозга.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на значительное количество работ, посвященных изучению каспаз-независимого пути

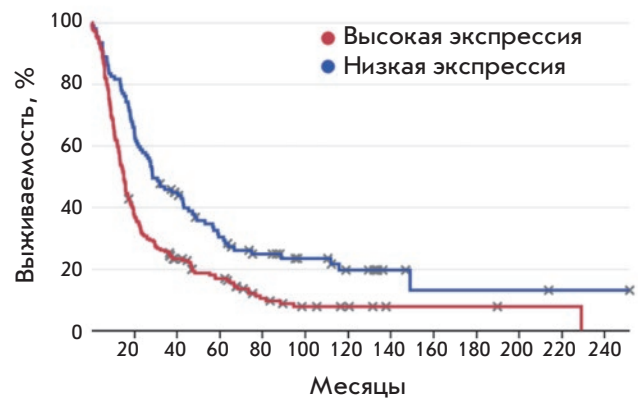


Рис. 5. Кривая Каплан–Майера, показывающая выживаемость двух групп пациентов с глиобластомой, выделенных на основании экспрессии Морталина. Данные получены из базы данных Rembrandt

апоптоза, первая и наиболее важная стадия этого процесса, а именно диссоциация AIF от наружной митохондриальной мембраны, до сих пор остается загадкой. Полученные нами результаты указывают на то, что в связывании AIF с НММ участвует белок Морталин. Для оценки вклада этого взаимодействия в локализацию AIF на НММ требуются дополнительные эксперименты. Однако имеющиеся у нас данные, а также результаты, опубликованные ранее, позволяют предположить, что при действии на клетку ДНК-повреждающих агентов в ядре вырабатывается поли-ADP-рибоза, которая перемещается в цитоплазму, где и связывается с AIF [8, 16]. Это взаимодействие приводит к изменению конформации AIF

и утрате им способности связываться с Морталином, закрепляющим AIF на НММ. В результате AIF диссоциирует от НММ, после чего перемещается в ядро и вызывает цепь событий, приводящих к гибели клетки. Однако необходимы дальнейшие исследования, которые позволят подтвердить взаимодействие эндогенных AIF и Морталина и докажут, что специфическое ингибирование связывания этих белков будет приводить к диссоциации AIF от НММ и последующей гибели клетки. ●

*Работа поддержана грантами
РФФИ № 16-34-60136, 17-29-06056 и 18-29-01027.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reed J.C. // *J. Clin. Oncol.* 1999. V. 17. P. 2941–2953.
2. Kühtreiber W.M., Hayashi T., Dale E.A., Faustman D.L. // *J. Mol. Endocrinol.* 2003. V. 31. P. 373–399.
3. Cao G., Xing J., Xiao X., Liou A.K., Gao Y., Yin X.M., Clark R.S., Graham S.H., Chen J. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 9278–9293.
4. Liu T., Biddle D., Hanks A.N., Brouha B., Yan H., Lee R.M., Leachman S.A., Grossman D. // *J. Invest. Dermatol.* 2006. V. 126. P. 2247–2256.
5. Mahmud H., Dälken B., Wels W.S. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. P. 1526–1535.
6. Galluzzi L., Joza N., Tasdemir E., Maiuri M.C., Hengartner M., Abrams J.M., Tavernarakis N., Penninger J., Madeo F., Kroemer G. // *Cell Death Differ.* 2008. V. 15. P. 1113–1123.
7. Choudhury S., Bae S., Ke Q., Lee J.Y., Kim J., Kang P.M. // *Basic Res. Cardiol.* 2011. V. 106. P. 397–407.
8. Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Sci. Signal.* 2011. V. 4. № 167. P. ra20.
9. Cho B.B., Toledo-Pereyra L.H. // *J. Invest. Surg.* 2008. V. 21. P. 141–147.
10. Norberg E., Orrenius S., Zhivotovsky B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 396. P. 95–100.
11. Lorenzo H.K., Susin S.A., Penninger J., Kroemer G. // *Cell Death Differ.* 1999. V. 6. P. 516–524.
12. Brown D., Yu B.D., Joza N., Bénit P., Meneses J., Firpo M., Rustin P., Penninger J.M., Martin G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 9918–9923.
13. Baritaud M., Boujrad H., Lorenzo H.K., Krantic S., Susin S.A. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 3166–3173.
14. Arnoult D., Parone P., Martinou J.C., Antonsson B., Estaquier J., Ameisen J.C. // *J. Cell. Biol.* 2002. V. 159. P. 923–929.
15. Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. // *Science.* 2002. V. 297. P. 259–263.
16. Yu S.W., Wang H., Dawson T.M., Dawson V.L. // *Neurobiol. Dis.* 2003. V. 14. P. 303–317.
17. Parsons D.F., Williams G.R., Chance B. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1966. V. 137. P. 643–666.
18. Wilkinson J.C., Wilkinson A.S., Galbán S., Csomos R.A., Duckett C.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 237–247.
19. Pavlyukov M.S., Antipova N.V., Balashova M.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Shakhparonov M.I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 23296–23307.
20. Yu S.W., Wang Y., Frydenlund D.S., Ottersen O.P., Dawson V.L., Dawson T.M. // *ASN Neuro.* 2009. V. 1(5). pii:e00021.
21. Mylonis I., Kourti M., Samiotaki M., Panayotou G., Simos G. // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. P. 466–479.
22. Londono C., Osorio C., Gama V., Alzate O. // *Biomolecules.* 2012. V. 2. P. 1431–1464.
23. Maszczak-Seneczko D., Sosicka P., Olczak T., Olczak M. // *Methods Mol. Biol.* 2016. V. 1496. P. 133–143.
24. Gurbuxani S., Schmitt E., Cande C., Parcellier A., Hammann A., Daugas E., Kouranti I., Spahr C., Pance A., Kroemer G., et al. // *Oncogene.* 2003. V. 22. P. 6669–6678.

УДК 577.21

Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев – новый компонент ENY2-содержащих комплексов дрозофилы

Н. А. Фурсова, Ю. В. Николенко, Н. В. Сошникова, М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева, А. Н. Краснов*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 18.05.2018

Принята к печати 28.09.2018

РЕФЕРАТ Ранее мы показали, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и позиционировании ориджинов репликации. В данной работе обнаружено, что ENY2 взаимодействует еще с одним белком – CG9890, который также содержит домен цинковых пальцев. Подтверждено взаимодействие ENY2 и CG9890. Показано, что белок CG9890 локализован в клеточном ядре и взаимодействует с белковыми комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIIID, TPO.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ENY2, CG9890, дрозофила, иммунопреципитация, цинковые пальцы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AMEX – комплекс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму; ENY2 – enhancer of yellow 2; C2H2 – цинковые пальцы типа C2H2; SAGA – гистон-ацетилтрансферазный комплекс; SWI/SNF – комплекс ремоделирования хроматина; ORC – комплекс позиционирования точек начала репликации в геноме.

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов эукариот – комплексный многофакторный процесс, который может происходить на нескольких последовательных этапах транскрипции (инициация и элонгация), процессинга мРНК, экспорта мРНК из ядра, трансляции и фолдинга белков [1]. Локальная структура хроматина, положение гена относительно функциональных ядерных компартментов и дальние взаимодействия регуляторных элементов являются дополнительным уровнем регуляции генетических процессов в контексте сложной организации генома эукариот в трехмерном пространстве ядра [2–4]. Белок ENY2 – мультифункциональный фактор, участвующий в различных стадиях экспрессии генов [5–15]. Разнообразные клеточные функции ENY2 определяются активностями тех белковых комплексов, в составе которых он обнаруживается. Так, ENY2 является субъединицей деубиквитирующего модуля SAGA – важного коактиватора транскрипции у дрозофилы [13, 16]. Этот комплекс обладает гистон-ацетилтрансферазной активностью. Вносимая им модификация узнается бромодоменами ремоделирующих хроматин комплексов семейства SWI/SNF, за счет чего происходит их привлечение на гены, регулируемые SAGA [17]. В результате активного ремоделирования структуры хроматина

происходит локальное удаление или дестабилизация нуклеосом, что создает благоприятные условия для связывания РНК-полимеразы и различных факторов транскрипции, необходимого для регуляции транскрипции [18, 19]. Кроме того, ENY2 обнаружен в составе комплекса AMEX, взаимодействующего с белками ядерной поры (NPC) и участвующего в экспорте мРНК из ядра [14]. Будучи общим компонентом двух указанных комплексов, ENY2 отвечает за локализацию части SAGA-регулируемых генов у ядерной поры, тем самым участвуя в создании локальных транскрипционно активных участков на периферии ядра. ENY2-зависимое позиционирование определенных генетических локусов вблизи NPC обеспечивает высокую скорость экспорта новосинтезированной РНК, что абсолютно необходимо при ответе на стресс или гормональный сигнал. Осуществляемое белком ENY2 привлечение комплексов, участвующих в создании участков локально открытого хроматина, играет важную роль в обеспечении барьерной активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов [15]. Кроме того, Su(Hw) – первый белок высших эукариот, роль которого была показана в позиционировании ориджинов репликации в геноме дрозофилы [20, 21]. Привлечение комплексов SAGA и dSWI/SNF на сайты связывания этого белка приводит к образованию областей с низкой

локальной плотностью нуклеосом, что способствует связыванию комплекса ORC, ответственного за сборку преинициаторного комплекса репликации. По всей видимости, ENY2-содержащие комплексы принимают участие не только в регуляции экспрессии генов, но также важны для синхронизации транскрипции и репликации в ходе клеточного цикла.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии и трансфекция

В работе использовали линию клеток S2 *Drosophila melanogaster*. Трансфекцию клеток проводили при помощи Effectene Transfection Reagent (Qiagen) по протоколу производителя. Генетическая конструкция, использованная для трансфекции, кодировала белок CG9890, маркированный 3×FLAG-эпитопом.

Антитела

Были использованы следующие антитела: полученные в нашей лаборатории поликлональные кроличьи антитела к GCN5, Xmas-2, OSA, N-концу TBP, Thoc5, ORC2, ORC3, PB, Moira, любезно предоставленные L. Tora кроличьи антитела к ADA2b. Поликлональные антитела α-CG9890 получены из сыворотки крови кролика, иммунизированного полноразмерным белком CG9890, экспрессированным в *Escherichia coli*. Все кроличьи антитела были очищены. Концентрация всех антител, полученных в лаборатории, составляла около 1 мг/мл. Также использовали мышьиные антитела против ламина Dm0 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences), антитела к FLAG-эпитопу (Sigma), а также антитела к FLAG-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена. Разведение коммерческих антител 1 : 500, разведение антител, полученных в лаборатории, варьировало для получения оптимального сигнала на вестерн-блоте. В качестве вторичных антител использовали антитела козы или осла к иммуноглобулинам кролика и мыши, узнающие как полноразмерные иммуноглобулины, так и специфичные только к легким цепям антител (разведение 1 : 5000). Вторичные антитела были конъюгированы с пероксидазой хрена. Кроме того, для флуоресцентной микроскопии использовали вторичные антитела Cy3 и AlexaFluor™ 488 (разведение 1 : 500).

Иммунофлуоресцентная микроскопия клеток линии S2 *D. melanogaster*

Прикрепившиеся к покровным стеклам клетки линии S2 дважды промывали 1×PBS, фиксировали 3.7% ПФА (рН 7.5) в течение 10 мин, промывали

1×PBS 2 раза по 5 мин. Затем обрабатывали 0.2% раствором Triton X-100 в 1×PBS в течение 5 мин, промывали 1×PBS 2 раза по 5 мин, после чего в течение 10 мин инкубировали в 3% обезжиренном сухом молоке, разведенном в 1×PBS. Первичные антитела разводили в 3% молоке/PBS, препараты инкубировали с антителами (1 ч, комнатная температура, влажная камера). Использовали антитела мыши против ламина Dm0 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences) в разведении 1 : 5000, поликлональные антитела кролика против CG9890 (разведение 1 : 1000). Препараты промывали 3 раза по 5 мин в 1×PBS, затем инкубировали со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере, закрытой фольгой. В качестве вторичных антител использовали: антитела против IgG (H+L) кролика, конъюгированные с Cy3 (Amersham), антитела против IgG мыши, конъюгированные с AlexaFluor 488 (Molecular Probes) в разведении 1 : 500. Закрытые фольгой препараты промывали 3 раза по 5 мин в 1×PBS и инкубировали с DAPI (разведение 1 : 1000, Sigma) в течение 10 с. Препараты отмывали в течение 5 мин в 1×PBS. После высушивания покровное стекло заключали в трис-глицериновый буфер (Vectashield) на предметном стекле. Края покровного стекла покрывали лаком во избежание высыхания препарата и попадания иммерсии внутрь него. Препараты смотрели непосредственно после получения, используя световой микроскоп Leica. Использовали объектив ×100 с иммерсией. Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ.

Иммунопреципитация

Для выделения ядер клетки центрифугировали в течение 5 мин при 500g при +4°C. Осадок промывали 1 мл буфера LB cyto 3 (3 mM MgCl₂, 20 mM HEPES NaOH, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия (ингибитор деацетилаз) до конечной концентрации 20 mM. Затем проводили повторное центрифугирование в тех же условиях, тщательно ресуспендировали осадок клеток в 200 мкл буфера LB cyto 3 с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 10 mM и ингибитора протеаз (Protease Inhibitor Cocktail (PIC), Roche). После чего инкубировали на льду в течение 15 мин. После центрифугирования избавлялись от супернатанта, и далее использовали только ядерную фракцию.

Осадок ядер растворяли в 500 мкл MN буфера III (20 mM HEPES KOH, 3 mM MgCl₂, 0.1% NP40, 0.1 M KCl, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 20 mM (ингибитор деацетилаз) и ингибитора протеаз (PIC, Roche). ДНК фрагменти-

ровали, обрабатывая клетки ультразвуком (2 раза по 10 с, перерыв 1 мин, средняя мощность прибора) на льду. После ресуспендирования клетки инкубировали в течение 30 мин с 2 ед. ДНКазы I на льду и центрифугировали при 16 000g в течение 20 мин при +4°C.

Для коиммунопреципитации использовали поликлональные антитела к белку CG9890 и иммуноглобулины сыворотки крови неиммунизированного кролика в качестве отрицательного контроля. Антитела были иммобилизованы на Mab-сефарозе.

Лизат клеток линии S2 (200 мл) инкубировали с 15 мкл 50% Mab-сефарозы с иммобилизованными на ней антителами в течение 3 ч на качалке при +4°C. Сефарозу отмывали буфером MN III (3 раза по 10 мин) при +4°C. Результаты анализировали с помощью вестерн-блотинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ взаимодействия белков ENY2 и CG9890

Ранее с целью идентификации новых белковых партнеров ENY2 был проведен скрининг библиотеки кДНК эмбрионов дрозофилы в двугибридной дрожжевой системе. Идентифицировали более 10 взаимодействующих белков, часть из которых была изучена [11–15, 20–22]. В ходе скрининга выявили взаимодействие ENY2 с еще неохарактеризованным белком CG9890, изучению которого посвящена данная статья. Как предсказывает биоинформатический анализ аминокислотной последовательности CG9890, он относится к семейству белков, несущих домен цинковых пальцев C2H2 – самый часто встречающийся у эукариот ДНК-связывающий мотив [23]. Белки этого семейства вовлечены в разнообразные клеточные функции, что обеспечивается возможностью участия домена цинковых пальцев в специфическом узнавании не только ДНК, но также РНК и белков [24–26]. Для подтверждения взаимодействия белков ENY2 и CG9890 была создана генетическая конструкция для экспрессии белка CG9890, маркированного 3×FLAG-эпитопом. Создана линия клеток *S2 D. melanogaster*, экспрессирующая этот слитый белок, и проведена его иммунопреципитация из лизата клеток с использованием антител к белку ENY2 и неспецифических антител в качестве отрицательного контроля. Результаты иммунопреципитации анализировали с помощью вестерн-блотинга и детектировали с помощью антител к эпитопу 3×FLAG (Sigma). Как видно на *рис. 1*, антитела к белку ENY2 преципитируют белок 3×FLAG CG9890 (дорожка 3), в то время как неспецифические антитела не преципитируют (дорожка 2). Таким образом подтверждено взаимодействие белков ENY2 и CG9890.

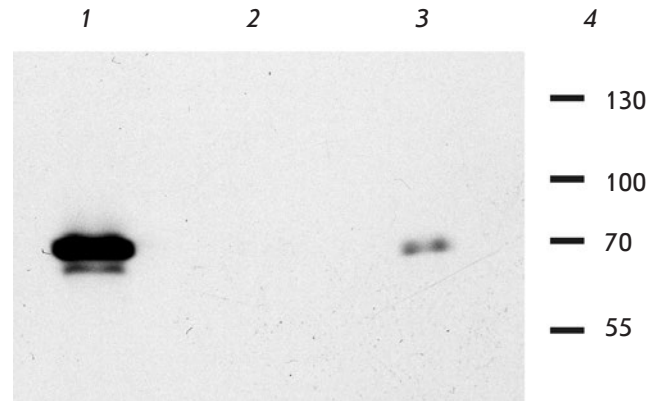


Рис. 1. Проверка взаимодействия белков ENY2 и CG9890. Вестерн-блот-анализ коиммунопреципитации ENY2 и CG9890, маркированного эпитопом 3×FLAG, из лизата трансформированных клеток S2. Для иммунопреципитации использовали антитела к белку ENY2 и неспецифические антитела из предыдущей сыворотки (как негативный контроль). Вестерн-блотинг проводили с использованием антител к эпитопу 3×FLAG (Sigma). 1 – исходный лизат клеток; 2 – иммунопреципитация с использованием неспецифических антител; 3 – иммунопреципитация с использованием антител к ENY2; 4 – маркер молекулярной массы

Для дальнейшего изучения CG9890 получены поликлональные антитела к этому белку и аффинно очищены на колонке, содержащей рекомбинантный белок CG9890. Анализ специфичности антител с помощью вестерн-блотинга показал, что данные антитела узнают полосу в районе 60 кДа, что близко к расчетной массе белка 53 кДа (данные не представлены).

Изучение внутриклеточной локализации белка CG9890

Внутриклеточную локализацию белка CG9890 определяли с использованием иммуноокрашивания клеток линии S2 дрозофилы охарактеризованными нами поликлональными антителами. Результаты эксперимента представлены на *рис. 2*. В результате анализа серии микрофотографий установлено, что белок CG9890 локализуется преимущественно в клеточном ядре, хотя некоторое его количество присутствует и в цитоплазме.

Анализ взаимодействий белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов

Так как было подтверждено взаимодействие белков ENY2 и CG9890, предположили, что CG9890 участвует в некоторых ENY2-зависимых процессах, а его взаимодействие с отдельными партнера-

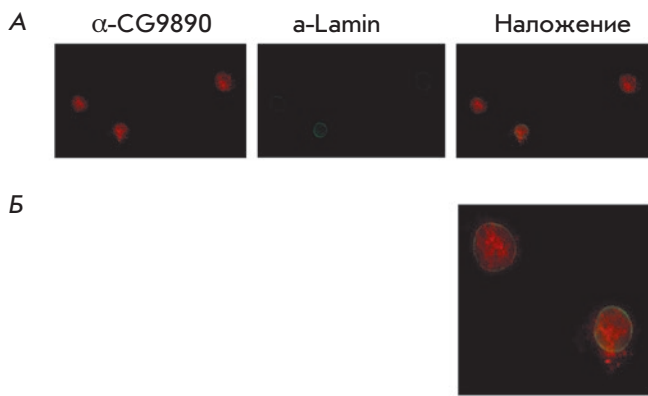


Рис. 2. Иммуноокрашивание клеток линии S2 *D. melanogaster*, трансфицированных конструкцией 3×FLAG_CG9890. А – для окрашивания использовали очищенные кроличьи поликлональные антитела к CG9890 (первая панель) и моноклональные антитела мыши к ламину (вторая панель). В качестве вторичных антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с Cy3, и антимышинные антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488. На третьей панели показано совмещенное изображение предыдущих панелей. Б – увеличенное изображение части третьей панели

ми ENY2 может определять механизм его функционирования в клетке. Для проверки данной гипотезы было решено исследовать, с какими субъединицами ENY2-содержащих комплексов взаимодействует белок CG9890. С этой целью проведен эксперимент по иммунопреципитации белков из лизата клеток S2 *D. melanogaster* поликлональными антителами α-CG9890 с последующим вестерн-блот-анализом, результаты которого представлены на рис. 3.

В результате проведенных экспериментов обнаружено взаимодействие белка CG9890 с белками, входящими в состав различных ENY2-содержащих комплексов. В частности, с субъединицами ORC2 и ORC3 комплекса ORC, участвующего в позиционировании ориджинов репликации. Также обнаружены взаимодействия с такими белками, принимающими участие в регуляции транскрипции, как TBP (субъединица комплекса TFIID – функционального партнера ENY2), GCN5 (субъединица гистон-ацетилтрансферазного комплекса SAGA, содержащего ENY2), Thoc5 (субъединица ENY2-содержащего комплекса ТНО, участвующего в формировании мРНК и элонгации транскрипции). Факт взаимодействия CG9890 с комплексами, вовлеченными в транскрипцию, согласуется с данными о ядерной локализации этого белка. Также нами выявлено взаимодействие CG9890 с белком Polybromo (PB) – субъединицей ремодели-

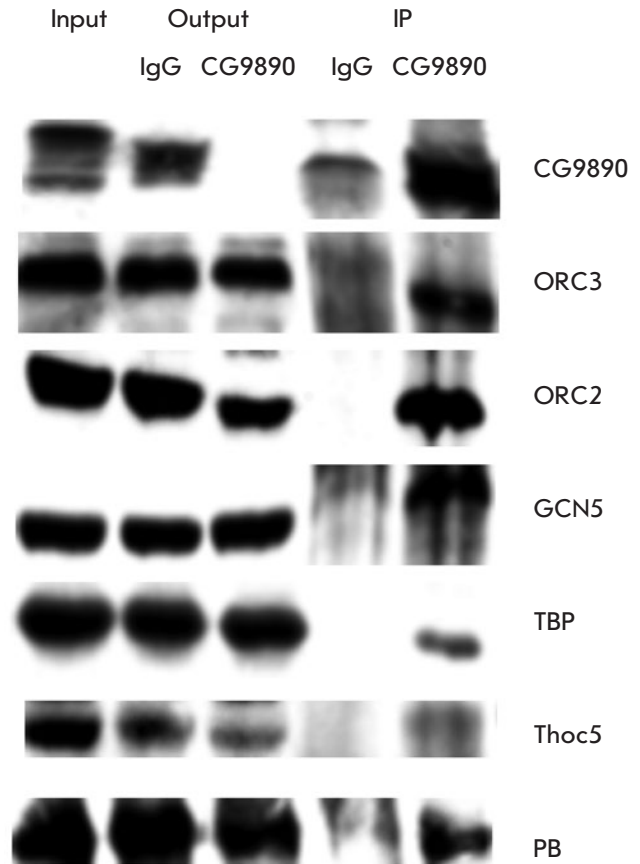


Рис. 3. Коиммунопреципитация белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов. Для иммунопреципитации использовали антитела к белку CG9890 и неспецифические антитела из предиммунной сыворотки (как негативный контроль). Input – 2.5% исходного лизата клеток; Output – несвязавшаяся фракция лизата после инкубации с неспецифическими антителами (IgG) или антителами к белку CG9890; IP – 10% элюата с сефарозы (IgG или CG9890). Субъединицы ENY2-содержащих комплексов детектировали с помощью вестерн-блотинга с использованием соответствующих антител (указаны справа)

рующего хроматин комплекса dSWI/SNF, необходимого для создания области открытого хроматина при активации промотора. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось (данные не представлены). Таким образом, CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не с комплексом AMEX, связанным с экспортом мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на участие CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно и в регуляции транскрипции, и в позиционировании ориджинов репликации. В данной работе нами выявлено взаимодействие ENY2 еще с одним белком – CG9890, который, как и Su(Hw), содержит домен цинковых пальцев. По аналогии с Su(Hw) мы предполагаем, что CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя таким образом регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. Нами показано, что белок CG9890 локализован в ядре клетки. Подтверждено взаимодействие ENY2

и CG9890. Биохимическими методами выявлена связь белка CG9890 с ENY2-содержащими комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPOC. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось. Таким образом, CG9890 взаимодействует с комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не с комплексом AMEX, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на «работу» CG9890 на первых стадиях транскрипционного цикла. Кроме того, CG9890 взаимодействует с комплексом ORC, необходимым для позиционирования точек начала репликации. ●

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 17-04-02193.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Orphanides G., Reinberg D. // Cell. 2002. V. 108. № 4. P. 439–451.
- Maksimenko O., Georgiev P. // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 28.
- van Bommel J.G., Pagie L., Braunschweig U., Brugman W., Meuleman W., Kerkhoven R.M., van Steensel B. // PLoS One. 2010. V. 5. № 11. P. e15013.
- Rando O.J., Chang H.Y. // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 245–271.
- Mardanov P.V., Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. // Genetika. 2005. V. 41. № 4. P. 536–541.
- Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Ramensky V.E., Mardanov P.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 20. P. 6654–6661.
- Georgieva S.G., Nabirochkina E.N., Pustovoitov M.V., Krasnov A.N., Soldatov A.V. // Genetika. 2001. V. 37. № 1. P. 18–23.
- Orlova A.V., Kopytova D.V., Krasnov A.N., Nabirochkina E.N., Ilyin Y.V., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 434. P. 227–231.
- Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 1. P. 86–96.
- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481.
- Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Nabirochkina E.N., Soshnikova N.V., Georgieva S.G., Krasnov A.N. // Genetika. 2009. V. 45. № 3. P. 330–335.
- Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Nabirochkina E.N., Nikolenko Iu V., Shidlovskii Iu V., Georgieva S.G., Krasnov A.N. // Genetika. 2009. V. 45. № 10. P. 1332–1340.
- Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawatsubashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., et al. // Mol. Cell. 2008. V. 29. № 1. P. 92–101.
- Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. // EMBO J. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // Mol. Cell. 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
- Helmlinger D., Tora L. // Trends Biochem. Sci. 2017. V. 42. № 11. P. 850–861.
- Baker S.P., Grant P.A. // Oncogene. 2007. V. 26. № 37. P. 5329–5340.
- Mazina M.Y., Nikolenko Y.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // Genetika. 2016. V. 52. № 2. P. 164–169.
- Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E. // Cell Biosci. 2016. V. 6. P. 15.
- Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730.
- Mazina M., Vorob'eva N.E., Krasnov A.N. // Tsitologiya. 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
- Krasnov A.N., Vorobyeva N.E., Mazina M.Y. // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 479. № 1. P. 80–82.
- Razin S.V., Borunova V.V., Maksimenko O.G., Kantidze O.L. // Biochemistry (Mosc.). 2012. V. 77. № 3. P. 217–226.
- Brayer K.J., Segal D.J. // Cell Biochem. Biophys. 2008. V. 50. № 3. P. 111–131.
- Brown R.S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2005. V. 15. № 1. P. 94–98.
- Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.

УДК 612.036.576.314.547.915.5

Комплекс Tag7–Mts1 вызывает миграцию лимфоцитов, взаимодействуя с рецепторами CCR5 и CXCR3

Т. Н. Шарапова, Е. А. Романова, Л. П. Сащенко, Д. В. Яшин*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: yashin_co@mail.ru

Поступила в редакцию 02.08.2018

Принята к печати 02.10.2018

РЕФЕРАТ Обнаружение новых хемокинов, индуцирующих миграцию лимфоцитов к очагу поражения, важно для направленного поиска средств для иммунотерапии. Недавно мы показали, что белок Tag7 (PGLYRP1) системы врожденного иммунитета образует с Ca^{2+} -связывающим белком Mts1 (S100A4) стабильный комплекс, способный индуцировать движение лимфоцитов, хотя каждый из этих белков, взятый по отдельности, такой активностью не обладает. Цель настоящего исследования состояла в выявлении рецепторов, индуцирующих миграцию лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, и компонентов этого комплекса, способных взаимодействовать с этими рецепторами. В работе изучена миграция РВМС человека под действием комплекса Tag7–Mts1. Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров выделяли с помощью стандартной процедуры центрифугирования в градиенте Ficoll-Нураque. Установлено, что движение мононуклеарных клеток периферической крови по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1 индуцируется классическими хемотаксическими рецепторами CCR5 и CXCR3. Показано, что только Mts1 способен связываться с внеклеточным доменом CCR5, однако этого связывания недостаточно для индукции движения клеток. Сравнительный анализ первичной и пространственной структур трех белков выявил гомологию фрагментов аминокислотных последовательностей белков комплекса Tag7–Mts1 с различными участками лиганда CCR5-рецептора – белка MIP1 α . Следует отметить, что комплекс Tag7–Mts1 можно рассматривать как новый лиганд классических хемотаксических рецепторов CCR5 и CXCR3.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА комплекс Tag7–Mts1, хемотаксис, хемокин, хеморецептор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови; HLA – антиген тканевой совместимости (лейкоцитарный антиген человека); CCR5 и CXCR3 – хеморецепторы; TNFR1 – рецептор фактора некроза опухоли; TNF α – фактор некроза опухоли; Tag7 (PGLYRP1) – белок врожденного иммунитета; Mts1 (S100A4) – Ca^{2+} -связывающий белок; MIP1 α – воспалительный белок макрофагов, хемокин; NK – естественные киллеры; PMSF – *n*-фенилметилсульфонилфторид.

ВВЕДЕНИЕ

Для развития иммунного ответа необходимы, как минимум, два этапа: активация эффекторных лимфоцитов, способных убивать чужеродные клетки, и доставка их к очагу поражения. Поэтому для понимания процессов иммунной защиты следует иметь представление как о цитотоксических, так и о хемотаксических механизмах [1]. Важен также и поиск новых стимуляторов цитотоксичности и хемотаксичности.

Цитокины, вызывающие миграцию лимфоцитов, именуется хемокинами. Одна из особенностей структуры хемокинов – две характерные дисульфидные связи. В зависимости от взаимного расположения

первых двух N-концевых остатков цистеина хемокины делят на четыре класса (CC, C, CXC, CX₃C) [2]. Индукция хемотаксиса происходит через взаимодействие со специфическими хемотаксическими рецепторами. Эти рецепторы относятся к большой группе трансмембранных рецепторов, сопряженных с G-белком [3]. Взаимодействие хемокина с рецептором вызывает диссоциацию β -, γ -субъединиц G-белка, что приводит к активации каскада протеинкиназ и увеличению концентрации ионов Ca^{2+} [4, 5].

Вторая структурная особенность хемокинов – их небольшая молекулярная масса (от 8–10 кДа) [6], но встречаются стимуляторы миграции лимфоцитов

как с большей, так и с меньшей молекулярной массой [7]. Недавно мы показали, что миграцию лимфоцитов может вызывать комплекс из двух белков: Tag7 и Mts1 [8].

Mts1 (S100A4) принадлежит к семейству Ca^{2+} -связывающих белков. Известно, что он вовлечен в процесс метастазирования опухолевых клеток [9–12]. В то же время его ген активно экспрессируется в клетках иммунной системы, участвующих в противоопухолевой защите. Ранее мы показали, что Mts1 на поверхности CD4⁺ лимфоцитов участвует в узнавании HLA-отрицательных опухолевых клеток и способствует их лизису [13].

Белок Tag7 (PGLYRP1), ген которого был открыт в нашем институте, является белком системы врожденного иммунитета, участвующим как в антибактериальной, так и в противоопухолевой защите [14–16]. Подобно цитокинам, Tag7 способен активировать цитотоксичность лимфоцитов. В комплексе с основным белком теплового шока Tag7 оказывает цитотоксическое действие на TNFR1-несущие опухолевые клетки и тормозит рост опухоли [17, 18]. Он способен взаимодействовать с белком Mts1 с образованием стабильного хемоаттрактивного комплекса, вызывая миграцию лимфоцитов, при этом ни Mts1, ни Tag7, взятые по отдельности, такой активностью не обладают [8]. В связи с этим интересно выяснить, почему хемотаксическая активность появляется только после образования комплекса.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении рецепторов, индуцирующих миграцию клеток по градиенту концентрации Tag7–Mts1 и белка двухкомпонентного комплекса, способного взаимодействовать с этими рецепторами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Белки

Рекомбинантные белки Mts1 (S100A4) и Tag7 (PGLYRP1) экспрессировали в штамме *Escherichia coli* M15[pREP4] (Qiagen, США), содержащем плазмиду pQE-30 (Qiagen, США). В плазмиды pQE-30 ранее были клонированы кДНК белка Tag7 или Mts1. Mts1 очищали на Ni-NTA-агарозе (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Tag7 выделяли и очищали как описано в [19].

Сравнение первичных и пространственных структур белков проводили с использованием <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> и базы данных <https://ncbi.nlm.nih.gov/>.

Клеточные культуры

В работе использовали мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), полученные из лей-

комассы здоровых доноров последовательным центрифугированием в градиенте Ficoll-Нураque (GE Healthcare, Швеция) как описано в [20].

Проточная цитофлуориметрия

Клетки фиксировали в 4% формальдегиде (Sigma) и инкубировали с антителами к CCR5 и CXCR3 (Abcam, Великобритания) в течение ночи, а затем с антикроличьими IgG-PE (Beckman coulter, США) в темноте при 4°C в течение 2 ч. В каждой пробе анализировали не менее 10⁴ клеток. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 MPL (Beckman coulter, США), данные обрабатывали в EXPO32 software (Applied Cytometry Systems, Sheffield, Великобритания).

Анализ хемотаксической активности

Для измерения хемотаксической активности использовали камеру Бойдена (Costar Corning Inc., США), в верхнюю часть которой добавляли 200×10³ клеток РВМС, в нижнюю – хемоаттрактант в концентрации 10⁻⁹ М в среде RPMI 1640 (Gibco, США). Количество клеток, прошедших через мембрану, измеряли через 1.5 ч с помощью МТТ-теста (Sigma, США). В случае с преинкубацией антитела (в разведении 1 : 1000) или белки (Tag7, Mts1 в концентрации 10⁻⁸ М) добавляли к РВМС и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂, после чего дважды промывали средой. Все диаграммы, если не указано иначе, построены на основе не менее трех независимых экспериментов. Для статистической обработки использовали метод двусторонней ANOVA.

Детекция хеморецепторов

Клетки РВМС (~250 млн) суспендировали в 1.5 мл солюбилизационного буфера: 50 мМ Трис, рН 7.5 с PMSF (Sigma, США) (1 мМ) и коктейлем ингибиторов протеаз (Calbiochem, Германия) в концентрации, указанной изготовителем, и детергентом Triton X-100 (Sigma, США) (1% по объему). После инкубации на качалке в течение 30 мин на льду полученную суспензию разводили в 10 раз, добавляя солюбилизационный буфер, не содержащий детергент, и центрифугировали при 185000 g (Beckman L7 Ultracentrifuge, США) в течение 1 ч при 4°C. Супернатант отбирали и наносили на BrCN-сефарозную колонку с конъюгированным Mts1. Связавшиеся белки разделяли с помощью 12% SDS-ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и детектировали методом вестерн-блоттинга со специфическими антителами к CCR5 и CXCR3 (1 : 1000) и вторичными антикроличьими антителами (1 : 10000), конъюгированными с пероксидазой хрена, и проявляли с помощью набора ECL Plus (Amersham,

Великобритания) согласно рекомендациям производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хемотаксические рецепторы CCR5 и CXCR3 индуцируют движение лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1

На первом этапе исследования мы выявляли рецепторы, участвующие в передаче хемотаксического сигнала от описанного нами нового хемокина – Tag7–Mts1-комплекса. Ранее мы показали, что под действием этого комплекса могут направленно двигаться Т-лимфоциты и NK-клетки [8]. Поэтому мы оценивали присутствие на РВМС хемотаксических рецепторов CCR5 и CXCR3, наиболее высоко представленных на поверхности Т-лимфоцитов и NK-клеток.

С помощью проточной цитофлуориметрии и высокоспецифичных антител мы показали, что исследуемые популяции РВМС содержат 54.8% клеток, несущих на поверхности рецептор CCR5, а клетки, экспрессирующие CXCR3, составляют 58.1% от общей популяции РВМС, т.е. оба рецептора присутствуют на РВМС (рис. 1А).

Далее мы проверяли, участвуют ли эти рецепторы в индукции миграции лимфоцитов по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1. С этой целью РВМС инкубировали с антителами к CCR5 или CXCR3 и исследовали движение этих клеток под действием комплекса Tag7–Mts1 (рис. 1Б). Можно видеть, что, в отличие от белков Tag7 и Mts1, взятых по отдельности, комплекс Tag7–Mts1 вызывает движение РВМС. Преинкубация с антителами к CCR5 практически полностью блокирует хемотаксис. В то же время антитела к CXCR3 снижали миграцию РВМС не более чем на 20%. Таким образом, оба исследуемых рецептора способны индуцировать движение клеток по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1, но обладают различным сродством к этому комплексу. Учитывая более сильное ингибирование движения клеток антителами к CCR5, можно предположить, что пространственная структура функциональных участков комплекса Tag7–Mts1, участвующих во взаимодействии с CCR5, больше похожа на пространственную структуру участков СС-хемокинов – лигандов рецептора CCR5, обеспечивающих взаимодействие в комплексе.

Mts1 может связываться с хемотаксическими рецепторами

Далее мы определяли, какой из белков двухкомпонентного комплекса может взаимодействовать с рецепторами. Мы предварительно инкубировали РВМС с Tag7 или с Mts1 и исследовали миграцию

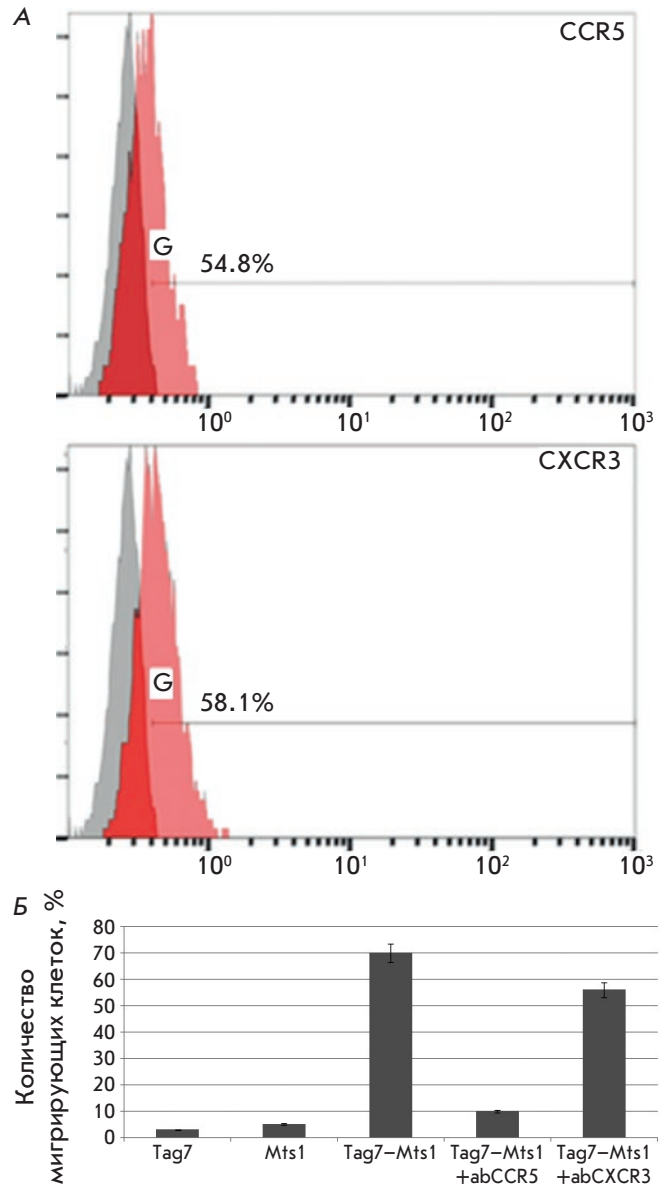


Рис. 1. Хемотаксис РВМС под действием Tag7–Mts1 осуществляется через взаимодействие с рецепторами CCR5 и CXCR3. А – экспрессия CCR5 и CXCR3 на поверхности мононуклеарных клеток. По оси абсцисс – количество событий, по оси ординат – средняя интенсивность флуоресценции. Серый пик – изотипический контроль вторичными антителами. Б – антитела к рецепторам CCR5 и CXCR3 блокируют хемотаксическую активность РВМС

таких клеток под действием комплекса Tag7–Mts1. На рис. 2А представлены результаты пяти независимых экспериментов без усреднения. Можно видеть, что в четырех случаях инкубация с Tag7 практически не влияет на подвижность клеток, а предварительная инкубация с Mts1 резко снижает движение

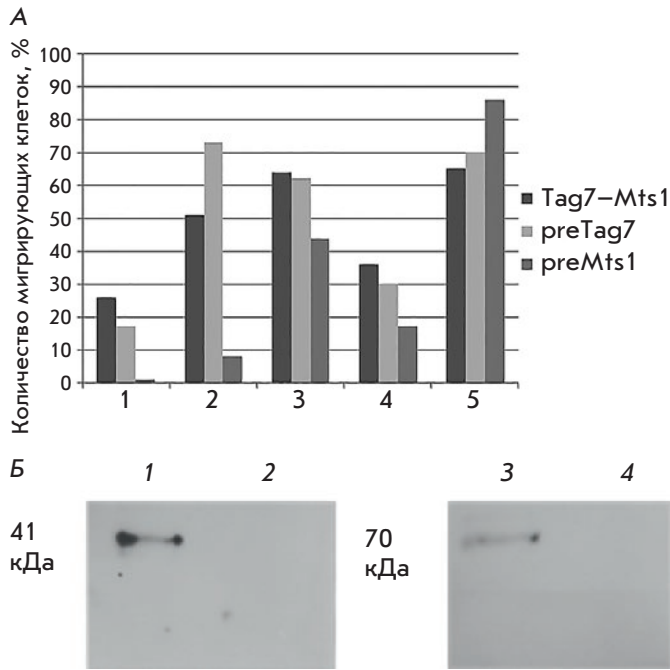


Рис. 2. Mts1 может связываться с CCR5 и ингибировать активность хемотаксиса. А – Mts1 способен блокировать хемотаксис РВМС. По оси абсцисс представлены результаты хемотаксиса от пяти доноров. Б – Mts1 связывается с рецепторами CCR5 и CXCR3. Взаимодействующие с Mts1 белки (1, 3) и несвязавшийся материал (2, 4) окрашивали специфическими антителами к CCR5 (1 и 2) и CXCR3 (3 и 4)

РВМС. Наблюдаемые отклонения, возможно, зависят от иммунного статуса донора. Совпадение исследуемых эффектов в четырех случаях позволяет предположить, что Mts1 может связываться с рецептором.

Для проверки этого предположения мы изучили возможность связывания CCR5 и CXCR3 с Mts1 с помощью аффинной хроматографии. На колонку с Mts1, иммобилизированной на Br-CN-сефарозе, наносили солиubilизированные мембранные белки РВМС, специфически связавшийся материал анализировали с помощью 12% SDS-ПААГ с последующим вестерн-блотингом (рис. 2Б). Антитела к CCR5 выявили белок 41 кДа, а антитела к CXCR3 – белок с 70 кДа, соответствующие по молекулярной массе этим рецепторам. Можно видеть более слабое связывание CXCR3 с Mts1, что подтверждает предположения о более высоком сродстве хемоаттрактивного комплекса Tag7-Mts1 к рецептору CCR5.

Таким образом, Mts1 может связываться с CCR5-рецептором, но этого недостаточно для индукции движения клеток. Однако, взаимодействуя с CCR5, он препятствует связыванию с ним двухкомпонентного хемоаттрактанта и ингибирует движение клеток по градиенту концентрации комплекса Tag7-Mts1.

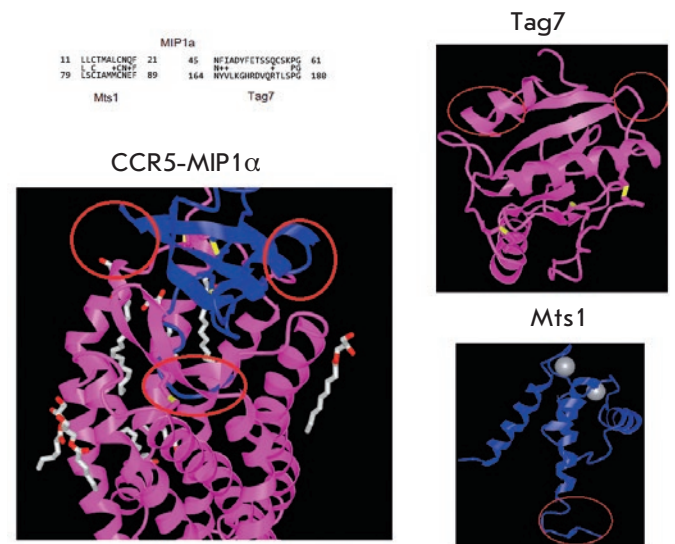


Рис. 3. Гомологичные аминокислотные последовательности и пространственные структуры белков Mts1, Tag7 и MIP1α. В левом верхнем углу представлено наложение гомологичных фрагментов аминокислотных последовательностей белков MIP1α (вверху), Mts1 и Tag7 (внизу). На ленточных моделях комплекса MIP1α (синий, слева) с CCR5 (розовый, слева) и белков Tag7 (розовый, справа) и Mts1 (синий, справа) красными кругами показаны участки гомологии аминокислотных последовательностей

Первичная и пространственная структуры фрагментов Tag7 и Mts1 имеют частичную гомологию со структурами фрагментов MIP1α

Как уже сказано, ни один из белков комплекса Tag7-Mts1 не обладает стандартной для хемокинов структурой, называемой «греческий ключ». Поэтому мы сравнивали первичные и пространственные структуры белков Mts1, Tag7 и MIP1α, известного функционального лиганда рецептора CCR5.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей трех белков обнаружил гомологию фрагментов молекул Mts1 и Tag7 с некоторыми участками MIP1α. На рис. 3 слева вверху представлен результат сравнения фрагментов аминокислотных последовательностей. Mts1 имеет в С-концевой части 11-членный фрагмент (аминокислотные остатки 79–89), на 65% гомологичный 11-членному N-концевому фрагменту MIP1α (аминокислотные остатки 11–21). В центральной части молекулы Tag7 расположен 17-членный фрагмент (аминокислотные остатки 164–180), гомологичный фрагменту MIP1α (аминокислотные остатки 45–61), также расположенному в середине полипептидной цепи.

На рис. 3 представлены пространственные структуры комплекса MIP1 α с CCR5 [21] и пространственные структуры Tag7 [19] и Mts1 [22], координаты пространственных структур PDB ID: 5UIW, 1YCK, 3C1V соответственно. При сравнении пространственных структур белков Mts1 и Tag7 со структурой MIP1 α видно, что С-концевой участок Mts1 (аминокислотные остатки 79–89) представляет собой α -спираль, выступающую из центральной глобулярной части молекулы. У хемокина MIP1 α N-концевой участок (аминокислотные остатки 11–21) также далеко выступает из центральной части молекулы. Оба эти участка имеют по пять гидрофобных аминокислот. Фрагменты Tag7 (аминокислотные остатки 164–180) и MIP1 α (аминокислотные остатки 45–61) представляют собой β -листы, в обоих белках находящиеся на поверхности молекул. Гомологичные аминокислоты (остатки 164–166 и 179–180) расположены в области, которая у MIP1 α (остатки 45–47 и 60–61) участвует в непосредственном взаимодействии с рецептором CCR5.

Ни один из белков комплекса Tag7–Mts1 не обладает пространственной структурой хемокина, однако, Mts1 и Tag7 содержат участки, гомологичные по своей аминокислотной и пространственной структурам участкам хемокина MIP1 α , важным для активации рецептора CCR5. Возможно, в этом состоит причина того, что отдельно взятые Tag7 и Mts1 не обладают хемоаттрактантной активностью, и только стабильный двухкомпонентный комплекс этих белков способен инициировать миграцию лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные данные позволяют сделать два заключения. Хемотаксические рецепторы CCR5 и CXCR3 участвуют в индукции миграции РВМС по градиенту концентрации комплекса Tag7–Mts1. Один из компонентов этого комплекса – белок Mts1 – может связываться с обоими рецепторами.

Следует отметить различную специфичность связывания комплекса Tag7–Mts1 с этими рецепторами. Исследуемый комплекс довольно слабо взаимодействует с рецептором CXCR3: не более 20% CXCR3-содержащих РВМС мигрируют по градиенту концентрации Tag7–Mts1. В то же время практически все популяции РВМС, несущие CCR5, могут двигаться под действием этого хемоаттрактанта.

CCR5 присутствует, как правило, на клетках памяти, макрофагах и дендритных клетках. Недавно было показано, что он представлен на клеточной поверхности субпопуляций NK-клеток [23]. Исходя из набора клеток, несущих CCR5, можно предполагать, что комплекс Tag7–Mts1 может привлекать клетки иммунной системы в основном на ранних стадиях иммунного ответа.

Нами показано, что предварительная инкубация клеток с белком Tag7 не ингибирует миграцию клеток под действием комплекса Tag7–Mts1. Возможно, Tag7 взаимодействует с хемотаксическим рецептором намного слабее, чем комплекс Tag7–Mts1. Tag7 не содержит также в полипептидной цепи гидрофобного фрагмента, способного связываться с трансмембранным активным центром рецептора.

Mts1, напротив, может связываться с рецептором CCR5 и ингибировать движение РВМС, хотя и не обнаружено сходства в аминокислотных и пространственных структурах центрального участка молекул Mts1 и MIP1 α . Механизм такого связывания требует дальнейшего исследования [19, 21, 22].

Аналогичные результаты получены нами недавно при исследовании взаимодействия цитотоксического комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором известного цитокина TNF α – TNFR1. Tag7 связывался с TNFR1 и ингибировал цитотоксическое действие TNF α [24], но не обладал гомологией первичной и трехмерной структурой с TNF α .

Детальное изучение механизма взаимодействия CCR5 с лигандом позволило предложить гипотетическую схему контактов этого рецептора с лигандами [25]. Согласно этой схеме, взаимодействие хемоклинового рецептора с лигандом – двухстадийный процесс. На первой стадии центральная часть молекулы хемокина взаимодействует со связывающим центром рецептора, расположенным на внеклеточном домене. Далее для активации рецептора необходимо взаимодействие N-концевого участка хемокина со вторым участком связывания, расположенным в пучке трансмембранных спиралей.

Интересно, что сам Mts1 не может индуцировать миграцию клеток, хотя имеет гидрофобный фрагмент (аминокислотные остатки 79–89), гомологичный фрагменту MIP1 α (аминокислотные остатки 11–21), индуцирующему изменение конформации рецептора. Учитывая различия в пространственной структуре Mts1 и в структуре классического хемокина, можно предположить, что после связывания с внеклеточным доменом на первой стадии взаимодействия Mts1 с рецептором CCR5 С-концевой фрагмент Mts1 не может проникнуть в мембрану клетки [22]. Взаимодействие с Tag7 изменяет, возможно, конформацию Mts1, обеспечивая доступ С-концевого участка к активному центру в трансмембранном пучке. Такая гипотетическая схема может объяснить, почему только комплекс Tag7–Mts1 способен вызывать миграцию РВМС.

По-видимому, двухстадийное взаимодействие лигандов с рецепторами является общим свойством рецепторов различной природы. Сначала лиганд фиксируется на поверхности рецептора, затем про-

исходит его активация. Ранее мы изучали взаимодействие двухкомпонентного комплекса Tag7–Hsp70 с рецептором TNFR1 и выявили функциональную активность каждого белка. Мы показали, что Tag7 может связываться с TNFR1, но не способен вызвать агрегацию его цитоплазматических доменов, необходимую для индукции цитолиза. Hsp70, способный агрегировать в растворе, связывается с Tag7 и вызывает тримеризацию рецептора.

Не исключено, что Mts1 может связываться и с другими рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов и НК-клеток и в комплексе с Tag7 индуцировать миграцию этих клеток. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение следует отметить, что в результате проведенных исследований показано, что хемотаксический комплекс Tag7–Mts1 можно считать новым лигандом хемотаксических рецепторов CCR5

и CXCR3, представленных на клетках иммунной системы. Хотя ни один из белков этого лиганда не имеет структурного мотива классического хемокина, Tag7–Mts1 может индуцировать миграцию РВМС с участием классических хемокиновых рецепторов, причем проявляет большее сродство к CCR5. Также показано, что Mts1 – один из белков двухкомпонентного комплекса, может связываться с внеклеточным доменом CCR5, однако для активации рецептора требуется дополнительное взаимодействие Tag7 с его внеклеточным участком. Понимание процессов, лежащих в основе взаимодействия неклассического хемокина с классическим хемотаксическим рецептором, будет способствовать пониманию механизмов миграции клеток иммунной системы к очагу поражения и поиску новых хемокинов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 15-14-00031-П.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bryant V.L., Slade C.A. // Immunol. Cell Biol. 2015. V. 93. № 4. P. 364–371.
- Zlotnik A., Yoshie O. // Immunity. 2000. V. 12. № 2. P. 121–127.
- Miller A.F., Falke J.J. // Adv. Protein Chem. 2004. V. 68. P. 393–444.
- Bachelier F., Ben-Baruch A., Burkhardt A.M., Combadiere C., Farber J.M., Graham G.J., Horuk R., Sparre-Ulrich A.H., Locati M., Luster A.D., et al. // Pharmacol Rev. 2014. V. 66. № 1. P. 1–79.
- Jin T. // Curr. Opin. Cell Biol. 2013. V. 25. № 5. P. 532–537.
- Palomino D.C.T., Marti L.C. // Einstein (Sao Paulo). 2015. V. 13. № 3. P. 469–473.
- Rossi D., Zlotnik A. // Annu. Rev. Immunol. 2000. V. 18. P. 217–242.
- Dukhanina E.A., Lukyanova T.I., Romanova E.A., Guerriero V., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Yashin D.V., Sashchenko L.P. // Cell Cycle. 2015. V. 14. № 22. P. 3635–3643.
- Ambartsumian N.S., Grigorian M.S., Larsen I.F., Karlström O., Sidenius N., Rygaard J., Georgiev G., Lukanidin E. // Oncogene. 1996. V. 13. № 8. P. 1621–1630.
- Garrett S.C., Varney K.M., Weber D.J., Bresnick A.R. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 2. P. 677–680.
- Grigorian M.S., Tulchinsky E.M., Zain S., Ebraldidze A.K., Kramerov D.A., Kriajevska M.V., Georgiev G.P., Lukanidin E.M. // Gene. 1993. V. 135. № 1–2. P. 229–238.
- Tarabykina S., Griffiths T.R.L., Tulchinsky E., Mellon J.K., Bronstein I.B., Kriajevska M. // Curr. Cancer Drug Targets. 2007. V. 7. № 3. P. 217–228.
- Dukhanina E.A., Kabanova O.D., Lukyanova T.I., Shatalov Y.V., Yashin D.V., Romanova E.A., Gnuchev N.V., Galkin A.V., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 33. P. 13963–13967.
- Kustikova O.S., Kiselev S.L., Borodulina O.R., Senin V.M., Afanas'eva A.V., Kabishev A.A. // Genetika. 1996. V. 32. № 5. P. 621–628.
- Michel T., Reichhart J.M., Hoffmann J.A., Royet J. // Nature. 2001. V. 414. № 6865. P. 756–759.
- Larin S.S., Korobko E.V., Kustikova O.S., Borodulina O.R., Raikhlin N.T., Brisgalov I.P., Georgiev G.P., Kiselev S.L. // J. Gene Med. 2004. V. 6. № 7. P. 798–808.
- Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., et al. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 3. P. 2117–2124.
- Духанина Е.А., Яшин Д.В., Лукьянова Т.И., Романова Е.А., Кабанова О.Д., Шаталов Ю.В., Сащенко Л.П., Гнучев Н.В. // Докл. АН. 2007. Т. 414. № 2. С. 277–279.
- Guan R., Wang Q., Sundberg E.J., Mariuzza R.A. // J. Mol. Biol. 2005. V. 347. № 4. P. 683–691.
- Sashchenko L.P., Gnuchev N.V., Lukjanova T.I., Redchenko I.V., Kabanova O.D., Lukanidin E.M., Blishchenko E.Y., Satpaev D.K., Khaidukov S.V., Chertov O.Y. // Immunol. Lett. 1993. V. 37. № 2–3. P. 153–157.
- Ren M., Guo Q., Guo L., Lenz M., Qian F., Koenen R.R., Xu H., Schilling A.B., Weber C., Ye R.D., et al. // EMBO J. 2010. V. 29. № 23. P. 3952–3966.
- Gingras A.R., Basran J., Prescott A., Kriajevska M., Bagshaw C.R., Barsukov I.L. // FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 1651–1656.
- González-Martin A., Mira E., Mañes S. // Anticancer Agents Med. Chem. 2012. V. 12. № 9. P. 1045–1057.
- Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkov A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., et al. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. № 35. P. 21724–21731.
- Blanpain C., Doranz B.J., Bondue A., Govaerts C., Leener A.D., Vassart G., Doms R.W., Proudfoot A., Parmentier M.J. // Biol. Chem. 2003. V. 278. № 7. P. 5179–5187.

УДК 577.151.45

Предпочтительная конформация связывания канонических субстратов бутирилхолинэстеразы непродуктивна для экотиофата

А. С. Злобин^{1,2#}, А. О. Залевский^{1,2,3#,*}, Ю. А. Мокрушина², О. В. Карцева², А. В. Головин^{1,3}, И. В. Смирнов^{2,4,5}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Институт молекулярной медицины, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 119992, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

Эти авторы внесли равный вклад в исследование.

*E-mail: aozalevsky@fbb.msu.ru

Поступило в редакцию 28.08.2018

Принято к печати 10.12.2018

РЕФЕРАТ Впервые на атомистическом уровне описано взаимодействие фермента бутирилхолинэстеразы с экотиофатом – популярным модельным соединением, аналогом боевых отравляющих веществ VX и VR. При помощи методов молекулярного моделирования обнаружена конкуренция между двумя конформациями экотиофата в активном центре. Первая, близкая к конформации для способа связывания субстратов холинового ряда – бутирилхолина и бутирилтиохолина, – является ингибирующей, так как не способна к реакции с ферментом; вторая, реакционноспособная, обладает существенно худшей оценкой энергии связывания. Таким образом, экотиофат совмещает черты ингибиторов двух типов: конкурентного и суицидального. Данное наблюдение поможет уточнить кинетическую схему реакции для аккуратной оценки кинетических констант, что особенно важно при дизайне новых вариантов бутирилхолинэстеразы, способных к полному циклу гидролиза фосфорорганических соединений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бутирилхолинэстераза, КМ/ММ, метадинамика, органофосфаты, экотиофат.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БуХЭ – бутирилхолинэстераза; ЕСН – экотиофат; RMSD – среднеквадратичное отклонение; КМ/ММ – гибридное, квантово-механическое/молекулярно-механическое моделирование; PAS – периферийный анионный сайт.

ВВЕДЕНИЕ

Бутирилхолинэстераза (БуХЭ) – фермент, который обладает широкой субстратной специфичностью, благодаря чему представляет значительный интерес в качестве объекта для создания антидотов против ядов на основе фосфорорганических соединений, например газов VX и VR [1, 2]. В то же время для холинэстераз характерна чрезвычайно сложная кинетическая схема реакции, обусловленная, в том числе, наличием дополнительного периферического анионного сайта связывания лиганда (PAS). Рассмотрение

PAS для характеристического субстрата БуХЭ – бутирилтиохолина – увеличивает общее количество состояний до восьми [3]. Если же субстрат способен вызывать необратимую инактивацию фермента из-за образования стабильного фосфорилированного комплекса, то кинетическая схема может усложниться еще больше. Одним из таких субстратов, сочетающих и холиновый фрагмент, и возможность инактивации, является экотиофат – менее токсичный аналог боевых отравляющих веществ V-серии, который используется в качестве модельного фос-

форорганического соединения при изучении реакционной способности бутирилхолинэстеразы и ее модификаций, устойчивых к инактивации. В нашей работе взаимодействие экотиофата с БУХЭ изучено с целью оценки применимости для них кинетических схем, предложенных для бутирилтиохолина.

Мы решили использовать методы молекулярного моделирования, так как они дают атомистическое понимание происходящих событий и ранее доказали свою эффективность для понимания механизмов реакции БУХЭ с некоторыми субстратами [4] и даже для рационального изменения БУХЭ и трансформации ее в кокаингидролизующий фермент [5].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моделирование молекулярного докинга было проведено в пакете Autodock Vina [6]. Для докинга была выбрана структура БУХЭ PDB ID 1XLW, ковалентно конъюгированная с продуктом фосфорилирования экотиофатам – диэтилфосфатным остатком (DEP). DEP был удален, а недостающие остатки V377-D378-D379-Q380 и C66 достроены на основе структуры PDB ID 2XMD, так как структуры достаточно похожи (среднеквадратичное отклонение (RMSD), оцененное по всем тяжелым атомам, составило 0.4 Å). Структура экотиофата создана в пакете Avogadro [7]. Подготовку входных файлов и обработку результатов проводили при помощи инструментов пакета AutoDock Tools [8]. Ячейка для докинга была отцентрирована так, чтобы включать весь карман связывания. Размер ячейки составил 20 Å по всем измерениям. Для эффективного сканирования параметр «exhaustiveness» был установлен в значение 64 и проведены 20 независимых повторностей. Во время докинга фермент оставался жестким, в то время как лиганд имел все степени свободы.

Стартовые конфигурации БУХЭ с лигандом были взяты из процедуры докинга. Моделирование метадинамики и обработку результатов проводили как описано ранее [9]. В качестве коллективной переменной использовали расстояние O(Ser198)-P(ЕСН). Потенциал метадинамики величиной 2 кДж/моль и адаптивной шириной, рассчитанной на основании диффузионного критерия по предшествующим 220 шагам, накладывался каждые 220 шагов моделирования. Для каждого варианта связывания экотиофата сделано по три независимых реплики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск положения экотиофата в структуре бутирилхолинэстеразы человека (PBD ID 1XLW) проведен с помощью процедуры докинга. Особый интерес представляли положения экотиофата в активном центре, потенциально способные к прохождению

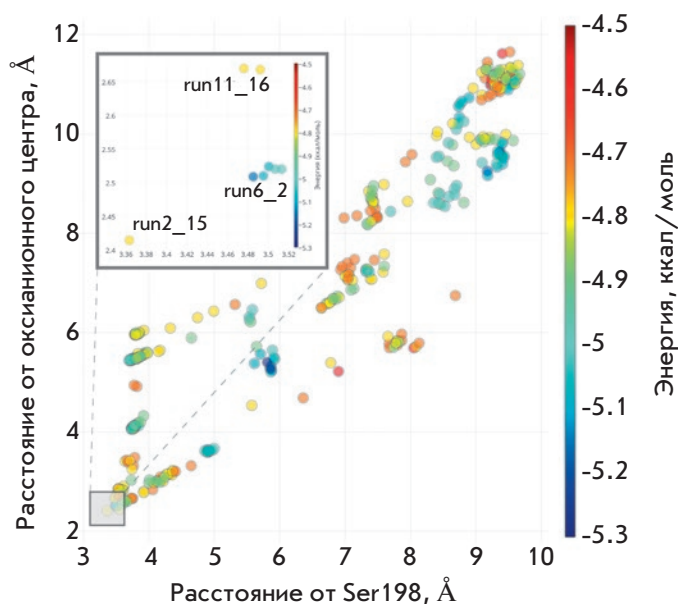


Рис. 1. Результаты докинга экотиофата в связывающий карман БУХЭ. Во врезке указаны лучшие результаты из нижнего левого сегмента

реакции (состояние ES в кинетической схеме [3]). Поэтому для анализа мы выбрали две основные метрики: расстояние между кислородом каталитического Ser198 и атомом фосфора экотиофата и расстояние между центром масс оксианионного центра, образованного атомами азота остова остатков G116, G117, A199, и фосфорильным кислородом экотиофата. Вторая метрика выбрана, так как координация кислорода оксианионным центром является важной составляющей связывания и позиционирования в известных механизмах реакции [3]. Фильтрация по таким критериям позволила выделить три лучших кластера положений run6_2, run2_15, run11_16 (рис. 1). Согласно оценочной функции AutoDock Vina, положение run6_2 имеет энергию связывания на ~0.4 ккал/моль лучше, чем два других. Интересно, что такое же расположение холинового фрагмента наблюдается в случае гидролиза ацетилтиохолина [4] и, по-видимому, характерно для лигандов подобной химической природы. В данном случае ключевым является взаимодействие положительного заряда холиновой группы с ароматической π-системой Trp82 [10]. Остаток Glu197, участвующий в катализе, при этом оказывает меньший эффект [10]. В то же время такое расположение лиганда приводит к тому, что уходящая группа – тиохолин – расположен не на линии нуклеофильной атаки.

В противоположность этому, в положении run11_16 тиохолин находится на одной линии с атакующим OG Ser198 (рис. 2), а расположение

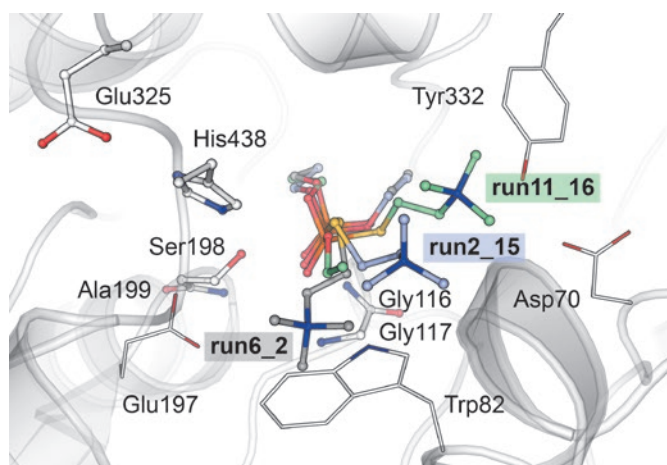


Рис. 2. Три варианта стартовых позиций лиганда. Остатки, включенные в квантовую систему, обозначены в шаростержневой модели. Тонкими линиями обозначены остатки, обеспечивающие связывание холинового фрагмента. Атомы углерода экотиофата в варианте связывания run6_2 показаны серым, run2_15 голубым и run11_16 зеленым. Отображение атомов водорода опущено

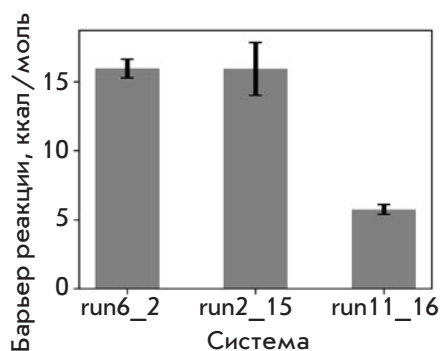


Рис. 3. Величины барьеров реакции для разных стартовых положений. Показано среднее значение и его ошибка, определенные по трем независимым измерениям

этильных заместителей похоже на расположение ковалентного интермедиата PDB ID 1XLW в кристаллической структуре [11]. Холиновая группа, в свою очередь, может электростатически взаимодействовать с отрицательно заряженным Asp70 и ароматической π-системой Tyr332, входящих в периферийный анионный сайт (PAS) [10]. Ранее предположили, что именно такое положение наиболее

вероятно для гидролиза экотиофата, а важность контакта с остатком Asp70 подтверждена серией мутантов Asp70Gly и Asp70Lys [12]. При этом связывание второй молекулы субстрата в PAS невозможно. Положение run2_15 является промежуточным – положение фосфата соответствует таковому у run6_2, а холиновый хвост занимает переходное положение между run6_2 и run11_16 (рис. 2).

Для оценки реакционной способности всех трех положений мы применили гибридное квантово-механическое/молекулярно-механическое (КМ/ММ) моделирование. В совокупности с методом, повышающим эффективность семплирования – метадинамикой, это позволило оценить энергетические барьеры реакций [9].

Значения, полученные для run6_2, run2_15, run11_16, составляют 15.9 ± 0.7, 15.9 ± 1.9, 5.7 ± 0.4 ккал/моль соответственно (рис. 3). Они находятся в рамках, характерных для ферментативных реакций в целом, и соотносятся со значениями, полученными при изучении данной реакции в БУХЭ с другими субстратами и с помощью других вычислительных методов [5]. Но при этом заметен более низкий барьер реакции в системе, где стартовое положение лиганда таково, что уходящая группа – тioxолин – находится на одной линии с атакующим кислородом OG Ser198, делает протекание реакции из подобного стартового положения приблизительно в 10⁷ раз более вероятным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При помощи методов молекулярного моделирования мы обнаружили существование двух возможных конкурирующих конформаций экотиофата в активном центре бутирилхолинэстеразы. Существование первой, реакционноспособной, предсказано ранее. Вторая – близкая по режиму связывания к субстратам холиновой группы и обладающая лучшей оценкой энергии связывания, является ингибирующей. Учет обоих состояний позволит уточнить кинетическую схему реакции экотиофата с бутирилхолинэстеразой, что необходимо для корректной оценки кинетических констант при дизайне вариантов бутирилхолинэстеразы с фосфатазной активностью. ●

Исследование поддержано грантом РНФ № 14-50-00131. Все вычисления проводились на ресурсах суперкомпьютерного центра МГУ им. М.В. Ломоносова, поддержанных проектом RFMEFI62117X0011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.I., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 1243–1248.
2. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Bobik T.V., Ilyushin D.G., Murashev A.N., Dyachenko I.A., Palikov V.A., Knorre V.D., Belogurov A.A., et al. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. P. 136–141.
3. Bevc S., Konc J., Stojan J., Hodošček M., Penca M., Praprotnik M., Janežič D. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e22265.
4. Chen X., Fang L., Liu J., Zhan C.-G. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 1297–1305.
5. Zheng F., Xue L., Hou S., Liu J., Zhan M., Yang W., Zhan C.-G. // *Nature Comm.* 2014. V. 5. P. 3457.
6. Trott O., Olson A.J. // *J. Comp. Chem.* 2010. V. 31. P. 455–461.
7. Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. // *J. Cheminform.* 2012. V. 4. P. 17.
8. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // *J. Comp. Chem.* 2009. V. 30. P. 2785–2791.
9. Zlobin A., Mokrushina Y., Terekhov S., Zalevsky A., Bobik T., Stepanova A., Aliseychik M., Kartseva O., Panteleev S., Golovin A., et al. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 834.
10. Nachon F., Ehret-Sabatier L., Loew D., Colas C., van Dorselaer A., Goeldner M. // *Biochemistry*. 1998. V. 37. P. 10507–10513.
11. Nachon F., Asojo O.A., Borgstahl G.E.O., Masson P., Lockridge O. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 1154–1162.
12. Masson P., Froment M.T., Bartels C.F., Lockridge O. // *Biochem. J.* 1997. V. 325 (Pt 1). P. 53–61.

УДК 577.151.45

Мышиная модель для оценки субхронической токсичности фосфорорганических пестицидов

В. А. Паликов¹, С. С. Терехов², Ю. А. Паликова¹, О. Н. Хохлова¹, В. А. Казаков¹,
И. А. Дьяченко¹, С. В. Пантелеев², Ю. А. Мокрушина², В. Д. Кнорре^{2*}, О. Г. Шамборант²,
И. В. Смирнов^{2,3}, А. Г. Габитов²

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 6

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vera.knorre@gmail.com

Поступило в редакцию 06.12.2017

Принято к печати 10.12.2018

РЕФЕРАТ Создание антидотов к фосфорорганическим ядам – важная задача современной фармакологии. Рекомбинантные ацетилхолинэстераза и бутирилхолинэстераза (БуХЭ) являются эффективными акцепторами фосфорорганических ядов, в том числе пестицидов. Представлены результаты определения эффективности рекомбинантной бутирилхолинэстеразы при моделировании фосфорорганического отравления, вызванного пероральным введением параоксона в дозе 2 мг/кг. Показана высокая активность БуХЭ как протективного средства при субхроническом антихолинэстеразном отравлении на модели *in vivo*. Использование БуХЭ в дозе 20 мг/кг помогло избежать гибели модельных животных, а также способствовало их быстрому восстановлению после отравления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биоловушка, бутирилхолинэстераза, *in vivo* модели, фосфорорганические соединения.

ВВЕДЕНИЕ

Современная терапия острых и тяжелых хронических отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) включает в себя реанимацию пациентов, проведение искусственной вентиляции легких, терапию мускариновым антагонистом (обычно атропином) в комбинации с введением большого количества жидкости и реактиватора ацетилхолинэстеразы, например пралидоксима [1]. Однако такая терапия зачастую вызывает тяжелые побочные эффекты: тошноту, рвоту, частичную или полную потерю трудоспособности, что связано с невозможностью исключить вероятность необратимого повреждения нейронов.

Одним из перспективных подходов в терапии отравлений ФОС является использование биологических антидотов – биомолекул, связывающих и инактивирующих ФОС [2–5]. В качестве таких антидотов рассматриваются такие ферменты, как бутирилхолинэстераза человека (чБуХЭ) и антитела, способные связываться или гидролизовать ФОС [6, 7]. чБуХЭ – естественный биологический антидот (суицидальный

инактиватор) при отравлении ФОС. Благодаря уникальному сходству с ацетилхолинэстеразой человека (чАцХЭ) и большему объему полости активного центра чБуХЭ инактивирует широчайший спектр ФОС, причем зачастую эффективнее чАцХЭ [8]. Более того, использование чБуХЭ позволяет избежать долговременных побочных эффектов отравления ФОС, включая и необратимое повреждение мозга [9].

Фосфорорганические соединения представляют собой самую большую группу химических пестицидов, применяемых для защиты растений. Поскольку потребители едят свежие фрукты и овощи, то они автоматически попадают в группу повышенного риска отравления пестицидами. Параоксон – активный метаболит пестицида паратион, считается одним из наиболее мощных препаратов, ингибирующих чАцХЭ [10]. Основным способом попадания инсектицидов, подобных параоксону, в организм является контакт с кожными покровами или поступление через желудочно-кишечный тракт [11], что приводит к острому или хроническому отравлению человека и животных. Кроме того, большин-

ство инсектицидов на основе ФОС являются липофильными соединениями, склонными к накоплению в жировых тканях, что значительно увеличивает потенциал их хронического воздействия на организм человека. Таким образом, разработка моделей *in vivo*, позволяющих оценивать субхроническую токсичность фосфорорганических пестицидов, представляет существенный интерес, так как позволяет определять долговременные эффекты воздействия ФОС на физиологические и поведенческие характеристики животного.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Токсичность препарата рЧБуХЭ изучали на 36 мышях BALB/c (три группы – две опытные и одна контрольная) по шесть самцов и шесть самок в каждой. Формирование таких групп позволяет получить репрезентативную выборку и статистически значимые данные. До начала исследования группы животных в клетках помещали в отдельную комнату на 7 дней для адаптации. В течение этого периода у животных контролировали появление признаков отклонения в состоянии здоровья. В эксперимент случайным образом отбирали здоровых животных, у которых индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения в пределах пола более чем на 10%. Основные правила содержания и ухода за животными соответствовали нормативам, указанным в руководстве Guide for Care and Use of Laboratory Animals. (ILAR publication, 1996, National Academy Press).

Тестируемой группе животных подкожно вводили ингибитор карбоксилэстераз крезилбензодиоксафосфориноксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг. Через 15 мин мыши внутривенно получали рЧБуХЭ в дозе 20 мг/кг (или физраствор), после чего перорально вводили параоксон в дозе 2 мг/кг. Введение веществ происходило на 1, 3, 5 дни исследования. Комплексное тестирование проводили после третьего введения на 6-й день исследования. Массу тела животных, потребление корма и воды регистрировали ежедневно. Для оценки эффективности действия антидота проводили функциональные тесты, такие, как регистрация силы, параметров дыхания, локомоторной и исследовательской активности животных.

Регистрация параметров дыхания

Состояние дыхательной системы оценивали с использованием компьютерной системы PowerLab 8/35. В данном тесте оценивали такие параметры, как частота дыхания (раз/мин), дыхательный объем (мл), максимальный поток выдоха (мл/с). Тестирование проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ).

Регистрация локомоторной и исследовательской активности

Общую локомоторную и исследовательскую активность регистрировали при комплексном тестировании животных после клинического осмотра. Поведенческую активность анализировали в тесте «открытое поле» на многофункциональной системе TSE Multi Conditioning System Extended Advanced. Тест проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Продолжительность теста 3 мин. При нахождении животного на открытой площадке актометра регистрировали пройденное животным расстояние (см), время неподвижности (с) и количество стоек на задних лапах.

Регистрация мышечной силы, отражающая работу периферических нервов в тесте хватания Grip Strength

Мышечную силу животного измеряли с помощью прибора GRIP STRENGTH METER, Columbus Instruments. Регистрировали силу натяжения пластины динамометра прибора передними лапами животного (в кг). Измерения выполняли при комплексном тестировании животного (после процедуры регистрации локомоторной активности) на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Для всех количественных данных, полученных в ходе исследований, применяли описательную статистику. Для установления межгрупповых различий и сравнения экспериментальных групп с контрольной использовали однофакторный дисперсионный анализ Крускала–Уоллеса и/или тест Манна–Уитни. Статистический анализ проводили с помощью программы Statistica for Windows 7.1. При $P < 0.05$ различия считали статистически значимыми. Результаты представляли как значение \pm стандартная ошибка ($P \leq 0.0005$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения эффективности бутирилхолинэстеразы в качестве терапевтического агента, используемого для профилактики отравлений фосфорорганическими соединениями, разработана био модель, в которой учитывается разница в «эстеразном статусе» мыши и человека. Содержание чБуХЭ в крови человека в 2 раза выше, чем в крови мыши (5 и 2.6 мг/л соответственно), тогда как АцХЭ в 25 раз меньше (0.008 и 0.2 мг/л соответственно). Кроме того, классические лабораторные животные (грызуны: мыши, крысы и морские свинки) обладают еще одним эволюционно значимым механизмом защиты от отравлений ФОС, связанным с наличием гена карбоксилэстеразы плазмы крови ES1, необратимо инактивирующей широкий спектр ФОС. В плазме

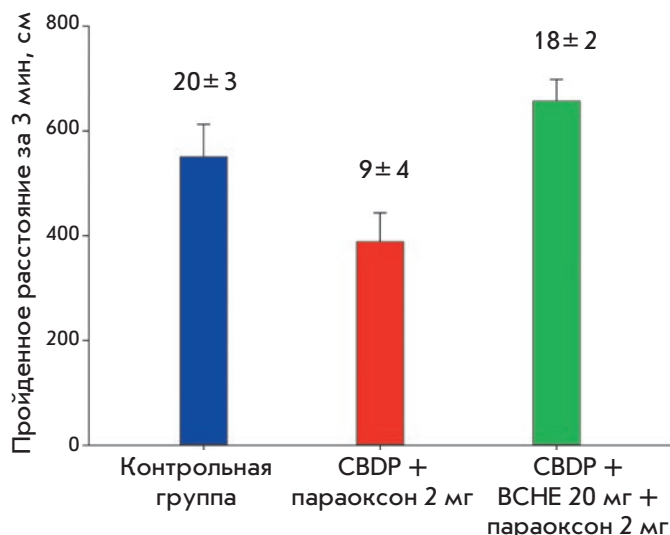


Рис. 1. Анализ локомоторной и исследовательской активности. Оценивали пройденное животным расстояние (см). Цифры над столбиками соответствуют количеству стоек на задних лапах. Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

крови человека нет этого фермента, что приводит к ложной интерпретации данных при оценке токсичности ФОС. В плазме крови человека имеются две основные эстеразы – бутирилхолинэстераза (чБуХЭ, 5 мг/л) и PON1 (50 мг/л). Для того чтобы максимально снизить фоновую активность эндогенной карбоксилэстеразы плазмы крови у мышей, использовали специфический ингибитор крезилбензодиоксафосфоринноксид (CBDP) в дозе 1.5 мг/кг, который полностью подавлял активность данного фермента. CBDP вводили подкожно перед введением фосфорорганического агента. В качестве модельного ФОС был выбран параоксон, так как именно он и его аналоги являются естественными метаболитами подавляющего большинства фосфорорганических пестицидов, используемых в настоящее время. Для имитации хронического травления применяли пероральный способ введения препарата, имитирующий проникновение пестицида при употреблении продуктов питания.

Показано снижение локомоторной активности у мышей, получивших ФОС без терапии препаратом рчБуХЭ. Пройденное мышами расстояние изменилось в 1.5 раза, исследовательская активность снизилась более чем в 2 раза (рис. 1). Введение препарата рчБуХЭ, в свою очередь, полностью восстанавливало моторные функции и исследовательскую активность. Значительное снижение моторных функций и исследовательской активности в рамках нашей модели было ассоциировано со значительным подавлением активности дыхательного центра (рис. 2).

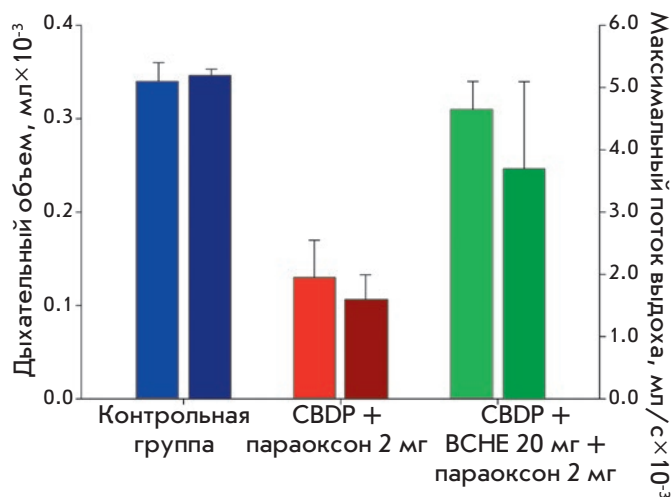


Рис. 2. Анализ параметров дыхания. Оценивали дыхательный объем (левые столбцы), а также максимальный поток выдоха (правые столбцы). Тестирование проводили на 6-й день исследования (после третьего введения веществ). Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

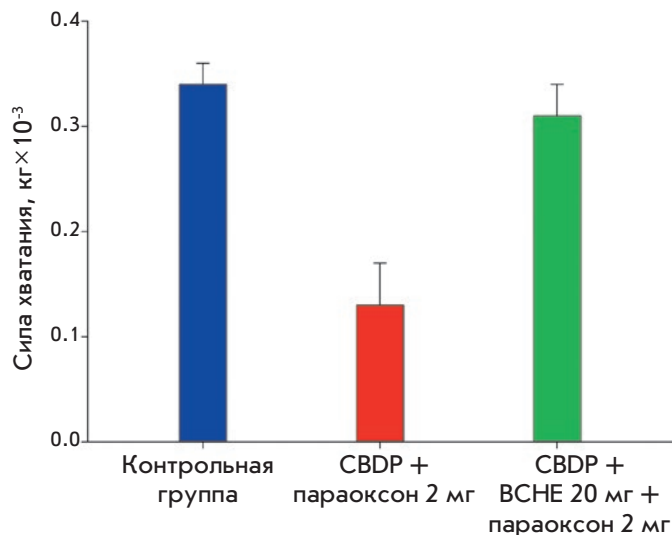


Рис. 3. Анализ мышечной силы в тесте хватания Grip Strength. Регистрировали силу натяжения пластины динамометра прибора передними лапами животного (кг). Планки погрешности иллюстрируют стандартное отклонение в группе

Основные характеристики функции дыхания, такие, как дыхательный объем и максимальный поток выдоха, в группе животных, получавших ФОС, были снижены в 3 раза по сравнению с контрольной группой. В то же время терапия препаратом рчБуХЭ восстанавливала полноценный дыхательный процесс. Сопоставимый эффект наблюдался при анализе силы хватания (рис. 3). Параоксон вызывал значи-

тельное снижение силы мускулатуры. Сила хватания в группе, находившейся под действием ФОС, была в 2.5 раза ниже, чем у животных контрольной группы. Аналогично эффектам, описанным ранее, терапия препаратом рчБуХЭ позволяла сохранить мышечную активность, отменяя физиологические проявления хронических эффектов воздействия параоксона.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработана биомодель, позволяющая оценить физиологические проявления воздействия пестицида параоксона при пероральном введении в режиме субхронической токсичности. Эта модель представляет большой интерес для изучения хронических эффектов воздействия ФОС. Показано, что основные физиологические характеристики, такие, как локомоторная и исследовательская активность, дыхание, а также мышечная активность, являются параметрами, чувствительными к воздействию ФОС в рамках исследованной модели *in vivo*. В результате нами показана высокая активность препарата рчБуХЭ, использованного в качестве протективного средства. Внутривенное введение биопрепарата в дозе 20 мг/кг не только помогало избежать гибели животных, но и способствовало быстрому восстановлению поведения мышей после отравле-

ния. Установлено, что основные физиологические характеристики животных в группе, получавшей препарат рчБуХЭ, не отличались от показателей в контрольной группе, не подверженной токсическому воздействию параоксона, что указывает на высокую протективную эффективность биопрепарата не только на описанной ранее модели острой токсичности, но и в разработанной биомодели субхронической токсичности.

Снижение моторных функций, исследовательской активности, а также параметров дыхательного процесса и активности мускулатуры, описанных в рамках данной биомодели, может свидетельствовать о повреждении нейронных связей. Детализированное исследование нейрофизиологических характеристик, а также обратимости воздействия ФОС в рамках разработанной биомодели субхронической токсичности представляет значительный интерес и является предметом дальнейших исследований. ●

Исследование поддержано грантом РНФ (№ 16-14-00191). Функциональные тесты частично выполнены при поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, программа «УМНИК» 10278ГУ/2015 (для П.А. Паликова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Eddleston M., Buckley N.A., Eyer P., Dawson A.H. // Lancet (London, England). 2008. V. 371. P. 597–607.
- Ilyushin D.G., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Jr., Dyachenko I.A., Zharmukhamedova T.I., Novozhilova T.I., Bychikhin E.A., Serebryakova M.V., Kharybin O.N., Murashev A.N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 1243–1248.
- Masson P., Lockridge O. // Arch. Biochem. Biophys. 2010. V. 494. P. 107–120.
- Nachon F., Brazzotto X., Trovaslet M., Masson P. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 206. P. 536–544.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Bobik T.V., Ilyushin D.G., Murashev A.N., Dyachenko I.A., Palikov V.A., Knorre V.D., Belogurov A.A., et al. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 136–141.
- Smirnov I., Belogurov A., Friboulet A., Masson P., Gabibov A., Renard P.-Y. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 203. P. 196–201.
- Smirnov I., Carletti E., Kurkova I., Nachon F., Nicolet Y., Mitkevich V.A., Débat H., Avelle B., Belogurov A.A., Jr., Kuznetsov N., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 15954–15959.
- Shenouda J., Green P., Sultatos L. // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2009. V. 241. P. 135–142.
- Rosenberg Y.J., Laube B., Mao L., Jiang X., Hernandez-Abanto S., Lee K.D., Adams R. // Chem.-Biol. Interactions. 2013. V. 203. P. 167–171.
- Salerno A., Devers T., Bolzinger M.-A., Pelletier J., Josse D., Briçon S. // Chem.-Biol. Interactions. 2017. V. 267. P. 57–66.
- Roberts D.M., Aaron C.K. // BMJ (Clinical research ed). 2007. V. 334. P. 629–634.

Effect of Temperature, pH and Plasmids on *In Vitro* Biofilm Formation in *Escherichia coli*

A. Mathlouthi^{1,2#}, E. Pennacchietti^{1#}, D. De Biase^{1*}

¹Department of Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies, Sapienza University of Rome, Laboratory affiliated to the Istituto Pasteur Italia – Fondazione Cenci Bolognetti, Corso della Repubblica 79, 04100 Latina, Italy

²Université de Carthage, Faculté des Sciences de Bizerte, Département des Sciences de la Vie, Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement (LR01/ES14), Unité d'Ecotoxicologie, Route de Tunis, 7021 Zarzouna, Tunisie

#AM and EP equally contributed to this work.

*E-mail: daniela.debiase@uniroma1.it

Received August 29, 2018; in final form November 10, 2018

ABSTRACT Acid resistance (AR) in *Escherichia coli* is an important trait that protects this microorganism from the deleterious effect of low-pH environments. Reports on biofilm formation in *E. coli* K12 showed that the genes participating in AR were differentially expressed. Herein, we investigated the relationship between AR genes, in particular those coding for specific transcriptional regulators, and their biofilm-forming ability at the phenotypic level. The latter was measured in 96-well plates by staining the bacteria attached to the well, following 24-hour growth under static conditions, with crystal violet. The growth conditions were as follows: Luria Bertani (LB) medium at neutral and acidic pH, at 37°C or 25°C. We observed that the three major transcriptional regulators of the AR genes (*gadX*, *gadE*, *gadW*) only marginally affected biofilm formation in *E. coli*. However, a striking and novel finding was the different ability of all the tested *E. coli* strains to form a biofilm depending on the temperature and pH of the medium: LB, pH 7.4, strongly supported biofilm formation at 25°C, with biofilm being hardly detectable at 37°C. On the contrary, LB, pH 5.5, best supported biofilm formation at 37°C. Moreover, we observed that when *E. coli* carried a plasmid, the presence of the plasmid itself affected the ability to develop a biofilm, typically by increasing its formation. This phenomenon varies from plasmid to plasmid, depends on growth conditions, and, to the best of our knowledge, remains largely uninvestigated.

KEYWORDS *Escherichia coli*, biofilm, growth conditions, transcriptional regulators, plasmids.

ABBREVIATIONS LB – Luria Bertani; AR – acid resistance; ATR – acid tolerance response; AFI – acid fitness island; H-NS – histone-like nucleoid structuring protein; MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; OD – optical density; SD – standard deviation.

INTRODUCTION

In the last two decades, several reports have greatly contributed to our current understanding of the molecular mechanisms that underlie the acid tolerance response (ATR) and acid resistance (AR) in many neutralophilic bacteria. The literature on this topic has recently been reviewed [1].

Concerning AR, this is defined as the astonishing ability of bacteria in the stationary phase of growth to withstand exposure to extreme acid stress (pH ≤ 2.5) for at least 2 hours (such as the one encountered in the gastric compartment) and recover their growth after a return to neutral pH [2]. In this regard, AR is considered to be a key factor during colonization of a host and the infectious process carried out by the gram-negative bacterium *Escherichia coli*, as well as by other bacte-

ria, including pathogenic ones [3–5]. Four AR systems (AR1–4) have been identified in *E. coli*, the most potent of them being AR2, which relies only on the availability of amino acid *L*-glutamate in the minimal salt medium in which the acid challenge is carried out [3, 6, 7]. In this system, amino acid *L*-glutamate is the substrate of the cytosolic enzyme glutamate decarboxylase (two isoforms, GadA and GadB, are expressed in *E. coli*); *L*-glutamate is imported from the medium by the inner membrane antiporter GadC, which couples the import of *L*-glutamate with export of γ -aminobutyrate (GABA), the decarboxylation product. In fact, during the decarboxylation, the α -carboxylic group of *L*-glutamate is released as carbon dioxide (CO₂) and is replaced with a proton irreversibly incorporated in the GABA molecule. Therefore, the system works by con-

suming proton intracellularly (through GadA/B activity) and by exporting positive charges through GadC [1, 6].

The regulation of the AR2 system in *E. coli* is extremely complex: it involves several global regulators, such as RpoS (the sigma factor of RNA polymerase of the stationary phase, which positively affects expression of the system) and H-NS (histone-like nucleoid structuring protein, which represses the relevant genes), small RNAs and several specific transcriptional regulators, such as GadE, GadX and GadW [3, 6]. These specific regulators are encoded by the relevant genes located in the AFI (Acid Fitness Island), the *E. coli* genome region that carries 14 genes involved in the AR at various levels, including the gene coding for GadA [6]. The coordinated transcriptional control of expression of the AFI and AR2 genes (including *gadB* and *gadC*, which are not in the AFI), as well as the involvement of the global and specific transcriptional regulators, was shown in several transcriptional studies, mostly using microarrays [3]. As expected, some studies showed that *gadBC* and the AFI genes were upregulated under all those conditions, which are compatible with the timely activation of AR, such as inorganic and organic acid stress, respiratory stress/anaerobiosis (typical of the gut environment), whereas downregulation was observed under alkaline stress and in an *rpoS* mutant. Notably, in a temporal study of biofilm formation, *gadB*, *gadC*, and the AFI genes were found to be downregulated and the same trend was observed in a study of a protein involved in AR, YmgB [8].

It is well known that biofilm formation is a very complex process which is affected by many factors, such as the strain under investigation and the nature of the surface on which the biofilm develops. In this report, we used the reference laboratory strain *E. coli* K12 MG1655 and its $\Delta gadE$, $\Delta gadX$, and $\Delta gadW$ isogenic derivatives to perform a comparative phenotypic study focusing on the effect of these mutations on the ability of *E. coli* MG1655 to form a biofilm at acidic vs neutral pH and under temperatures that closely resemble those of the host (37°C) and non-host/ambient (25°C) environment. In addition, we assessed the effect of empty plasmids, i.e. the ones not carrying a gene *in trans*, on biofilm formation and concluded that, when using a plasmid, caution is warranted regarding the plasmid-specific effect on biofilm formation, depending on the experimental conditions under analysis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

The ingredients for bacterial growth were from Difco. Crystal violet was from Merck. Acetone, absolute

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Bacterial strains	Relevant genotype/information
MG1655	F ⁻ $\lambda^- rph^{-1}$
MG1655/pBBR	F ⁻ $\lambda^- rph^{-1}$ carrying plasmid pBBR1MCS
MG1655/pBS	F ⁻ $\lambda^- rph^{-1}$ carrying plasmid pBS
MG1655 $\Delta gadE$	MG1655 <i>gadE::Kan^R</i>
MG1655 $\Delta gadX$	MG1655 <i>gadX::Kan^R</i>
MG1655 $\Delta gadW$	MG1655 <i>gadW::Kan^R</i>
Plasmids	
pBBR1MCS	Expression plasmid (4707 bp): <i>lac</i> , T3 and T7 promoters, CAT/Cam ^R
pBS	(pBluescriptSK) multicopy phagemid vector; ColE1 replicon, <i>lacZ</i> α <i>bla</i>

ethanol and polystyrene 96-well plates (untreated) were from VWR. Ampicillin was from Roche Applied Science. Kanamycin was from Fluka, and chloramphenicol was from Sigma-Aldrich.

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The bacterial strains and plasmids used in this work are listed in *Table 1*. *E. coli* K12 MG1655 and $\Delta gadE$, $\Delta gadX$, $\Delta gadW$ isogenic derivatives ([9] and referenced therein) were grown at 37°C or 25°C in one of the following media: LB (Luria Bertani) broth, pH 7.4; LB-MES, pH 5.5 (LB buffered with 100 mM of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, MES, at pH 5.5). When required, the ampicillin, kanamycin, and chloramphenicol antibiotics were added at concentrations of 100, 25, and 34 µg/ml, respectively.

Conditions for biofilm formation

The experiments were performed in triplicates, starting from independent bacterial colonies picked from a freshly streaked plate from a bacterial stock at -80°C. Each bacterial culture was prepared by transferring a single colony into 2 ml of LB pH 7.4 and allowing the bacteria to grow overnight (16–18 hours) at 37°C under orbital shaking (120 rpm). On the following day, each culture was diluted 1 : 10 into a fresh LB medium and the optical density (OD) at 600 nm was measured. Each culture was then brought to the same OD₆₀₀ = 2.0 and diluted 1 : 100 in independent wells by transferring 2 µl of each culture into 198 µl of either LB, pH 7.4 or LB-MES, pH 5.5. The starting OD (time 0) was checked using a Tecan Sunrise

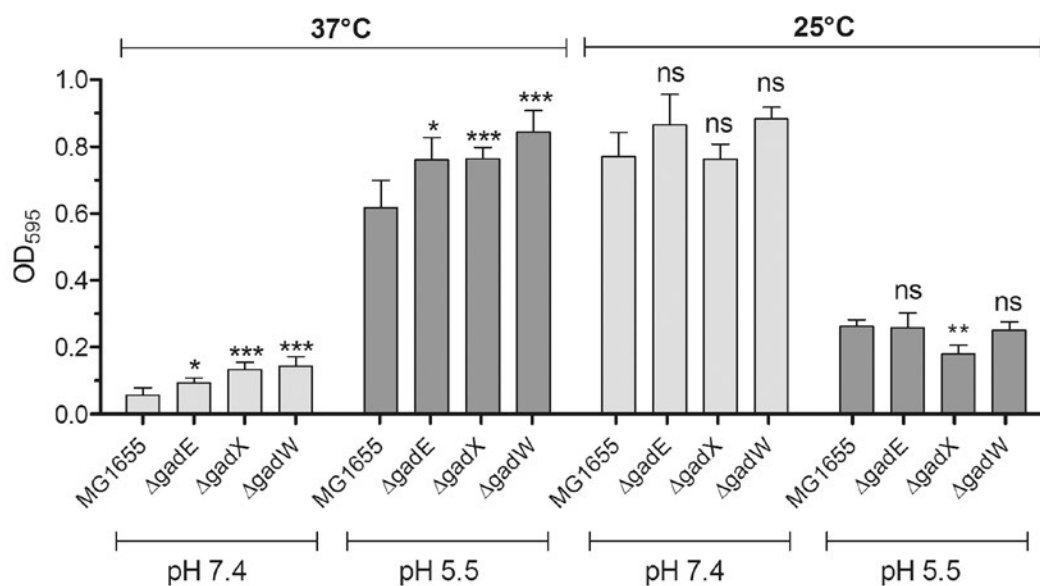


Fig. 1. Biofilm formation in *E. coli* MG1655 at different pH values and temperatures. Statistical significance: *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$; n.s., not significant.

microplate reader at 595 nm. The plates were then transferred to thermostatic static incubators at 25°C and 37°C, respectively. The external wells in each plate contained sterile water or LB to avoid evaporation, and some wells contained only the growth medium (bk), which was read at time 0 and 24 h. Following growth under static conditions for 24 hours, the final OD₅₉₅ (time 24 h) was read and planktonic bacteria were removed. Each well was rinsed with sterile water three times, and then 200 µl of 0.1% crystal violet was added and allowed to stain the biofilm for 15 min. After removal of the crystal violet and three subsequent washes with sterile water to remove the excess of stain, the stained biofilm was solubilized by adding 200 µl of an acetone:ethanol (20:80, v/v) solution. 125 µl/200 µl were transferred from each well in a clean 96-wells plate. Readings were again performed at 595 nm using a microplate reader.

Analysis of biofilm formation

The readings obtained after staining with crystal violet were subtracted from those of the wells containing only the medium (bk at 24 h); the readings were previously checked to be identical with the readings of the medium at time 0 in order to verify that there was no contamination. The net readings were then analyzed using the Prism 4.0 GraphPad software. The data for the biofilms obtained using the mutant strains *vs* the wild-type strains were analyzed by two-way ANOVA using the Bonferroni test (as available in the GraphPad Prism software suite, version v5.0a). The data were expressed as the means of 3 to 8 independent experiments with standard deviations (SD). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of temperature and pH of the medium on biofilm formation

We analyzed the ability of *E. coli* MG1655 and its *ΔgadE*, *ΔgadX*, and *ΔgadW* isogenic derivatives to form biofilms following growth of bacteria in LB at neutral and acidic pHs at two temperatures, 37°C and 25°C. Strikingly, we noticed that the temperature had a significant effect on biofilm formation for the strain under analysis (Fig. 1). In particular, in LB at pH 7.4, biofilm formation was pronounced at 25°C and hardly detectable at 37°C. However, pH of the medium also had an effect, because in LB at pH 5.5 MG1655 formed much more biofilm at 37°C than at 25°C. This phenomenon was only slightly affected by the mutations in the genes coding for the major transcriptional regulators of the AR2 system. This implies that none of these regulators is strongly involved in the transcriptional repression of the genes participating in biofilm formation, at least under our growth conditions. This is in line with the report showing that GadX only marginally affects biofilm biomass in the *E. coli* strain BW25113 [10].

Such striking inversion of the ability to produce biofilms was an unexpected finding. A possible explanation may reside in the pH 5.5, which is more typical of the distal gut. Therefore, the combination of two cues –mildly acidic pH and 37°C –could better approximate the host gut environment, thereby triggering biofilm formation, at least on an inert surface such as polystyrene. The slight increase in biofilm formation observed at 37°C when testing the mutants, regardless of the pH of the medium, could very likely

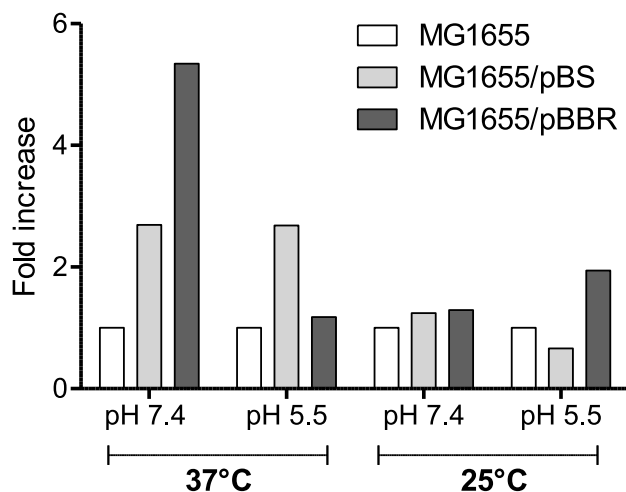


Fig. 2. Biofilm formation in *E. coli* MG1655 in the presence of plasmids. The change is reported as fold change increase/decrease with respect to the biofilm formed by the reference strain, i.e. *E. coli*, MG1655 under the indicated condition, which was set to 1.0. The SD of the reported values never exceeded 20% of the indicated value.

be related to an effect of the regulators on the biofilm structure rather than on the biomass, as noticed by other researchers [10], which may also be related to the observed repression of the AR2 and AFI genes in a temporal study of biofilm formation [11].

Effect of plasmids on biofilm formation

Another interesting finding derived from the observation of the effect of empty plasmids in bacteria tested for their biofilm-forming ability. In order not to add too many variables, we transformed *E. coli* MG1655 with either a high-copy number plasmid (pBS, in Table 1) or a medium-copy number plasmid (pBBR1MCS, in Table 1). Biofilm formation was assayed under the same conditions as those shown in Figure 1. The results are shown in Figure 2 as fold increase with respect to *E. coli* MG1655 not carrying a plasmid. These data clearly show that both plasmids sometimes exerted a negligible and sometimes a substantial effect on biofilm formation. This phenomenon depended on the medium pH and the temperature and could not be predicted *a priori*.

CONCLUSIONS

Our results clearly show that pH is an important driving force in dictating the formation of biofilms, to the same extent as temperature. Moreover, care should be taken when interpreting results on *E. coli* strains carrying plasmids that contain a gene complementing a mutation. In fact, we have shown that empty plasmids affect biofilm formation. To the best of our knowledge, this aspect is less investigated than the plasmid transfer within a biofilm [12]. ●

This work was in part funded to Daniela De Biase by the Pasteur Institute (Institut Pasteur, Paris; PTR 540).

REFERENCES

- Lund P.A., Tramonti A., De Biase D. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. V. 38. № 6. P. 1091–1125.
- Lin J., Lee I.S., Frey J., Slonczewski J.L., Foster J.W. // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. № 14. P. 4097–4104.
- De Biase D., Lund P.A. // *Adv. Appl. Microbiol.* 2015. V. 92. P. 49–88.
- Occhialini A., Jimenez de Bagues M.P., Saadeh B., Bastianelli D., Hanna N., De Biase D., Kohler S. // *J. Infect. Dis.* 2012. V. 206. № 9. P. 1424–1432.
- Cotter P.D., Gahan C.G., Hill C. // *Mol. Microbiol.* 2001. V. 40. № 2. P. 465–475.
- De Biase D., Pennacchietti E. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. № 4. P. 770–768.
- Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1996. V. 62. № 9. P. 3094–3100.
- Lee J., Page R., Garcia-Contreras R., Palermino J.M., Zhang X.S., Doshi O., Wood T.K., Peti W. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 373. № 1. P. 11–26.
- Tramonti A., De Canio M., De Biase D. // *Mol. Microbiol.* 2008. V. 70. № 4. P. 965–982.
- Hodges A.P., Dai D., Xiang Z., Woolf P., Xi C. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 3. P. e9513.
- Domka J., Lee J., Bansal T., Wood T.K. // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. № 2. P. 332–346.
- Stalder T., Top E. // *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2016. V. 2. P. 16022.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

Рукопись и сопроводительные документы следует присылать в редакцию в электронном виде:

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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