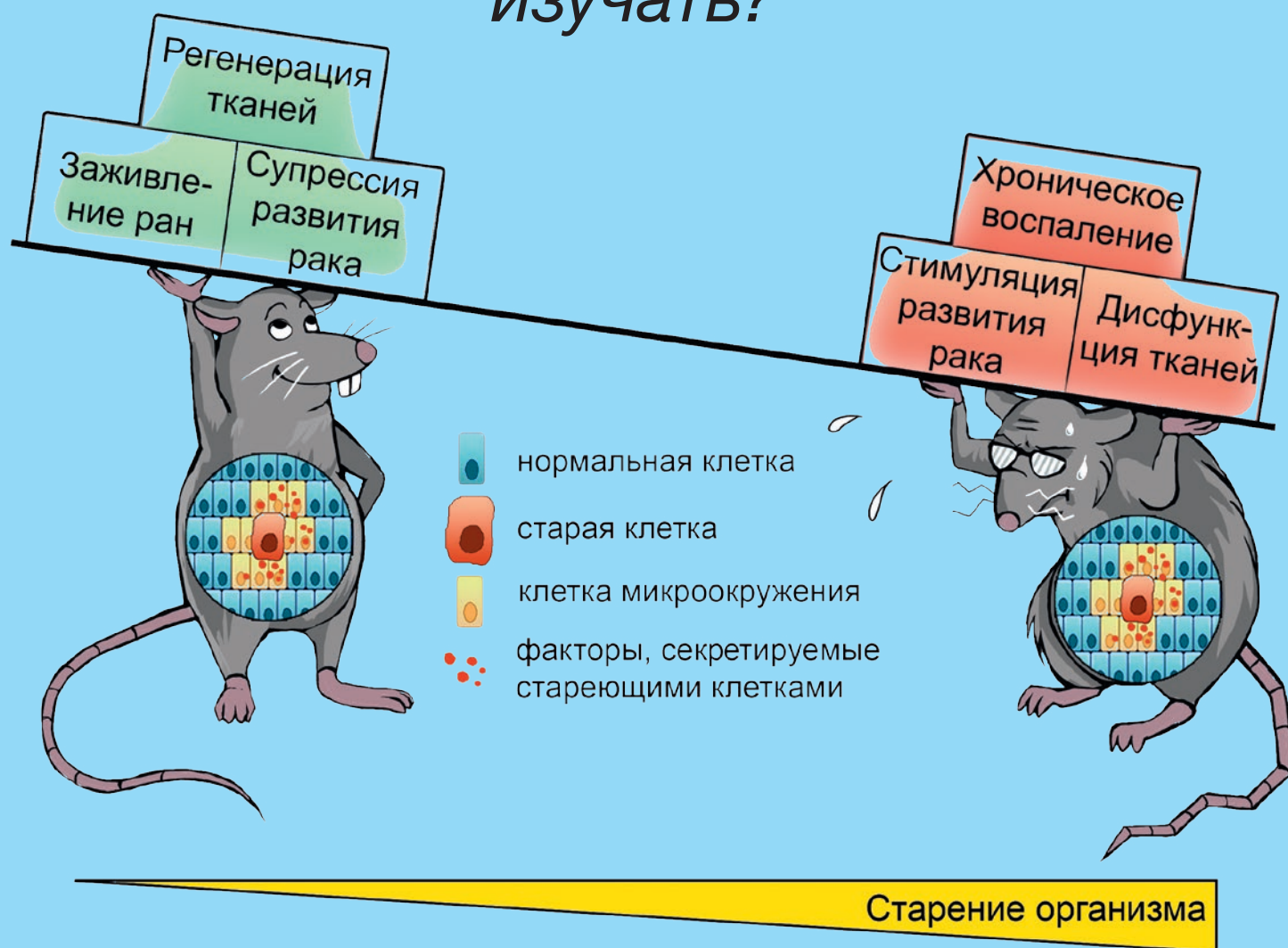


Acta Naturae

«Социальная жизнь» стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать?



ИЗУЧЕНИЕ ГЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ
ПРИ АДАПТАЦИИ К ГИПОТОНИЧЕСКИМ
УСЛОВИЯМ НА ПРИМЕРЕ
ТРЕХИГЛОЙ КОЛЮШКИ
(*Gasterosteus aculeatus*)
СТР. 70

TAL1: ЕГО РОЛЬ В ГЕМОПОЭЗЕ
И В ЗЛОКАЧЕСТВЕННОМ
ПЕРЕРОЖДЕНИИ
КЛЕТОК КРОВИ
СТР. 16

MERCK

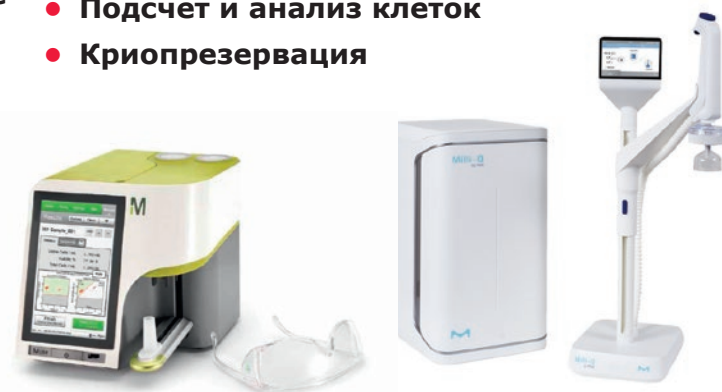
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- 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):

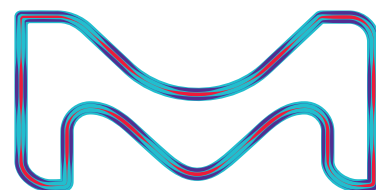
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

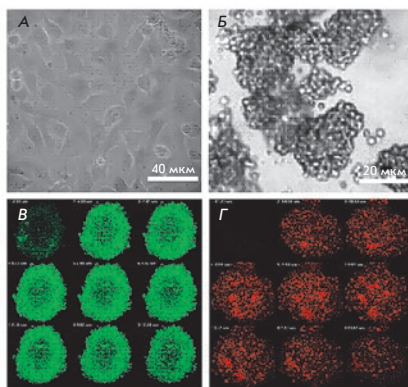
Высокопродуктивная линия-производитель фактора свертывания крови IX человека на основе клеток CHO



Схемы экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-VKORC, p1.2-Hyg-Fur

С. В. Ковнир, Н. А. Орлова, М. И. Шахпаронов, К. Г. Скрыбин, А. Г. Габитов, И. И. Воробьев

Рекомбинантный фактор свертывания крови IX человека получают при помощи клеток CHO, при этом продуктивность известных линий клеток относительно невысока. Титр активного фактора IX при культивировании может быть существенно увеличен за счет сверхэкспрессии эндогенного фермента витамин К-оксидоредуктазы китайского хомячка. Такая линия клеток 3B12-86 с конечным титром продукта 6 МЕ/мл была получена при использовании плазмидных векторов семейства p1.1. Секретируемый фактор IX был очищен при помощи трех стадий хроматографии до удельной активности 230 МЕ/мг с выходом более 30%.



Морфология клеток Ea.hy926 в 2D- и 3D-условиях культивирования

Влияние TNF и VEGF на свойства эндотелиальных клеток Ea.hy926 в модели многоклеточных сфероидов

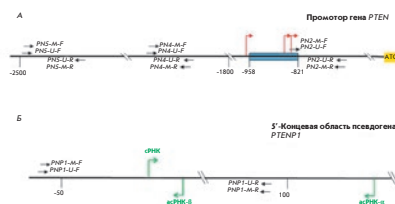
С. Ш. Гапизов, Л. Е. Петровская, Л. Н. Шингарова, Е. В. Свирцевская, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

В работе впервые показано, что культивирование клеток Ea.hy926 в статических условиях на антиадгезивной подложке приводит к образованию сфероидов (3D-культур). Изучена экспрессия ICAM-1 и VEGFR-2, а также продукция цитокинов клетками Ea.hy926, культивируемыми в 2D- и 3D-условиях в присутствии TNF и VEGF методами проточной цитометрии, конфокальной микроскопии и кПЦР.

Псевдоген PTENP1, в отличие от гена PTEN, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста

Т. Ф. Коваленко, К. В. Морозова, Л. А. Озолия, И. А. Лапина, Л. И. Патрушев

С помощью метилчувствительной ПЦР исследовали метилирование гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1* в клетках опухолей, гиперплазий и нормальных тканей эндометрия. Установлено, что ни в одном из образцов тканей ген *PTEN* не метилирован. Однако метилирование псевдогена *PTENP1* обнаружено во всех исследованных тканях, кроме периферической крови. При этом обнаружены значимые различия в частотах метилирования *PTENP1* в нормальной эндометрии молодых женщин (4%) и женщин среднего и пожилого возраста (58%).



Исследованные участки гена *PTEN* (А) и псевдогена *PTENP1* (Б)

Acta Naturae

ТОМ 10, № 1 (36), ЯНВАРЬ—МАРТ 2018

Учредители:

Министерство образования и науки РФ,
Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
ООО «Парк-медиа»

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 (Компъень, 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

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 марта 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

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.667

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

А. В. Бородкина, П. И. Дерябин, А. А. Грюкова,
Н. Н. Никольский

«Социальная жизнь» стареющих клеток:
что такое SASP и зачем его изучать! 4

Э. Р. Вагапова, П. В. Спиринов, Т. Д. Лебедев,
В. С. Прасолов

TAL1: его роль в гемопоэзе и в злокачественном
перерождении клеток крови 16

И. Г. Гвазава, О. С. Роговая, М. А. Борисов,
Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев

Патогенез сахарного диабета 1 типа
и экспериментальные модели
на лабораторных грызунах 25

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

С. Ш. Гапизов, Л. Е. Петровская, Л. Н. Шингарова,
Е. В. Свищевская, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

**Влияние TNF и VEGF на свойства эндотелиальных
клеток Ea.hy926 в модели многоклеточных
сфероидов 36**

Т. Ф. Коваленко, К. В. Морозова, Л. А. Озолия,
И. А. Лапина, Л. И. Патрушев

**Псевдоген *PTENP1*, в отличие от гена *PTEN*,
метилирован в нормальных, гиперпластических
и малигнизированных тканях эндометрия женщин
среднего и пожилого возраста 46**

С. В. Ковнир, Н. А. Орлова, М. И. Шахпаронов,
К. Г. Скрыбин, А. Г. Габибов, И. И. Воробьев

**Высокопродуктивная линия-продуцент
фактора свертывания крови IX человека
на основе клеток СНО 55**

С. М. Расторгуев, А. В. Недолужко, Н. М. Груздева,
Е. С. Булыгина, С. В. Цыганкова, Д. Ю. Ощепков,
А. М. Мазур, Е. Б. Прохорчук, К. Г. Скрыбин

**Изучение генной экспрессии при адаптации
к гипотоническим условиям на примере
трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*) ... 70**

А. Ю. Ротов, Л. А. Астахова, В. С. Ситникова,
А. А. Евдокимов, В. М. Бойцов, М. В. Дубина,
М. Н. Рязанцев, М. Л. Фирсов

**Новые экспериментальные модели
фоторецепторной дегенерации
сетчатки для скрининга молекулярных
фотохромных блокаторов ионных каналов ... 79**

Л. А. Степанова, Р. Ю. Котляров, М. А. Шуклина,
Е. А. Блохина, М. В. Сергеева, М. В. Потапчук,
А. А. Ковалева, Н. В. Равин, Л. М. Цыбалова

**Влияние порядка присоединения фрагментов
HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину
на свойства рекомбинантных белков 90**

Правила для авторов 101

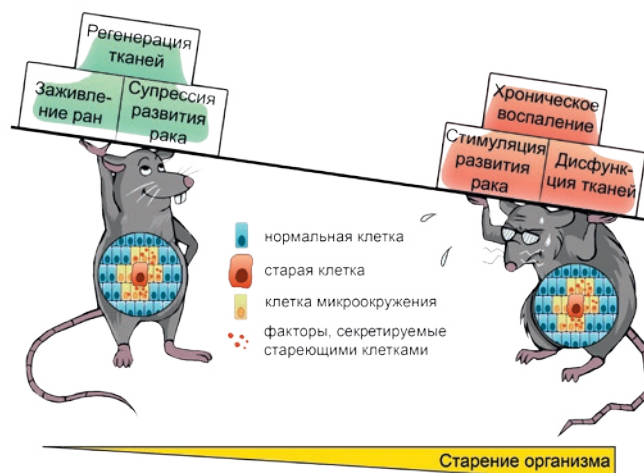


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Бородкиной и др.)

УДК 576.3.1

«Социальная жизнь» стареющих клеток: что такое SASP и зачем его изучать?

А. В. Бородкина*, П. И. Дерябин, А. А. Грюкова, Н. Н. Никольский

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

*E-mail: borodkina618@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2017

Принята к печати 12.02.2018

РЕФЕРАТ Феномен клеточного старения впервые был описан как предел деления нормальных клеток в культуре. С момента первого упоминания и вплоть до недавнего времени основной акцент при изучении клеточного старения был сделан на внутриклеточных изменениях, сопровождающих этот процесс. Наибольшее внимание уделялось необратимой остановке пролиферации стареющих клеток и двум логично вытекающим физиологическим следствиям – супрессии канцерогенеза за счет ареста роста поврежденных клеток и ускорению организменного старения ввиду ухудшения репарации тканей с возрастом. Однако в настоящее время наблюдается смещение акцентов при исследовании клеточного старения. Оказалось, что стареющие клетки через ауто/паракринный механизм могут влиять на клетки микроокружения, секретируя множество различных факторов, включая цитокины, хемокины, протеазы и ростовые факторы. Такой профиль секретируемых стареющими клетками молекул получил название ассоциированного со старением секреторного фенотипа (*senescence associated secretory phenotype, SASP*). На сегодняшний день известно, что SASP опосредует участие стареющих клеток в самых разнообразных биологических процессах, включая регенерацию, ремоделирование тканей, эмбриогенез, воспаление и туморогенез. Настоящий обзор посвящен описанию «социальной жизни» стареющих клеток, а именно: составу, механизмам регуляции и функциональной роли ассоциированного со старением секреторного фенотипа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антагонистическая плейотропия, ассоциированный со старением секреторный фенотип, иммунный клиренс, клеточное старение, стволовые клетки, супрессия опухолей, туморогенез.

ВВЕДЕНИЕ

Историю исследования клеточного старения (КС) можно представить в рамках известного диалектического закона «отрицания отрицания», описывающего процесс развития в виде спирали (рис. 1). Первый виток такой условной спирали берет начало более 100 лет назад и отражает господствующую в науке длительное время точку зрения, что старение – это явление, присущее исключительно организмам, и в клеточной культуре его можно избежать. Основное подтверждение этой гипотезы было получено и опубликовано в работе нобелевского лауреата А. Карреля [1]. В своих опытах Каррель демонстрировал возможность бесконечной пролиферации клеток в культуре при наличии адекватных условий, достаточного количества питательных веществ и, как говорил он сам, «должной аккуратности». Смена парадигм и переход на новый виток спирали произошли спустя почти 50 лет, благодаря работе Л. Хейфлика, который установил существование предела деления для нормальных человеческих фи-

бробластов *in vitro* [2]. Позднее этот предел получил название лимита Хейфлика, а сам автор интерпретировал свою находку как проявление старения человека на клеточном уровне [3]. Следующий важный этап исследования клеточного старения датируется началом 1970-х годов, когда независимо друг от друга А. Оловников и Д. Уотсон описали проблему концевой недорепликации ДНК [4, 5]. Согласно этой гипотезе, при каждом клеточном делении происходит укорочение 5'-концевой дочерней цепи ДНК, что в конечном итоге приводит к достижению лимита Хейфлика. Как следствие, была сформулирована теломерная теория, согласно которой именно укорочение теломер опосредует репликативное старение клеток [4]. Чуть позднее была установлена структура и исследованы свойства теломер [6]. Примерно в это же время стали появляться работы, свидетельствующие о существовании другого типа КС, независимого от длины теломер [7, 8]. Этот тип старения получил название преждевременного, так как признаки старения проявлялись в клетках на ранних пассажах

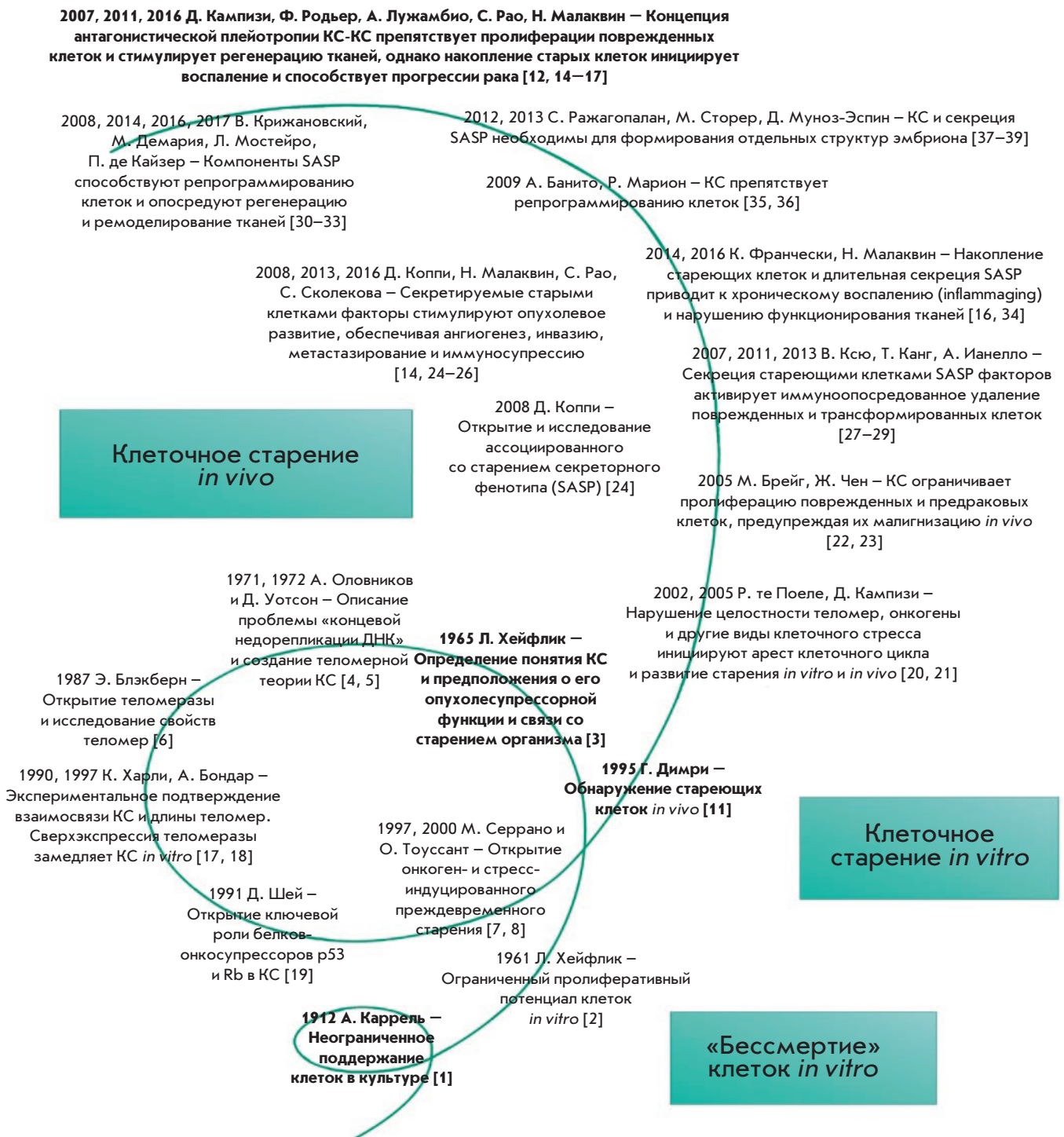


Рис. 1. Важнейшие этапы истории исследования клеточного старения

задолго до наступления репликативного старения. Основными индукторами преждевременного старения принято считать разнообразные стрессовые воздействия, а также сверхэкспрессию онкогенов [7–10].

Несмотря на прогресс в исследовании механизмов КС, в течение длительного времени взаимосвязь между старением клеток и организма оставалась гипотетической. И только в 1995 году были получены

экспериментальные доказательства существования старых клеток в образцах человеческих тканей [11]. Связав процессы, происходящие *in vivo* и *in vitro*, эти наблюдения подводят логический итог предыдущего витка спирали и служат началом для следующего, который продолжается вплоть до настоящего времени. Ранее проявления КС на организменном уровне рассматривали как нечто однонаправленное, ассоциированное исключительно с возрастом и возрастными заболеваниями. На сегодняшний день эффекты КС описываются концепцией антагонистической плейотропии, подразумевающей его роль в самых разнообразных, а иногда и противоположных процессах, таких, как репарация, регенерация, ремоделирование тканей, эмбриогенез, воспаление, супрессия опухолей и туморогенез [12–16].

ФЕНОМЕНОЛОГИЯ КЛЕТЧНОГО СТАРЕНИЯ

Прежде чем перейти к основной части данного обзора, посвященной изменениям, сопровождающим КС, и его роли в различных биологических процессах, необходимо понять суть этого феномена. С механистической точки зрения термин КС подразумевает необратимую потерю пролиферативного потенциала метаболически активных клеток, возникающую как следствие нерепарируемых повреждений ДНК [40]. Переходя к рассмотрению КС на организменном уровне, становится очевидным, что предотвращение пролиферации поврежденных клеток в результате их старения обеспечивает поддержание тканевого гомеостаза. Логично вытекающей из двух вышестоящих утверждений и общепринятой на сегодняшний день является точка зрения о том, что старение характерно исключительно для пролиферирующих клеток.

В ходе онтогенеза пролиферация клеток начинается с момента первого дробления зиготы. Образующиеся в результате митотических делений бластомеры и впоследствии эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), как известно, обладают неограниченным репликативным потенциалом. На молекулярном уровне отсутствие репликативного старения ЭСК опосредовано активностью теломеразы, компенсирующей укорочение теломер при каждом клеточном делении [41, 42]. Важно, что для этих клеток также не характерно преждевременное старение: при возникновении нерепарируемых повреждений ЭСК элиминируются из популяции путем апоптоза, что необходимо для сохранения стабильности генома [43]. Благодаря неограниченной пролиферации и способности к дифференцировке ЭСК дают начало всем типам клеток взрослого организма.

Во взрослом организме большинство клеток дифференцированы и находятся в состоянии покоя [44]. Стоит подчеркнуть, что это состояние характери-

зуется продолжительной остановкой пролиферации, однако принципиально отличается от КС [45]. Во-первых, арест роста в этом случае не является следствием повреждения ДНК. Во-вторых, этот арест может быть обратим: при наличии определенных стимулов дифференцированные клетки, находящиеся в фазе G0 клеточного цикла, способны снова войти в цикл и начать пролиферировать. Одним из таких стимулов служат нарушения функционирования тканей или органов в результате их повреждения. В этом случае покоящиеся клетки, такие, как фибробласты кожи, гладкомышечные клетки, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки многих внутренних органов, включая поджелудочную железу, печень, почки, легкие, предстательную железу и молочные железы, могут начать пролиферировать для замещения поврежденных участков [44]. Большинство перечисленных типов клеток подвергаются как репликативному, так и преждевременному старению [40, 46–48]. Интересно, однако, что при возникновении повреждений индукция КС одинаково предпочтительна не для всех типов клеток [49]. Так, например, эпителий является очень динамичной тканью, характеризующейся высокой скоростью обновления. Гомеостаз в этой ткани поддерживается в основном за счет гибели поврежденных и пролиферации нормальных клеток, в соответствии с чем эпителиальные клетки более склонны к апоптозу, нежели к запуску КС [50]. Противоположная ситуация характерна для стромальных клеток, формирующих каркас всех внутренних органов. Эти клетки устойчивы к апоптозу и с большей вероятностью входят в состояние старения [49].

Несмотря на описанные выше примеры восстановления пролиферации некоторых типов эпителиальных и стромальных клеток, *in vivo* большая часть клеток, выполняющих специализированные функции, находится в терминально дифференцированном состоянии и, за редким исключением, не способна пролиферировать даже при серьезных повреждениях [44]. В этом случае регенерация осуществляется за счет деления и дифференцировки взрослых стволовых клеток (СК). На сегодняшний день практически в каждой ткани обнаружен пул резидентных стволовых клеток [51]. Однако оказалось, что взрослые СК также подвержены старению. Во-первых, в этих клетках отсутствует активная теломераза, вследствие чего СК, как и другие пролиферирующие клетки, репликативно стареют [52, 53]. Во-вторых, сравнительно недавно установлен факт индукции преждевременного старения СК при действии различных стрессовых факторов [54–56]. Принимая во внимание исключительную роль СК в регенерации тканей во взрослом организме, нельзя не отме-

тить негативные последствия старения этих клеток. Стареющие СК утрачивают способность пролиферировать, снижается их миграционная активность и дифференцировочный потенциал [57]. Таким образом, КС приводит к постепенному истощению пула функциональных СК: с одной стороны, уменьшается их число, а с другой, они перестают должным образом реагировать на внешние стимулы [58]. В настоящее время существует точка зрения о взаимосвязи между старением СК и общим старением организма, а также растет число данных, описывающих вклад стареющих СК в развитие различных заболеваний, ассоциированных с возрастом [58, 59].

Говоря о КС, нельзя не упомянуть совершенно особый случай – старение трансформированных клеток. Учитывая, что раковые клетки обладают неограниченным пролиферативным потенциалом, речь, конечно, идет не о репликативном, а о преждевременном старении. Однако, если преждевременное КС нормальных пролиферирующих клеток является физиологической реакцией на стресс, то в трансформированных клетках его можно индуцировать только при таких специфических воздействиях, как обработка химиотерапевтическими агентами, облучение радиацией и сверхэкспрессия генов-ингибиторов роста [60]. Таким образом, индукцию КС в трансформированных клетках можно рассматривать как один из способов остановки опухолевого роста [60].

«СОЦИАЛЬНАЯ ЖИЗНЬ» СТАРЕЮЩИХ КЛЕТОК

Известно, что основные признаки КС сходны как у различных его форм, так и у различных типов пролиферирующих клеток [40]. На рис. 2 отражены наиболее важные «индивидуальные» внутриклеточные изменения, сопровождающие КС, которые условно разделены на события, происходящие в ядре и цитоплазме. Особое место среди модификаций, сопровождающих КС, занимает изменение секреторного профиля. В настоящее время принято считать, что ассоциированный со старением секреторный фенотип (senescence associated secretory phenotype, SASP) обуславливает участие стареющих клеток в самых разнообразных процессах, таких, как репарация, распространение старения, иммунный клиренс, эмбриогенез и туморогенез [29, 31, 38, 79, 80].

Классификация факторов, входящих в SASP

Термин SASP впервые использовали в 2008 году для обозначения факторов, секретлируемых стареющими клетками [24]. На сегодняшний день принята следующая классификация компонентов, входящих в SASP: растворимые сигнальные факторы, протеазы, нерастворимые белки внеклеточного матрикса и небелковые компоненты [78]. По молекулярным ме-

ханизмам факторы SASP можно разделить на следующие группы [81]:

1) Факторы, связывающиеся с рецептором. В состав данной группы входят растворимые сигнальные молекулы, к которым относятся цитокины, хемокины и ростовые факторы. Эти факторы могут влиять на клетки микроокружения, взаимодействуя с соответствующими поверхностными рецепторами на их мембранах и запуская таким образом разные внутриклеточные сигнальные каскады [82, 83]. Наиболее известными представителями этой группы являются интерлейкины IL-6, IL-8, IL-1a, хемокины GRO α , GRO β , CCL-2, CCL-5, CCL-16, CCL-26, CCL-20 и ростовые факторы HGF, FGF, TGF β , GM-CSF.

2) Факторы, действующие напрямую. Эта группа включает матриксные металлопротеазы MMP-1, MMP-10, MMP-3 и сериновые протеазы: тканевый активатор плазминогена (tPA) и урокиназный активатор плазминогена (uPA). Эти факторы способны расщеплять мембраносвязанные белки, разрушать сигнальные молекулы и ремоделировать внеклеточный матрикс, благодаря чему стареющие клетки могут модифицировать свое микроокружение [84]. В эту группу можно отнести и маленькие небелковые компоненты, к которым относятся активные формы кислорода (АФК) и азота, повреждающие соседние клетки [78, 85].

3) Регуляторные факторы. В эту группу входят тканевые ингибиторы металлопротеаз (TIMP), ингибитор активатора плазминогена (PAI) и белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (IGFBP). Эти факторы не имеют собственной ферментативной активности, однако, связываясь с факторами, входящими в первую и вторую группы, регулируют их функционирование. Так, например, TIMP подавляют активность большинства MMP [86], PAI-1 функционирует преимущественно как ингибитор tPA и uPA [87], а IGFBP работают как белки-транспортеры IGF [88].

В дополнение ко всем упомянутым факторам, секретлируемым старыми клетками, недавно в качестве еще одного компонента SASP начали рассматривать внеклеточные везикулы, в частности везикулы, ассоциированные с микроРНК [89]. Оказалось, что такие везикулы могут влиять на соседние клетки и на клетки, расположенные на значительном удалении, причем как иницируя, так и подавляя КС в зависимости от состава микроРНК.

Хотелось бы отдельно подчеркнуть, что конкретный качественный и количественный состав секретлируемых факторов в значительной степени зависит от типа клеток и индуктора старения, что существен-

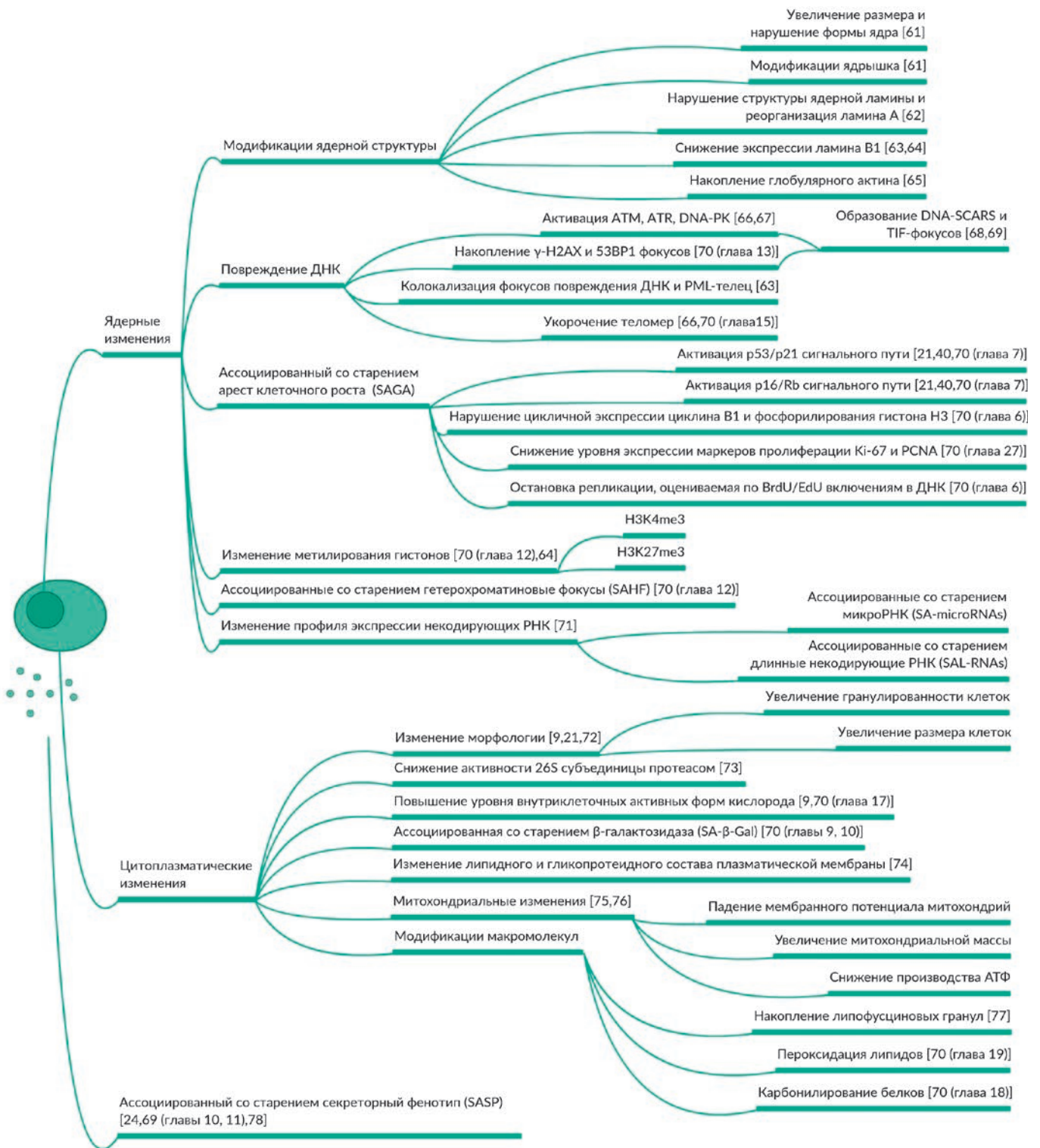


Рис. 2. Биомаркеры стареющих клеток. Представлены основные признаки стареющих клеток и приведены ссылки на работы, описывающие методические подходы к их оценке



Рис. 3. Экспериментальные подходы к исследованию состава SASP и выявлению функциональной роли его отдельных компонентов

но затрудняет изучение этого признака КС. На сегодняшний день описано несколько подходов к исследованию SASP и выявлению функций его отдельных компонентов. Основные из этих подходов отражены на рис. 3.

Механизмы регуляции SASP

Клеточное старение, как известно, явление не одномоментное, а развивающееся во времени [99]. Интересно, что в последнее время SASP также ста-

ли рассматривать как динамический процесс, в котором условно можно выделить несколько фаз [16]. Считается, что первая фаза секреции начинается сразу после повреждения ДНК и продолжается в течение первых 36 ч. Стоит отметить, что появление этой фазы не является достаточным свидетельством в пользу инициации старения, так как не исключает полной репарации или апоптоза [99]. Следующая фаза – фаза «раннего» SASP, которая продолжается в течение нескольких дней после запуска КС.

Именно в этот период наблюдается появление наиболее важных факторов SASP, например IL-1 α . В течение последующих 4–10 дней за счет аутокринного воздействия SASP происходит усиление секреции большинства факторов, что приводит в конечном итоге к формированию «зрелого» SASP [16]. Такая волновая секреция факторов в процессе развития КС во многом обусловлена наличием петель положительной обратной связи и сложных регуляторных механизмов. Ниже представлены наиболее распространенные механизмы регуляции SASP.

Необходимо отметить, что SASP регулируется как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровнях. Ключевая роль в регуляции экспрессии компонентов SASP, включая IL-6, IL-8, CXCL1, CXCR2, отводится ядерному фактору κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) [100–102]. В контроль транскрипции большинства этих факторов вовлечены петли положительной обратной связи. Ярким примером таких «самоусиливающихся» петель служит регуляция секреции IL-1 α [15, 103]. Описано также участие другого транскрипционного фактора – C/EBP β , который, связываясь непосредственно с промотором гена IL-6, инициирует его экспрессию [82, 104].

На посттранскрипционном уровне регуляции SASP принято выделять DDR (DNA Damage Response)-зависимый и -независимый механизмы [15]. Как сказано выше, одним из наиболее важных признаков КС является ответ на повреждение ДНК. Показано, что нокдауны таких участников DDR, как ATM, Chk2, NBS1, H2AX, снижают экспрессию и соответственно секрецию ряда факторов SASP, включая IL-6 и IL-8 [104–106]. Несмотря на имеющиеся доказательства вовлеченности DDR в регуляцию SASP, детальные механизмы их взаимосвязи изучены не до конца. Известные на сегодня сигнальные пути связаны с возможностью участников DDR, в частности киназы ATM, тем или иным образом регулировать активность NF- κ B. Так, например, ATM может образовывать комплексы с белком NEMO, которые вследствие инициации DDR экспортируются из ядра в цитоплазму, где NEMO связывает и активирует киназу IKK. IKK способствует диссоциации ингибиторного белка I κ B из комплекса с NF- κ B и активации последнего [107]. Сравнительно недавно было показано участие транскрипционного фактора GATA4 в DDR-зависимом механизме регуляции SASP [108]. В норме GATA4 деградирует путем p62-опосредованной аутофагии. В большинстве стареющих клеток аутофагия подавлена и, следовательно, GATA4 стабилизируется, причем этот процесс зависит от ATM. Накопление GATA4 в стареющих клетках способствует инициации и поддержанию активности NF- κ B.

В DDR-независимом механизме регуляции SASP центральное место отводится стресс-киназе p38, вовлеченной в активацию сигнального пути p16^{Ink4a}/Rb, опосредующего арест клеточного цикла в стареющих клетках [109]. В ряде работ показано, что подавление экспрессии p38 предотвращает секрецию большинства цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, входящих в состав SASP [110, 111]. Кроме того, поддержание p38 в активном состоянии в течение длительного времени способно инициировать SASP в отсутствие каких-либо других стимулов, вызывающих старение [110]. В результате изучения механизма участия p38 в регуляции SASP была предложена следующая цепь сигнальных событий: p38 активирует свои нижележащие мишени – киназы MSK1 и MSK2, которые затем фосфорилируют p65, трансактивационную субъединицу NF- κ B, способствуя тем самым инициации экспрессии многих факторов SASP [16, 112, 113].

Относительно недавно была выявлена роль белка mTOR в регуляции SASP [114, 115]. С одной стороны, было показано, что mTOR может контролировать трансляцию IL-1 α и таким образом регулировать SASP [115]. С другой стороны, mTOR контролирует трансляцию киназы MK-2, которая фосфорилирует специфический РНК-связывающий белок ZFP36L1, препятствуя деградации транскриптов большого числа факторов SASP [114]. Еще один возможный вариант участия mTOR в регуляции SASP связывают с присутствием на транс-стороне аппарата Гольджи особого компартмента (TOR-autophagy spatial coupling compartment, TASCC), в котором накапливаются аутолизосомы и mTOR во время старения [116]. Предполагается, что аккумуляция mTOR в этом компартменте способствует ускорению синтеза факторов SASP.

Регуляторные механизмы, описанные выше, наиболее хорошо изучены на сегодняшний день. Однако огромное разнообразие белков, входящих в SASP, а также зависимость состава секреторируемых факторов от клеточного контекста и типа старения приводят к росту исследований, ориентированных на детализацию молекулярных механизмов регуляции SASP. В большинстве публикаций акцент делается на взаимосвязи механизмов регуляции и функциональной роли SASP в конкретных биологических процессах, речь о которых пойдет в следующей главе. Стоит отметить, что основная часть исследований выполнена на раковых клетках или на фибробластах. Парадоксально, но при очевидной биологической значимости старения стволовых клеток молекулярным механизмам регуляции SASP в этих клетках посвящено сравнительно небольшое количество работ.

Функциональная роль SASP

Для понимания механизмов, опосредующих участие SASP в разнообразных биологических процессах, прежде всего необходимо ответить на основополагающий вопрос: зачем стареющие клетки секретируют такое большое количество специфических факторов? Исходя из состава, логично предположить, что *in vivo* SASP может служить неким сигналом, свидетельствующим о появлении стареющих клеток в организме. Схематически этот процесс можно описать следующим образом: секретируемые провоспалительные цитокины и хемокины формируют очаг воспаления и привлекают клетки иммунной системы к местам локализации стареющих клеток для их элиминации; белки, ремоделирующие внеклеточный матрикс, облегчают проникновение клеток иммунной системы к этим местам; секретируемые ростовые факторы стимулируют пролиферацию соседних клеток для последующего замещения удаляемых клеток. В молодом здоровом организме работа этого механизма хорошо отрегулирована, однако с возрастом или в случае каких-либо нарушений его эффективность может существенно снижаться, приводя к накоплению стареющих клеток в популяции и соответственно к продолжительной секреции факторов SASP. Таким образом, результат влияния компонентов SASP на микроокружение определяется неким условным балансом между временем присутствия стареющих клеток в популяции и скоростью их элиминации клетками иммунной системы [12, 14–16]. Так, положительные для организма эффекты SASP обусловлены временным присутствием старых клеток, тогда как отрицательные эффекты связаны с накоплением стареющих клеток и возникновением очага хронического воспаления.

В качестве примера такой временной зависимости эффектов SASP можно привести противоположные последствия феномена «ауто/паракринного старения». Установлено, что секретируемые стареющими клетками молекулы, попадая во внеклеточное пространство, способны через ауто/паракринный пути воздействовать на соседние нормальные клетки и инициировать арест клеточного цикла, остановку пролиферации, в значительной степени ускоряя развитие КС в популяции [80, 83, 117]. Так, например, кондиционная среда, полученная от репликативно-, онкоген- или этопозид-состаренных фибробластов, содержащая высокий уровень IL-1, IL-6 и TGF β , способствует повышению уровня АФК, повреждению ДНК и соответственно запуску старения в нормальных клетках [117]. Также установлена роль таких факторов SASP, как активин А, GDF15, VEGF, хемокины CCL2 и CCL20, в регуляции старения [80]. Оказалось, что соединения, ингибирующие актив-

ность или связывающие рецепторы этих факторов, предотвращают развитие старения в популяции фибробластов. Согласно нашим предварительным результатам, культивирование стволовых клеток эндометрия в кондиционной среде, полученной от старых клеток, также инициирует преждевременное старение в молодых клетках, причем важную роль в этом процессе играет белок PAI-1. Возвращаясь к дуализму конечных эффектов SASP, можно отметить, что в случае временного присутствия стареющих клеток аутокринное старение играет положительную роль: во-первых, предотвращается пролиферация самих поврежденных клеток, а во-вторых, активируется иммунный ответ, приводящий к их удалению [28–31, 118].

Однако накопление стареющих клеток и длительная секреция SASP, способствующая распространению преждевременного старения на соседние клетки, может приводить к нарушению функционирования тканей, ускорению развития старения и различных возраст-ассоциированных заболеваний [33, 119]. Например, повышенная секреция матриксных металлопротеаз стареющими клетками играет важную роль в прогрессии таких патологий, как ишемическая болезнь сердца, остеопороз и остеоартрит [120, 121]. Стареющие гладкомышечные клетки, секретирующие большие количества провоспалительных цитокинов, участвуют в развитии атеросклероза [122]. Повышение секреции TNF α стареющими Т-клетками вовлечено в механизм потери костной ткани [123]. Также известно, что сверхэкспрессия IL-6 может приводить к гиперинсулинемии, воспалению печени и легочной гипертензии [124, 125]. Кроме того, сравнительно недавно для обозначения неинфекционного хронического системного воспаления, сопровождающего старение, в прогрессии которого секретируемые старыми клетками факторы SASP играют важнейшую роль, был введен термин *inflammaging* [34].

Еще одно проявление двойственности функциональных эффектов SASP – его опухолесупрессорная и опухоль-промотирующая активности [2, 14, 28, 78]. В ряде работ, освещающих туморогенную роль SASP, показано, что факторы, секретируемые стареющими фибробластами, стимулируют пролиферацию различных предраковых и трансформированных линий клеток [24, 25, 126, 127]. Позднее установили, что в культуре предраковых эпителиальных клеток SASP индуцирует эпителиально-мезенхимальный переход и усиливает инвазию клеток, в частности, за счет повышенного содержания IL-6 и IL-8 [24]. Установлено, что факторы SASP, секретируемые стареющими стволовыми клетками, также способствуют прогрессии рака, ускоряя пролифера-

цию и миграцию трансформированных клеток [57]. Например, факторы SASP, секретируемые СК, стимулируют деление и миграцию клеток рака молочной железы как *in vitro*, так и на мышинной модели [57]. Кроме того, оказалось, что стареющие СК, секретирующие большие количества IL-6 и IL-8, увеличивают устойчивость клеток рака молочной железы к цисплатину [26]. Исходя из имеющихся на сегодняшний день данных, наиболее вероятно, что компоненты SASP индуцируют пролиферацию, выживание и метастазирование в уже коммитированных предраковых клетках [14].

В основе опухолесупрессорной функции лежит способность факторов SASP привлекать клетки иммунной системы для элиминации поврежденных стареющих клеток. Так, на мышинной модели показано, что сверхэкспрессия Ras приводит к запуску индуцированного онкогенами старения гепатоцитов, которое сопровождается активацией SASP, стимуляцией опосредованного CD4⁺ иммунного ответа и, как следствие, удалением этих клеток [28]. Еще одно доказательство опухолесупрессорной роли SASP получено также на мышинной модели гепатокарциномы, однако КС индуцировали сверхэкспрессией p53 [29]. В этом случае секреция стареющими раковыми клетками различных хемокинов приводит к рекрутированию натуральных киллеров (natural killer cells, NK) для их клиренса. Интересно, что удаление хемокина CCL2 при помощи антител предотвращает привлечение NK-клеток и уменьшает элиминацию старых клеток.

Отдельного внимания заслуживает участие SASP в регенерации тканей. Известно, что факторы SASP могут влиять на сигнализацию и дифференцировку стволовых клеток [33, 128, 129]. Так, один из ключевых компонентов SASP – IL-6 способствует индукции и поддержанию плюрипотентности, в частности за счет регуляции экспрессии Nanog [130, 131]. Более того, в экспериментах *in vivo* показано, что секреция SASP способствует репрограммированию клеток микроокружения [32]. Подобная опосредованная SASP регенерация тканей является еще одним примером временной зависимости конечных эффектов SASP. В молодом организме кратковременное действие SASP способствует регенерации ткани за счет временного репрограммирования и последующей пролиферации и дифференцировки соседних клеток, тогда как в пожилом организме неэффективная элиминация старых клеток и длительная секреция SASP могут приводить к задержке клеток микроокружения в дедифференцированном состоянии и соответственно к торможению регенерации [33].

Интересные результаты, касающиеся роли SASP в регенерации и ремоделировании тканей, получены при исследовании молекулярных механизмов заживления ран. Оказалось, что в течение нескольких дней в местах нанесения раны детектируются стареющие фибробласты и эндотелиальные клетки, которые способствуют ее заживлению, благодаря секреции PDGF-A – фактора SASP, ответственного за дифференцировку миофибробластов [31]. Кроме того, установлена роль SASP в ремоделировании тканей в эмбриональном развитии [31, 37–39]. Показано, что SASP-опосредованное ремоделирование происходит как со стороны материнского организма, так и со стороны эмбриона. Так, например, выявлено участие SASP в ремоделировании материнской сосудистой сети на ранних сроках беременности [131]. В процессе эмбрионального развития появляются стареющие клетки, которые посредством SASP служат неким первичным сигналом, запускающим макрофаг-опосредованное удаление клеток, необходимое для правильного развития отдельных структур эмбриона [31, 38, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя все вышеизложенное, хотелось бы вернуться к последнему витку спирали, отражающему современный этап истории изучения клеточного старения, и еще раз подчеркнуть плеiotропность эффектов КС. Очевидно, что экспериментальные подходы, подразумевающие элиминацию стареющих клеток из организма и рассматриваемые в качестве «антивозрастной» терапии, могут иметь множество сопутствующих нежелательных последствий. В связи с этим наиболее перспективной кажется разработка стратегий, направленных на модуляцию состава факторов, секретируемых старыми клетками, с целью усиления положительных и минимизации возможных негативных эффектов SASP. В этом контексте особое значение приобретает возможность модуляции факторов SASP стареющих СК. Принимая во внимание, что в настоящее время наиболее вероятным механизмом влияния СК на репарацию тканей считается их паракринная активность, проблема изменения секреторного профиля СК в результате их старения становится весьма актуальной и требует дополнительных исследований. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(проект № 14-50-00068).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carrel A. // *J. Exp. Med.* 1912. V. 15. № 5. P. 516–528.
2. Hayflick L., Moorhead P.S. // *Exp. Cell Res.* 1961. V. 25. P. 585–621.
3. Hayflick L. // *Exp. Cell Res.* 1965. V. 37. P. 614–636.
4. Olovnikov A.M. // *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1971. V. 201. P. 1496–1499.
5. Watson J.D. // *Nat. New Biol.* 1972. V. 239. P. 197–201.
6. Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell.* 1987. V. 51. № 6. P. 887–898.
7. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. // *Cell.* 1997. V. 88. № 5. P. 593–602.
8. Toussaint O., Medrano E.E., von Zglinicki T. // *Exp. Gerontol.* 2000. V. 35. № 8. P. 927–945.
9. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 22. P. 2463–2479.
10. Fridlyanskaya I.I., Alekseenko L.L., Nikolsky N.N. // *Exp. Gerontol.* 2015. V. 72. P. 124–128.
11. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 20. P. 9363–9367.
12. Rodier F., Campisi J. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 192. № 4. P. 547–556.
13. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. № 12. P. 1424–1435.
14. Rao S.G., Jakson J.G. // *Trends Cancer.* 2016. V. 2. № 11. P. 676–687.
15. Lujambio A. // *Bioessays.* 2016. V. 38. № 1. P. 56–64.
16. Malaquin N., Martinez A., Rodier F. // *Exp. Gerontol.* 2016. V. 82. P. 39–49.
17. Harley C.B., Futcher A.B., Greider C.W. // *Nature.* 1990. V. 345. № 6274. P. 458–460.
18. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. // *Science.* 1998. V. 279. № 5349. P. 349–352.
19. Shay J.W., Pereira-Smith O.M., Wright W.E. // *Exp. Cell Res.* 1991. V. 196. № 1. P. 33–39.
20. te Poele R.H., Okorokov A.L., Jardine L., Cummings J., Joel S.P. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 6. P. 1876–1883.
21. Campisi J. // *Cell.* 2005. V. 120. № 4. P. 513–522.
22. Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A.H., Schlegelberger B., Stein H., Dörken B., Jenuwein T., Schmitt C.A. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7051. P. 660–665.
23. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., et al. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7051. P. 725–730.
24. Coppe J.P., Patil C.K., Rodier F., Sun Y., Munoz D.P., Goldstein J., Nelson P.S., Desprez P.Y., Campisi J. // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. P. 2853–2868.
25. Malaquin N., Vercamer C., Bouali F., Martien S., Deruy E., Wernert N., Chwastyniak M., Pinet F., Abbadie C., Pourtier A. // *PLoS One.* 2013. V. 8. P. e63607.
26. Skolekova S., Matuskova M., Bohac M., Toro L., Demkova L., Gursky J., Kucerova L. // *Cell Commun. Signal.* 2016. V. 14. № 4. P. 1–13.
27. Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R.A., Hernandez E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., Lowe S.W. // *Nature.* 2007. V. 445. № 7128. P. 656–660.
28. Kang T.W., Yevsa T., Woller N., Hoenicke L., Wuestefeld T., Dauch D., Hohmeyer A., Gereke M., Rudalska R., Potapova A., et al. // *Nature.* 2011. V. 479. P. 547–551.
29. Iannello A., Thompson T.W., Ardolino M., Lowe S.W., Rault D.H. // *J. Exp. Med.* 2013. V. 210. P. 2057–2069.
30. Krizhanovsky V., Yon M., Dickins R.A., Hearn S., Simon J., Miething C., Yee H., Zender L., Lowe S.W. // *Cell.* 2008. V. 134. P. 657–667.
31. Demaria M., Ohtani N., Youssef S.A., Rodier F., Toussaint W., Mitchell J.R., Laberge R.M., Vijg J., van Steeg H., Dolle M.E., et al. // *Dev. Cell.* 2014. V. 31. P. 722–733.
32. Mosteiro L., Pantoja C., Alcazar N., Marión R.M., Chondronasiou D., Rovira M., Fernandez-Marcos P.J., Muñoz-Martin M., Blanco-Aparicio C., Pastor J., et al. // *Science.* 2016. V. 25. № 354. P. af4445.
33. de Keizer P.L. // *Trends Mol. Med.* 2017. V. 23. № 1. P. 6–17.
34. Franceschi C., Campisi J. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2014. V. 69. P. S4–S9.
35. Banito A., Rashid S.T., Acosta J.C., Li S., Pereira C.F., Geti I., Pinho S., Silva J.C., Azuara V., Walsh M., et al. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 18. P. 2134–2139.
36. Marión R.M., Strati K., Li H., Murga M., Blanco R., Ortega S., Fernandez-Capetillo O., Serrano M., Blasco M.A. // *Nature.* 2009. V. 460. № 7259. P. 1149–1153.
37. Rajagopalan S., Long E.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 50. P. 20596–20601.
38. Munoz-Espin D., Canamero M., Maraver A., Acosta J.C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Gomez-Lopez G., Contreras J., Murillo-Cuesta S., Rodriguez-Baeza A., Varela-Nieto I., Ruberte J., Collado M., et al. // *Cell.* 2013. V. 155. P. 1104–1118.
39. Storer M., Mas A., Robert-Moreno A., Pecoraro M., Ortells M.C., Di Giacomo V., Yosef R., Pilpel N., Krizhanovsky V., Sharpe J., Keyes W.M. // *Cell.* 2013. V. 155. № 5. P. 1119–1130.
40. Campisi J., d'Adda di Fagagna F. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. P. 729–740.
41. Rosler E.S., Fisk G.J., Ares X., Irving J., Miura T., Rao M.S., Carpenter M.K. // *Dev. Dyn.* 2004. V. 229. P. 259–274.
42. Miura T., Mattson M.P., Rao M.S. // *Aging Cell.* 2004. V. 3. P. 333–343.
43. Dumitru R., Gama V., Fagan B.M., Bower J.J., Swahari V., Pevny L.H., Deshmukh M. // *Mol. Cell.* 2012. V. 46. P. 573–583.
44. Cooper G.M. *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2000. 689 p.
45. Buttitta L.A., Edgar B.A. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007. V. 19. № 6. P. 697–704.
46. Jeyapalan J.C., Ferreira M., Sedivy J.M., Herbig U. // *Mech. Ageing Dev.* 2007. V. 128. P. 36–44.
47. Bertram C., Hass R. // *Mech. Ageing Dev.* 2009. V. 130. № 10. P. 657–669.
48. Papadopoulou A., Kletsas D. // *Int. J. Oncol.* 2011. V. 39. № 4. P. 989–999.
49. Georgakopoulou E., Evangelou K., Havaki S., Townsend P., Kanavaros P., Gorgoulis V.G. // *Mech. Ageing Dev.* 2016. V. 156. P. 17–24.
50. Guillot C., Lecuit T. // *Science.* 2013. V. 340. P. 1185–1189.
51. da Silva Meirelles L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. № 11. P. 2204–2213.
52. Zimmermann S., Voss M., Kaiser S., Kapp U., Waller C.F., Martens U.M. // *Leukemia.* 2003. V. 17. P. 1146–1149.
53. Banfi A., Bianchi G., Notaro R., Luzzatto L., Cancedda R., Quarto R. // *Tissue Eng.* 2002. V. 8. P. 901–910.
54. Cmielova J., Havelek R., Soukup T., Jiroutova A., Visek B., Suchanek J., Vavrova J., Mokry J., Muthna D., Bruckova L., et al. // *Int. J. Radiat. Biol.* 2012. V. 88. P. 393–404.
55. Larsen S.A., Kassem M., Rattan S.I. // *Chem. Cent. J.* 2012. V. 6. P. 18.
56. Burova E.B., Borodkina A.V., Shatrova A.N., Nikolsky N.N. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013. V. 2013. № 474931.
57. Turinetto V., Vitale E., Giachino C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 7. P. E1164.
58. Wehrwein P. // *Nature.* 2012. V. 492. P. 12–13.

59. Bell D.R., van Zant G. // *Oncogene*. 2004. V. 23. № 43. P. 7290–7296.
60. Roninson I.B. // *Cancer Res*. 2003. V. 63. № 11. P. 2705–2715.
61. Mehta I.S., Figgitt M., Clements C.S., Kill I.R., Bridger J.M. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1100. P. 250–263.
62. Righolt C.H., van't Hoff M.L., Vermolen B.J., Young I.T., Raz V. // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. № 12. P. 1192–1201.
63. Freund A., Laberge R.M., Demaria M., Campisi J. // *Mol. Biol. Cell*. 2012. V. 23. № 11. P. 2066–2075.
64. Shah P.P., Donahue G., Otte G.L., Capell B.C., Nelson D.M., Cao K., Aggarwala V., Cruickshanks H.A., Rai T.S., McBryan T., et al. // *Genes Dev*. 2013. V. 27. № 16. P. 1787–1799.
65. Kwak I.H., Kim H.S., Choi O.R., Ryu M.S., Lim I.K. // *Cancer Res*. 2004. V. 64. № 2. P. 572–580.
66. d'Adda di Fagnana F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2008. V. 8. № 7. P. 512–522.
67. Borodkina A.V., Shatrova A.N., Abushik P.A., Nikolsky N.N., Burova E.B. // *Aging (Albany NY)*. 2014. V. 6. № 6. P. 481–495.
68. Rodier F., Muñoz D.P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J.P., Campeau E., Beauséjour C.M., Kim S.H., et al. // *J. Cell Sci*. 2011. V. 124. P. 68–81.
69. Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., Sedivy J.M. // *Science*. 2006. V. 311. № 5765. P. 1257.
70. Galluzzi L., Vitale I., Kepp O., Kroemer G. *Cell senescence. Methods and protocols*. N.Y.: Springer Science+Business Media, LLC, 2013. 538 p.
71. Abdelmohsen K., Gorospe M. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. 2015. V. 6. № 6. P. 615–629.
72. Yang J., Dungrawala H., Hua H., Manukyan A., Abraham L., Lane W., Mead H., Wright J., Schneider B.L. // *Cell Cycle*. 2011. V. 10. № 1. P. 144–155.
73. Chondrogianni N., Stratford F.L., Trougakos I.P., Friguet B., Rivett A.J., Gonos E.S. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. № 30. P. 28026–28037.
74. Matjusaitis M., Chin G., Sarnoski E.A., Stolzing A. // *Ageing Res. Rev*. 2016. V. 29. P. 1–12.
75. Correia-Melo C., Passos J.F. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. V. 1847. № 11. P. 1373–1379.
76. Passos J.F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C.J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., et al. // *Mol. Syst. Biol*. 2010. V. 6. № 347. P. 1–14.
77. Georgakopoulou E.A., Tsimaratou K., Evangelou K., Fernandez Marcos P.J., Zoumpourlis V., Trougakos I.P., Kletsas D., Bartek J., Serrano M., Gorgoulis V.G. // *Aging (Albany NY)*. 2013. V. 5. № 1. P. 37–50.
78. Coppe J.P., Desprez P.Y., Krtolica A., Campisi J. // *Annu. Rev. Pathol.* 2010. V. 5. P. 99–118.
79. Parrinello S., Coppe J.P., Krtolica A., Campisi J. // *J. Cell Sci*. 2005. V. 118. P. 485–496.
80. Acosta J.C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J.P., Athineos D., Kang T.W., Lasitschka F., Andrulis M., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2013. V. 15. № 8. P. 978–990.
81. Byun H.O., Lee Y.K., Kim J.M., Yoon G. // *BMB Rep*. 2015. V. 48. № 10. P. 549–558.
82. Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L.C., Douma S., van Doorn R., Desmet C.J., Aarden L.A., Mooi W.J., Peeper D.S. // *Cell*. 2008. V. 133. № 6. P. 1019–1031.
83. Acosta J.C., O'Loughlin A., Banito A., Guijarro M.V., Augert A., Raguz S., Fumagalli M., Da Costa M., Brown C., Popov N., et al. // *Cell*. 2008. V. 133. P. 1006–1018.
84. Hornebeck W., Maquart F.X. // *Biomed. Pharmacother*. 2003. V. 57. P. 223–230.
85. Finkel T., Serrano M., Blasco M.A. // *Nature*. 2007. V. 448. № 7155. P. 767–774.
86. Brew K., Dinakarpanid D., Nagase H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1477. P. 267–283.
87. Parfyonova Y.V., Plekhanova O.S., Tkachuk V.A. // *Biochemistry (Mosc)*. 2002. V. 67. № 1. P. 119–134.
88. Hwa V., Oh Y., Rosenfeld R.G. // *Endocr. Rev*. 1999. V. 20. № 6. P. 761–787.
89. Urbanelli L., Buratta S., Sagini K., Tancini B., Emiliani C. // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. № 9. P. E1408.
90. Pearson M., Carbone R., Sebastiani C., Cioce M., Fagioli M., Saito S., Higashimoto Y., Appella E., Minucci S., Pandolfi P.P., et al. // *Nature*. 2000. V. 406. № 6792. P. 207–210.
91. Acosta J.C., Snijders A.P., Gil J. // *Methods Mol. Biol*. 2013. V. 965. P. 175–184.
92. Rodier F., Muñoz D.P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J.P., Campeau E., Beauséjour C.M., Kim S.H., et al. // *J. Cell Sci*. 2011. V. 124. P. 68–81.
93. Freund A., Laberge R.M., Demaria M., Campisi J. // *Mol. Biol. Cell*. 2012. V. 23. № 11. P. 2066–2075.
94. Coppé J.P., Patil C.K., Rodier F., Krtolica A., Beauséjour C.M., Parrinello S., Hodgson J.G., Chin K., Desprez P.Y., Campisi J. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 2. P. e9188.
95. Elzi D.J., Song M., Hakala K., Weintraub S.T., Shiio Y. // *Mol. Cell Biol*. 2012. V. 32. № 21. P. 4388–4399.
96. Severino V., Alessio N., Farina A., Sandomenico A., Cipollaro M., Peluso G., Galderisi U., Chambery A. // *Cell Death Dis*. 2013. V. 4. P. e911.
97. Pasillas M.P., Shields S., Reilly R., Strnad J., Behl C., Park R., Yates J.R., Klemke R., Gonias S.L., Coppinger J.A. // *Mol. Cell Proteomics*. 2015. V. 14. № 1. P. 1–14.
98. Özcan S., Alessio N., Acar M.B., Mert E., Omerli F., Peluso G., Galderisi U. // *Aging (Albany NY)*. 2016. V. 8. № 7. P. 1316–1329.
99. Baker D.J., Sedivy J.M. // *J. Cell Biol*. 2013. V. 202. P. 11–13.
100. Chien Y., Scuoppo C., Wang X., Fang X., Balgley B., Bolden J.E., Prensirur P., Luo W., Chicas A., Lee C.S., et al. // *Genes Dev*. 2011. V. 25. P. 2125–2136.
101. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C., Imbert V., Hofman V., Zangari J., Bille K., Robert C., Bressac-de Paillerets B., Hofman P., et al. // *Genes Dev*. 2011. V. 25. P. 1245–1261.
102. Rovillain E., Mansfield L., Caetano C., Alvarez-Fernandez M., Caballero O.L., Medema R.H., Hummerich H., Jat P.S. // *Oncogene*. 2011. V. 30. P. 2356–2366.
103. Orjalo A.V., Bhaumik D., Gengler B.K., Scott G.K., Campisi J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 4. P. 17031–17036.
104. Rodier F., Coppe J.P., Patil C.K., Hoeijmakers W.A., Munoz D.P., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J. // *Nat. Cell Biol*. 2009. V. 11. P. 973–979.
105. Rodier F., Munoz D.P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppe J.P., Campeau E., Beauséjour C.M., Kim S.H., et al. // *J. Cell Sci*. 2011. V. 124. P. 68–81.
106. Pazolli E., Alspach E., Milczarek A., Prior J., Piwnica-Worms D., Stewart S.A. // *Cancer Res*. 2012. V. 72. P. 2251–2261.
107. Miyamoto S. // *Cell Res*. 2011. V. 21. P. 116–130.
108. Kang C., Xu Q., Martin T.D., Li M.Z., Demaria M., Aron L., Lu T., Yankner B.A., Campisi J., Elledge S.J. // *Science*. 2015. V. 349. № 6255. P. aaa5612.
109. Bulavin D.V., Phillips C., Nannenga B., Timofeev O., Donehower L.A., Anderson C.W., Appella E., Fornace A.J. Jr. // *Nat. Genet*. 2004. V. 36. P. 343–350.
110. Freund A., Patil C.K., Campisi J. // *EMBO J*. 2011. V. 30. P. 1536–1548.
111. Alspach E., Flanagan K.C., Luo X., Ruhland M.K., Huang H., Pazolli E., Donlin M.J., Marsh T., Piwnica-Worms D., Monahan J., et al. // *Cancer Discov*. 2014. V. 4. P. 716–729.

112. Vermeulen L., De Wilde G., van Damme P., Vanden Berghe W., Haegeman G. // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 1313–1324.
113. Kefaloyianni E., Gaitanaki C., Beis I. // *Cell. Signal.* 2006. V. 18. P. 2238–2251.
114. Herranz N., Gallage S., Mellone M., Wuestefeld T., Klotz S., Hanley C.J., Raguz S., Acosta J.C., Innes A.J., Banito A., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. P. 1205–1217.
115. Laberge R.M., Sun Y., Orjalo A.V., Patil C.K., Freund A., Zhou L., Curran S.C., Davalos A.R., Wilson-Edell K.A., Liu S., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. P. 1049–1061.
116. Narita M., Young A.R., Arakawa S., Samarajiwa S.A., Nakashima T., Yoshida S., Hong S., Berry L.S., Reichelt S., Ferreira M., et al. // *Science.* 2011. V. 332. № 6032. P. 966–970.
117. Hubackova S., Krejcikova K., Bartek J., Hodny Z. // *Aging (Albany NY).* 2012. V. 4. P. 932–951.
118. Munoz-Espin D., Serrano M. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2014. V. 15. P. 482–496.
119. Baker D.J., Wijshake T., Tchkonja T., LeBrasseur N.K., Childs B.G., van de Sluis B., Kirkland J.L., van Deursen J.M. // *Nature.* 2011. V. 479. P. 232–236.
120. Nanni S., Melandri G., Hanemaaijer R., Cervi V., Tomasi L., Altimari A., van Lent N., Tricoci P., Bacchi L., Branzi A. // *Transl. Res.* 2007. V. 149. P. 137–144.
121. Price J.S., Waters J.G., Darrah C., Pennington C., Edwards D.R., Donell S.T., Clark I.M. // *Aging Cell.* 2002. V. 1. P. 57–65.
122. Minamino T., Yoshida T., Tateno K., Miyauchi H., Zou Y., Toko H., Komuro I. // *Circulation.* 2003. V. 108. P. 2264–2269.
123. Effros R.B. // *Exp. Gerontol.* 2004. V. 39. P. 517–524.
124. Franckhauser S., Elias I., Rotter Sopasakis V., Ferré T., Nagaev I., Andersson C.X., Agudo J., Ruberte J., Bosch F., Smith U. // *Diabetologia.* 2008. V. 51. № 7. P. 1306–1316.
125. Steiner M.K., Syrkina O.L., Kolliputi N., Mark E.J., Hales C.A., Waxman A.B. // *Circ. Res.* 2009. V. 104. № 2. P. 236–244.
126. Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.Y., Campisi J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 12072–12077.
127. Sun Y., Nelson P.S. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 4019–4025.
128. Pietras E.M., Mirantes-Barbeito C., Fong S., Loeffler D., Kovtonyuk L.V., Zhang S., Lakshminarasimhan R., Chin C.P., Techner J.M., Will B., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. P. 607–618.
129. Brady J.J., Li M., Suthram S., Jiang H., Wong W.H., Blau H.M., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. P. 1244–1252.
130. Cahu J., Bustany S., Sola B. // *Cell Death Dis.* 2012. V. 3. P. e446.
131. Chang T.S., Wu Y.C., Chi C.C., Su W.C., Chang P.J., Lee K.F., Tung T.H., Wang J., Liu J.J., Tung S.Y., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. P. 201–210.

УДК 577.21

TAL1: его роль в гемопоэзе и в злокачественном перерождении клеток крови

Э. Р. Вагапова*, П. В. Спирин, Т. Д. Лебедев, В. С. Прасолов

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

E-mail: elmira-mi@mail.ru

Поступила в редакцию 22.09.2017

Принята к печати 29.01.2018

РЕФЕРАТ TAL1 (SCL/TAL1, T-cell acute leukemia protein 1) – транскрипционный фактор и один из основных участников гемопоэза. TAL1 участвует в процессах дифференцировки клеток крови из мезодермы на ранних стадиях эмбриогенеза и регулирует гемопоэз в зрелом организме. TAL1 необходим для сохранения мультипотентности гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и удержания их в фазе покоя G0. TAL1 формирует комплексы с различными транскрипционными факторами-участниками гемопоэза (E2A/HEB, GATA1-3, LMO1-2, Ldb1, ETO2, RUNX1, ERG, FLI1). В составе таких комплексов TAL1 участвует в нормальной дифференцировке кроветворных клеток миелоидного ряда, контролирует пролиферацию эритроидных предшественников, а также определяет выбор направления дифференцировки ГСК. SCL-комплекс, основными компонентами которого являются TAL1, E2A, GATA1 (или GATA2), LMO2 и Ldb1, может участвовать в злокачественном перерождении клеток крови. Одна из ключевых ролей SCL-комплекса в канцерогенезе – позитивная регуляция экспрессии рецепторной тирозинкиназы C-KIT. В настоящее время TAL1 и его партнеры рассматриваются в качестве перспективной терапевтической мишени при острых лимфобластных лейкозах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемопоэз, острый миелоидный лейкоз, рецепторная тирозинкиназа C-KIT, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка; ОМП – общий миелоидный предшественник; ОЛП – общий лимфоидный предшественник; Т-ОЛЛ – Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз; ТФ – транскрипционный фактор; ЭСК – эмбриональная стволовая клетка.

ВВЕДЕНИЕ

Процесс гемопоэза включает несколько этапов, в том числе образование ранних кроветворных клеток-предшественников из мезодермы, формирование гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их дальнейшую дифференцировку в зрелые клетки крови. Нарушение регуляции этих процессов в гемопоэтических клетках-предшественниках часто приводит к нарушению их нормальной дифференцировки и пролиферации и, как следствие, к злокачественной трансформации. Один из основных регуляторов гемопоэза – транскрипционный фактор TAL1 – имеет домен спираль-петля-спираль, он связывается с ДНК в регуляторных участках, взаимодействуя с последовательностью E-бокса (CANNTG, где N – любой нуклеотид), и в участках связывания факторов GATA, Ets, Runx [1]. Показано, что подавление экспрессии гена *TAL1* приводит к полному отсутствию гемопоэза в желточном мешке [2]. Во взрослом организме

наиболее высокий уровень экспрессии *TAL1* характерен для плюрипотентных ГСК, мультипотентных миелоидных и лимфоидных предшественников, а также для клеток эритроидного и мегакариоцитарного ряда [3]. TAL1 участвует в формировании комплексов с различными транскрипционными факторами (E47/E2A, LMO2, GATA1-3, LMO1/2, Ldb1, ETO2, Runx1, ERG, FLI1) [4, 5]. Состав комплекса может быть разным. От состава комплекса зависит, с какими внутриклеточными мишенями он будет взаимодействовать, оказывая активирующее или ингибирующее действие на экспрессию факторов, ассоциированных с дифференцировкой клеток миелоидного и лимфоидного ряда [6–8]. Нарушение уровня экспрессии или мутации генов, продукты трансляции которых входят в состав SCL-комплекса, может приводить к злокачественному перерождению клеток крови. Около 60% случаев Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов (Т-ОЛЛ) характе-

ризируются аномально высоким уровнем экспрессии *TAL1* [9]. Мутантные формы *TAL1* в клетках миелоидных и лимфоидных лейкозов обнаруживают у 20% пациентов [10]. Одной из основных мишеней *TAL1* в злокачественных клетках крови считается промоторный участок гена *C-KIT*, кодирующего рецепторную тирозинкиназу. В ряде случаев показано, что прогрессия злокачественных заболеваний крови (в том числе острых миелоидных лейкозов) сопровождается аномально повышенной экспрессией *C-KIT* [11, 12].

TAL1: СТРУКТУРА ГЕНА, ИЗВЕСТНЫЕ ИЗОФОРМЫ БЕЛКА И ИХ ФУНКЦИИ В ГЕМОПЭЗЕ

Локус гена *TAL1* находится на хромосоме 1 человека. *TAL1* относится к семейству транскрипционных факторов с мотивом спираль-петля-спираль (bHLH). Ген *TAL1* содержит шесть экзонов, из которых кодирующими являются экзоны 4–6. Согласно базе данных PubMed на 2017 год, в настоящий момент описано шесть вариантов транскриптов гена *TAL1* (рис. 1). Известны две изоформы белка *TAL1*: длинная (*TAL1*-д) с молекулярной массой 34.3 кДа, состоящая из 331 аминокислотного остатка, и короткая (*TAL1*-к), состоящая из 156 аминокислотных остатков. Соотношение между *TAL1*-д и *TAL1*-к различно в клетках мегакариотического и эритроидного ряда [13]. Пре-мРНК *TAL1* подвергается альтернативному сплайсингу, в результате которого может образоваться мРНК, не содержащая экзоны 1–4. В белке *TAL1*-к – продукте трансляции такой мРНК – отсутствует ETO2-связывающий домен, а также сайты фосфорилирования, тогда как ДНК-связывающие домены и домен спираль-петля-спираль сохраняются. Кроме того, третий экзон *TAL1* содержит высококонсервативную последовательность uORF – короткую открытую рамку считывания, которая выступает в роли *цис*-регуляторного элемента при образовании изоформ *TAL1*. Наличие uORF делает возможной инициацию трансляции при участии факторов eIF2 и eIF4E с альтернативных сайтов, находящихся в экзонах 4–5 [14], что приводит к образованию укороченной формы белка *TAL1*.

Укороченная форма *TAL1*-к необходима для дифференцировки по эритроидному пути, тогда как полноразмерный белок *TAL1*-д необходим для мегакариотической дифференцировки клеток-предшественников. Показано, что обработка линий клеток эритроидного лейкоза человека TF1 и HEL индукторами эритроидной дифференцировки (ДМСО и эритропоэтином) приводит к образованию не только основной (полноразмерной) формы белка *TAL1*-д, но и укороченной формы *TAL1*-к [15]. Установлено, что некоторые противоопухолевые препараты, дей-



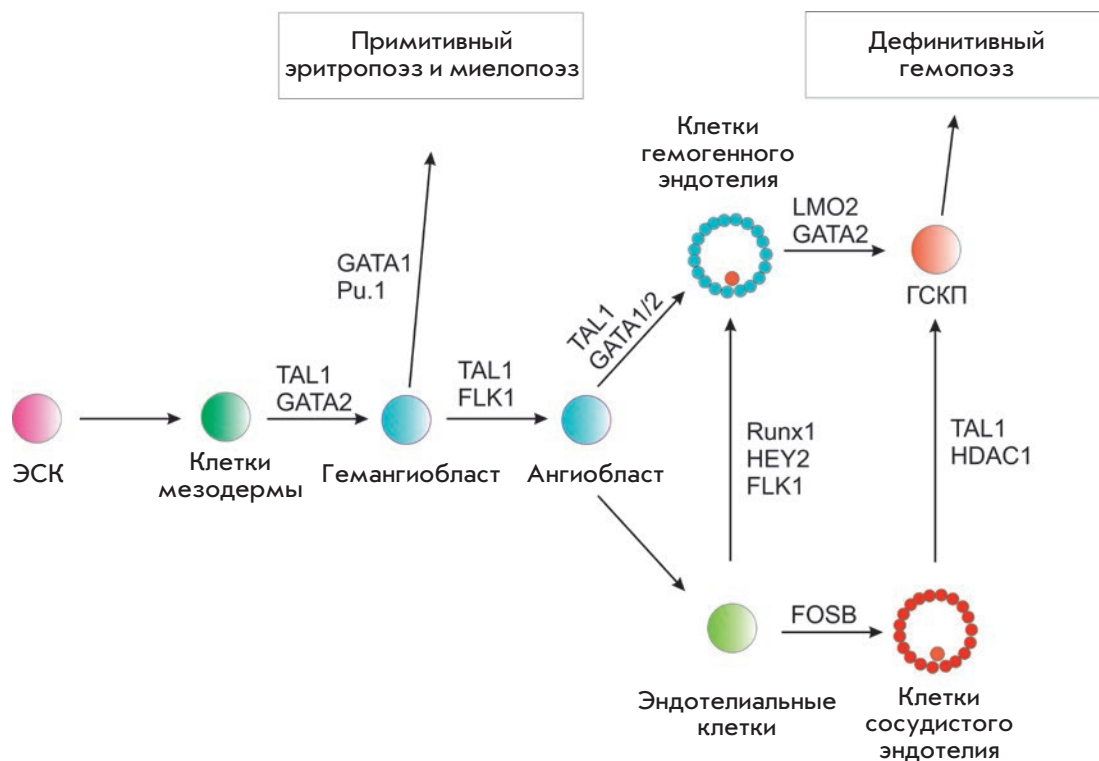
Рис. 1. Структура гена *TAL1* и его транскриптов. А – ген *TAL1*, экзоны I–VI. Б – один из транскриптов *TAL1*, в ходе трансляции с которого может образоваться как полноразмерный белок *TAL1*-д, так и укороченный *TAL1*-к. UTR – нетранслируемый участок мРНК. uORF – короткая открытая рамка считывания. bHLH – область, кодирующая домен спираль-петля-спираль. В – транскрипт *TAL1*, с которого транслируется укороченная форма белка *TAL1*-к

ствующие на компоненты сигнальных путей, связанных с регуляцией инициации трансляции, могут влиять на соотношение *TAL1*-д и *TAL1*-к. В частности, рапамицин (Rap, ингибитор mTOR) блокирует образование укороченных форм, а 2-аминопурины (2AP, ингибитор eIF2 α -киназы) – полноразмерных форм [14].

ФУНКЦИИ TAL1 В ЭМБРИОГЕНЕЗЕ

Транскрипционный фактор *TAL1* необходим для нормального эмбриогенеза. Его экспрессия начинается на 7-й день после оплодотворения за сутки до начала образования компонентов кровеносной системы. Экспрессия *TAL1* обнаружена в клетках островков кроветворения желточного мешка, эндотелиоцитах и ангиобластах, а позднее в печени и селезенке плода – основных кроветворных органов в эмбриогенезе. Показано, что клетки, участвующие в образовании скелетной и нервной ткани, также экспрессируют *TAL1* [16]. В желточном мешке и зародышевой печени основными мишенями *TAL1* являются промотор гена *Runx1* и энхансер гена *Runx3* [17]. В регуляторных областях этих генов обнаружены участки связывания факторов Ets, GATA и Runx, а также последовательность E-бокса. *TAL1* и его партнеры GATA1, GATA2, E47, Ldb1, LMO2 могут образовывать комплексы на этих участках ДНК [18]. Гемопоэтические клетки-предшественники также могут происходить из клеток гемогенного эндотелия при участии транскрипционного фактора *Runx1*. Для образования клеток гемогенного эндотелия из мезодермы необходим *TAL1* [19]. На более поздних стадиях эмбрионального развития *TAL1* регулирует дифференцировку предшественников

Рис. 2. Процесс образования гемопоэтических клеток в ходе эмбрионального развития. Над стрелками указаны некоторые транскрипционные факторы, определяющие ход дифференцировки клеток. ЭСК – эмбриональная стволовая клетка, ГСКП – гемопоэтическая стволовая клетка-предшественник



клеток крови в эритроциты, мегакарициты и тромбоциты [20]. В ходе эмбриогенеза клетки, формирующие кровеносные сосуды, также экспрессируют *TAL1* [16]. Отсутствие экспрессии *TAL1* приводит не только к нарушению кроветворения, но и к ранней гибели эмбрионов [2, 21]. На мышинной модели показано, что эмбриональные стволовые клетки (ЭСК), не экспрессирующие *TAL1*, не дифференцируются в кроветворные клетки под действием факторов гемопоэтической дифференцировки [21]. Эктопическая экспрессия *TAL1* в ЭСК приводит к индукции формирования гемопоэтических клеток. В экспериментах *in vitro* показано, что ЭСК, не экспрессирующие *TAL1*, с низкой эффективностью дифференцируются в клетки эритроидных предшественников и не способны образовывать колонии лимфоидных и миелоидных клеток-предшественников [22].

Таким образом, в эмбриональном развитии *TAL1* направляет дифференцировку кроветворных предшественников на всех трех этапах кроветворения. *TAL1* действует на предшественники клеток крови в желточном мешке (первый этап кроветворения), определяет развитие и дифференцировку гемангиобластов с момента их агрегации в первичной полоске до миграции в островки кроветворения желточного мешка (второй этап кроветворения). В начале третьего этапа кроветворения *TAL1* необходим для дифференцировки гемангиобластов в ГСК, он активизирует экспрессию генов, важных для созревания эритроид-

ных, мегакариотических и тучных клеток, а также участвует в ремоделировании сосудистой системы (рис. 2) [23].

РОЛЬ *TAL1* В РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОПОЭЗА

Зрелые клетки крови взрослого организма образуются из плюрипотентных ГСК. ГСК удерживаются в костном мозге на стадии репликационного покоя G0 за счет взаимодействия их поверхностных клеточных белков-рецепторов (С-KIT, MPL, CXCR4) и лигандов на поверхности стромальных клеток [24, 25]. В ответ на гемопоэтический стресс плюрипотентные ГСК выходят из фазы покоя, начиная активно пролиферировать, получают сигналы для дальнейшей дифференцировки и дают начало миелоидным и лимфоидным клеткам-предшественникам. Некоторые транскрипционные факторы, необходимые для осуществления процесса гемопоэза, также являются ключевыми для поддержания ГСК в фазе покоя. К ним относят *TAL1*, *E47*, *GATA2* и *Ldb1*, *LMO2* – компоненты SCL-комплекса [26]. Переход *KLS*⁺/*CD150*⁺ /*CD48*⁺ ГСК из фазы покоя G0 в стадию G1 осуществляется при участии циклинзависимой киназы *P21/CDKN1A*. *TAL1* блокирует этот переход, усиливая экспрессию ингибитора *P21/CDKN1A* [27]. Одновременно *TAL1* усиливает экспрессию транскрипционного фактора *ID1*. Важно отметить, что *TAL1* не относится к белкам, необходимым для выживания и самообновления ГСК [3]. Родственный ему белок *LYL1* обеспе-

чивает выживание ГСК в случае нокаута *TAL1* [28]. Интересно, что *TAL1* выполняет противоположные функции в ГСК пуповинной крови, где он, напротив, активирует переход G0–G1, который регулируется при участии сигнального пути mTOR [29]. Однако в процессах дифференцировки *TAL1* и *LYL1* не являются взаимозаменяемыми – оба белка необходимы для нормального эритропоэза и формирования В-клеток соответственно [30]. В отличие от ГСК, в миелоидных и лимфоидных предшественниках *TAL1* выполняет функцию активатора клеточного цикла, подавляя экспрессию ингибиторов циклинзависимых киназ p21 и p16/Ink4a [31, 32]. Гемопоэтические транскрипционные факторы *TAL1*, *GATA2*, *LMO2*, уровень экспрессии которых различен в клетках каждого типа, регулируют процесс дифференцировки и созревания клеток крови (рис. 3) [33]. Экспрессия

TAL1 неодинакова во всех гемопоэтических клетках. Высокие уровни экспрессии данного гена обнаружены в ГСК, в миелоидных предшественниках и в некоторых зрелых клетках миелоидного ряда (мегакариocyтах, эритроцитах, тучных клетках и базофилах). Низкие уровни *TAL1* характерны для лимфоидных предшественников, эозинофилов, макрофагов и нейтрофилов [34–36]. Зрелые Т- и В-клетки не экспрессируют *TAL1* [37]. Активацию некоторых генов, специфичных для эритроидных клеток, осуществляет комплекс, образованный *GATA1* и *TAL1* [38].

С помощью анализа ChIP-seq показано, что *TAL1* контролирует как общие для всех клеток процессы (регуляция клеточного цикла, пролиферация, апоптоз), так и характерные только для эритроидных клеток (окислительно-восстановительные процессы, биосинтез гема, организация цитоскелета), что кос-

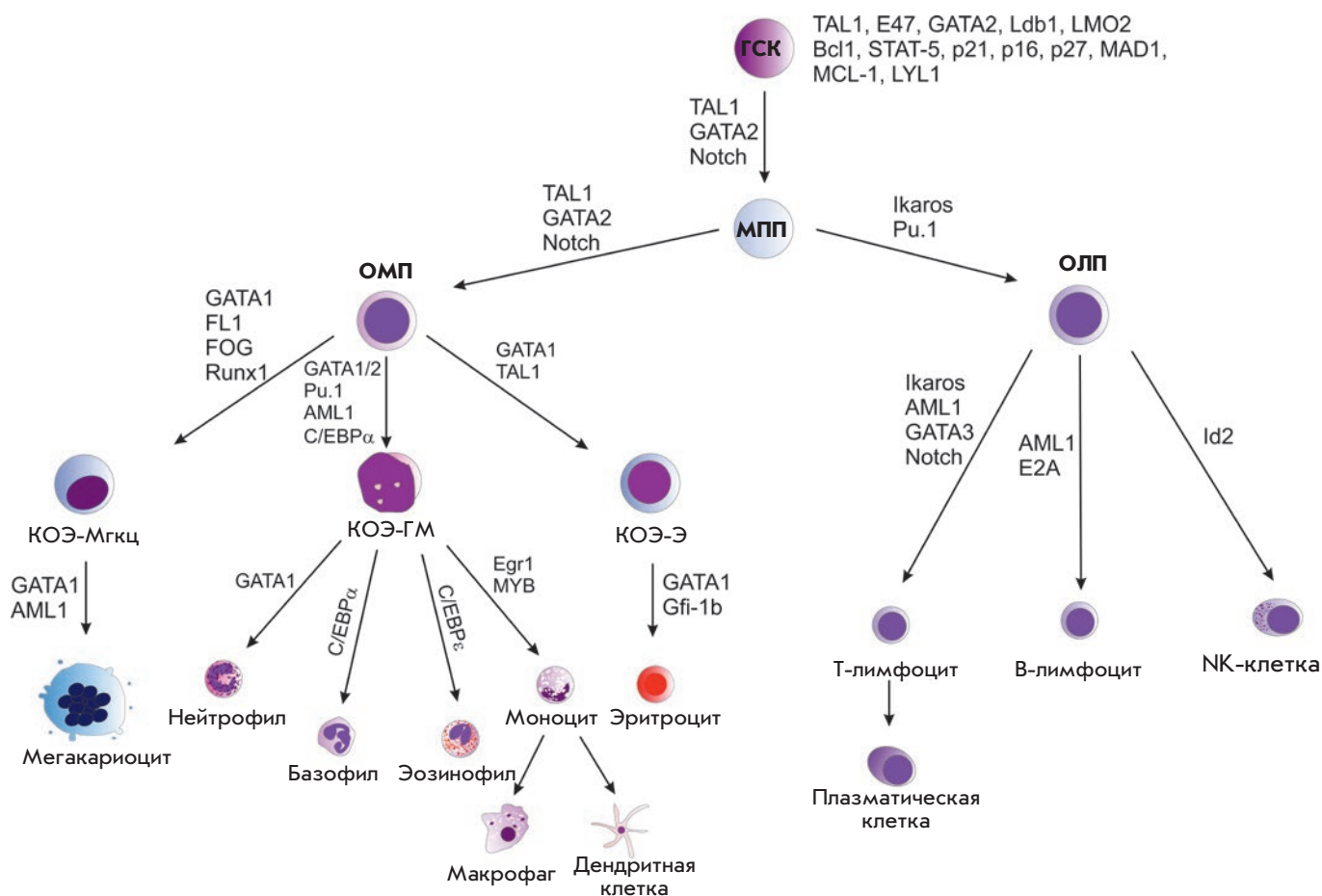


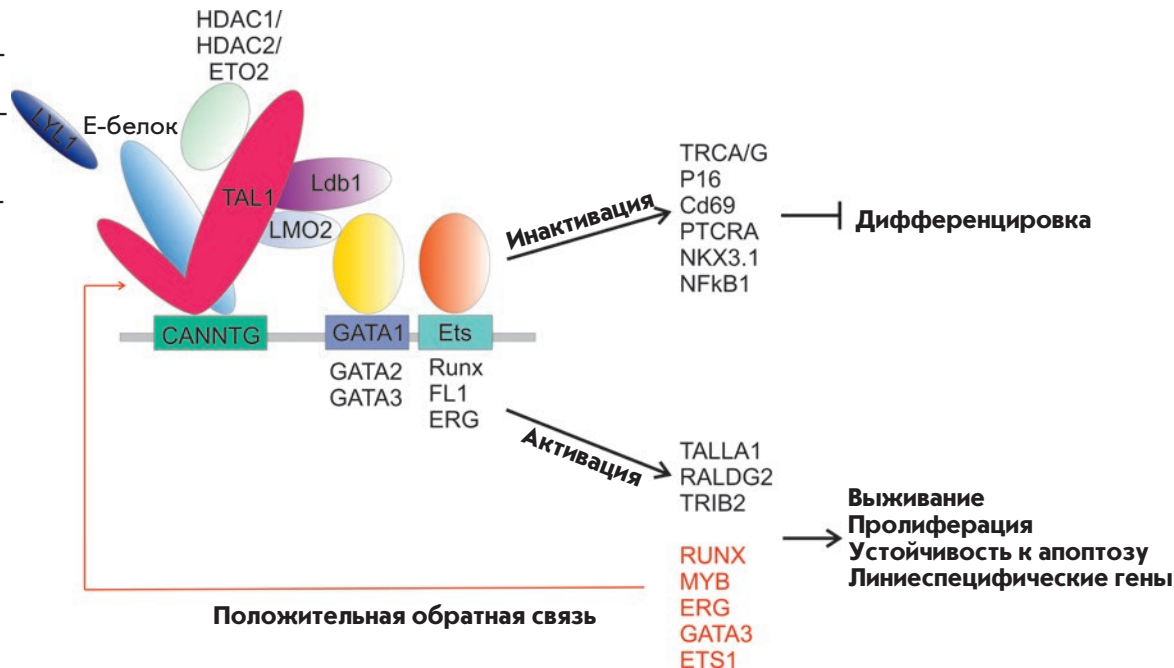
Рис. 3. Схема гемопоэза, на которой представлены некоторые транскрипционные факторы, регулирующие процессы дифференцировки и созревания клеток крови. ГСК – гемопоэтическая стволовая клетка, МПП – мультипотентный предшественник, ОМП – общий миелоидный предшественник, ОЛП – общий лимфоидный предшественник, КОЭ-Мгкц – колониеобразующая единица мегакариоцитов, КОЭ-Э – колониеобразующая единица эритроцитов, КОЭ-ГМ – колониеобразующая единица миелобластов и монобластов

венно указывает на его мультифункциональность [39]. В миелоидных и лимфоидных клетках-предшественниках мишенями TAL1 служат гены, контролирующие пролиферацию и апоптоз. К тому же, паттерн связывания TAL1 с генами-мишенями сильно меняется по мере созревания клеток. Динамические изменения экспрессии *TAL1* говорят о том, что фактор TAL1 проявляет различную активность в клетках при первоначальном выборе направления дифференцировки и образовании зрелых клеток крови. А его мультифункциональность связана непосредственно со способностью образовывать многокомпонентные комплексы в регуляторных областях генов-мишеней [8]. Получены данные, показывающие, что функция TAL1 в дифференцировке клеток эритроидного ряда реализуется, в том числе, при участии каспазы-3, индуцирующей расщепление этого белка. Показано, что ее активность, в конечном итоге, приводит к снижению экспрессии *GATA1* и *BCL-XL*, тем самым индуцируя апоптоз в этих клетках [40]. Некоторые аминокислотные остатки TAL1 могут подвергаться фосфорилированию. Например, в эритроцитах киназа Akt фосфорилирует Thr90 в TAL1. Эта модификация приводит к снижению способности TAL1 репрессировать промотор гена *EPB42*, продукт которого – белок 4.2, необходим для построения цитоскелета эритроцита [41]. Остаток Ser172 также может быть фосфорилирован cAMP-зависимой протеинкиназой (PKA), что влияет на связывание TAL1 с E-боксом в регуляторных участках различных генов [42].

SCL-КОМПЛЕКС: ЕГО КОМПОНЕНТЫ И МИШЕНИ В НОРМАЛЬНОМ ГЕМОПЭЗЕ

В гемопоэтических клетках основными партнерами TAL1 являются белки, участвующие в нормальном гемопоэзе: LMO2, Ldb1-2, Gata1-3, Lyl-1, E2A/HEB, Runx1, ETO2, ERG, FL1 (рис. 4). TAL1 напрямую связывается с LIM-доменом белка LMO2, который, в свою очередь, взаимодействует с Ldb1. LMO2 не имеет ДНК-связывающего домена и выступает в роли соединяющего фактора (bridge factor), который объединяет TAL1 в комплекс с другими транскрипционными факторами в гемопоэтических клетках [43, 44]. Также он может образовывать расширенный комплекс, связывая ETO2, RUNX1, ERG или FLI1 [45]. Для связывания TAL1 с последовательностями E-бокса (CANNTG) в регуляторных областях геномной ДНК необходимы E-белки (E12, E47), содержащие домены типа спираль-петля-спираль. TAL1 в составе комплекса выступает в роли регулятора активности некоторых сигнальных путей во время дифференцировки гемопоэтических клеток. Например, TAL1 необходим для выживания гемопоэтических предшественников, культивируемых в присутствии SCF, лиганда рецепторной тирозинкиназы C-KIT, которая выполняет важную функцию в гемопоэзе [46]. Основная роль SCL-комплекса в регуляции *C-KIT* связана с его способностью связываться с промотором данного гена. Также установлено, что компоненты SCL-комплекса могут связываться с различными компонентами сигнального пути C-KIT и приводить к изменению его активности [46–51].

Рис. 4. TAL1 и белки-партнеры в регуляции процессов дифференцировки, пролиферации и выживания гемопоэтических клеток



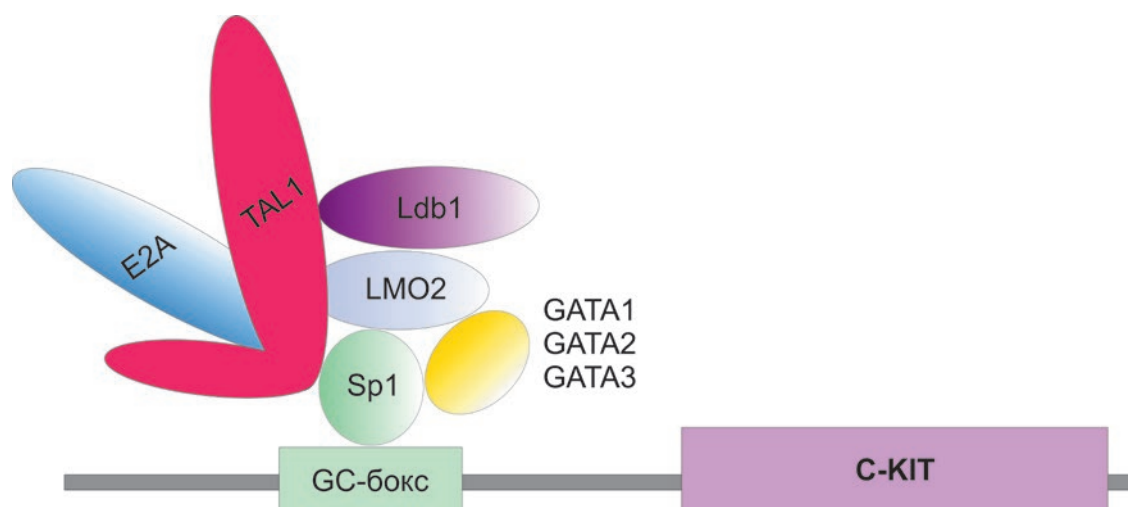


Рис. 5. Структура SCL-комплекса в промоторной области гена рецепторной тирозинкиназы C-KIT

Кроме того, существует прямая корреляция между уровнем экспрессии *TAL1* и фосфорилированными формами киназ MEK и ERK1/2, компонентов сигнального пути MEK/ERK [40]. В гемопоэтических клетках активность киназ MEK и ERK1/2 ассоциирована с дифференцировкой гемопоэтических клеток миелоидного, эритроидного и мегакариотического рядов [52]. Вероятно, участие *TAL1* в дифференцировке CD34⁺ гемопоэтических клеток реализуется через сигналы MEK/ERK [52, 53].

ФУНКЦИИ SCL-КОМПЛЕКСА И ЕГО ОТДЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

Как отмечалось выше, в норме уровень экспрессии *TAL1* в лимфоидных клетках значительно ниже, чем в миелоидных [37]. Повышенный уровень экспрессии *TAL1* в Т-клетках часто приводит к их злокачественному перерождению. Аномально высокая экспрессия *TAL1* может быть результатом хромосомных перестроек, делеций и мутаций, затрагивающих этот ген [54]. Хромосомная транслокация t(1;14)(p32;q11) обнаружена в 3% случаев Т-клеточного лейкоза. Хромосомная транслокация t(1;14)(p32;q11), приводящая к образованию слитого гена TRA/*TAL1*, обнаружена в 3% случаев Т-клеточного лейкоза. Делеция 90 т.п.н. между 5'-некодирующей областью гена *TAL1* и геном *SIL* приводит к образованию слитого гена *SIL-TAL1*, контролируемого промотором гена *SIL* [54]. Уровень экспрессии *SIL* в Т-клетках в норме очень высок, поэтому эта транслокация приводит к высокой экспрессии слитого гена *SIL-TAL1* [55]. Такая делеция обнаружена у 20–25% пациентов с Т-ОЛЛ [54, 56, 57]. Однако в большей части *TAL1*-позитивных случаев Т-клеточных лейкозов аномально высокая экспрессия *TAL1* реализуется не за счет хромосомных перестроек. Наряду с вы-

сокой экспрессией *TAL1* в большей части образцов первичного Т-ОЛЛ обнаружен значительный уровень экспрессии *TLX1* и *LMO2* [58]. Повышенная активность *TAL1* в Т-клетках приводит к увеличению времени нахождения лимфоидных клеток в виде незрелых тимоцитов. Предполагается, что это можно считать событием, инициирующим возникновение Т-клеточных лейкозов [59].

В клетках Т-ОЛЛ *TAL1* предпочтительно связывается с последовательностями CAGGTG Е-бокса. Несмотря на то что факторы GATA1–3 часто служат посредниками в связывании *TAL1* с регуляторными участками ДНК в клетках Т-клеточного лейкоза, существуют и альтернативные участки связывания, в частности Runx и Ets [59]. Показано, что транскрипционный фактор *TAL1* непосредственно активирует экспрессию *Runx1*, *Ets1* и *GATA3* в бластных клетках пациентов с Т-ОЛЛ [60]. Кроме того, факторы GATA3 и *Runx1* усиливают экспрессию гена *TAL1*, что может указывать на необходимость положительной обратной связи для возникновения аномальной экспрессии факторов, участвующих в злокачественном перерождении клеток крови. В 45% случаев *TAL1*-позитивных лейкозов обнаружены мутантные белки LMO1 и LMO2, образованные в результате хромосомных перестроек кодирующих их генов [61]. Экспрессия всех этих факторов приводит к тому, что двойные негативные (CD4-CD8-) прелейкозные тимоциты приобретают способность к делению. Кроме того, в этих клетках часто бывает активирован сигнальный путь Notch, компоненты которого участвуют в накоплении мутаций и нарушении процессов дифференцировки. Это приводит к возникновению и прогрессии Т-клеточного лейкоза [62]. При злокачественном перерождении *TAL1* нередко участвует в нарушении нормальной транскрипции

различных генов. При этом, как и при нормальном гемопоэзе, он образует комплексы с гемопоэтическими факторами LMO2, Ldb1, E12/E47, GATA1–3 [46, 47]. Установлено, что в клетках Т-ОЛЛ часто наблюдается сверхэкспрессия TAL1 и LMO2. В норме LMO2 и TAL1 независимо друг от друга регулируют транскрипцию собственных генов-мишеней, однако в клетках Т-ОЛЛ они кооперативно нарушают функцию фактора E2A, что способствует развитию лейкозов [63, 64]. Показано, что транскрипционный фактор FOXP3 может играть роль опухолевого супрессора при Т-клеточных лейкозах. Он связывается с LMO2 и уменьшает вероятность его взаимодействия с TAL1, что приводит к снижению транскрипционной активности комплекса TAL1/LMO2 [65].

Рецепторная тирозинкиназа C-KIT служит одной из основных мишеней TAL1 [48, 66]. Для гемопоэтических клеток-предшественников характерен высокий уровень экспрессии *TAL1* и *C-KIT*. Показано, что эктопическая экспрессия *TAL1* приводит к индукции экспрессии *C-KIT* в В-лимфоцитах, в которых в норме эти гены не экспрессируются [66]. При некоторых злокачественных заболеваниях крови, в том числе при остром миелоидном лейкозе и хроническом миелоидном лейкозе, наблюдается аномально высокая экспрессия *C-KIT*. Комплекс SCL действует как специфический активатор промотора гена рецепторной тирозинкиназы *C-KIT* (рис. 5). Для проявления его максимальной активности необходимы все компоненты комплекса (TAL1, LMO2, Ldb1, GATA2, E47). На модели эмбриональных фибробластов мыши показано, что транскрипционные факторы E47 и GATA по отдельности не влияют на активность промотора гена *C-KIT*, несмотря на то, что они активируют транскрипцию многих генов в гемопоэтических клетках человека [66]. В этой же мышечной системе показано, что активация промотора происходит только при формировании многокомпонентного комплекса, основным компонентом которого является TAL1. GATA1 и GATA2 взаимозаменяемы, однако комплекс, содержащий GATA1, обладает меньшей транскрипционной активностью. Для формирования активного SCL-комплекса необходим также белок Sp1, содержащий цинковые пальцы и связывающий GC-богатые последовательности. Показано, что удаление E-бокса и GATA из промоторной области *C-KIT* не снижает активирующую активность SCL-комплекса. Возможно, Sp1 участвует также в привлечении компонентов комплекса к некоторым генам-мишеням.

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ TAL1

Большое количество данных об участии TAL1 в развитии Т-клеточных лейкозов указывает на воз-

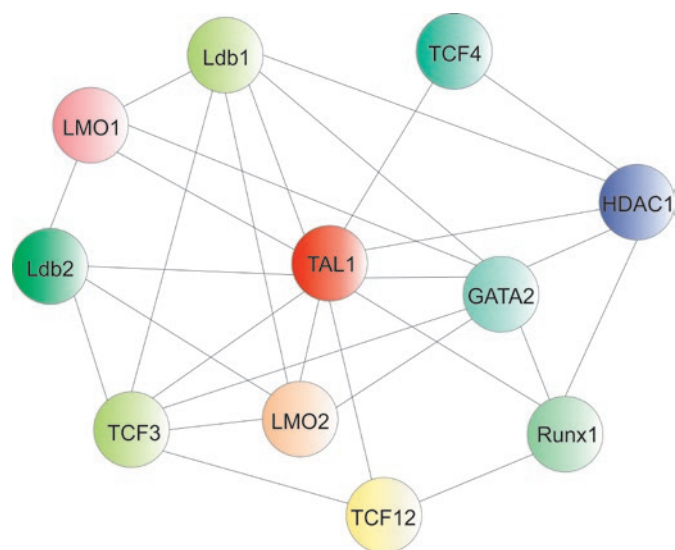


Рис 6. Схема возможных партнеров TAL1 и взаимодействий между ними в нормальных и злокачественных гемопоэтических клетках

можность использования ингибиторов этого белка, а также ингибиторов сигнальных каскадов, ассоциированных с ним, в качестве перспективных терапевтических средств борьбы с лейкозами, для которых характерна аномальная активность TAL1. В настоящее время во многих лабораториях активно разрабатываются и синтезируются новые низкомолекулярные ингибиторы TAL1. Однако до сих пор не получен достаточно мощный и специфичный ингибитор данного белка. Для транскрипционной активности TAL1 необходимо его фосфорилирование киназами MEK/ERK. Обсуждается перспектива использования ингибиторов компонентов сигнального пути MAPK/MEK/ERK в качестве возможных терапевтических мишеней [67]. В то же время получены данные, свидетельствующие о том, что обработка клеточной культуры мезенхимальных стромальных клеток (компонентов стромы костного мозга) ингибиторами MEK приводит к секреции ими провоспалительного цитокина интерлейкина-18 [68]. Это способствует улучшению выживаемости бластных клеток Т-ОЛЛ. В качестве перспективных мишеней для терапии TAL1-ассоциированных Т-клеточных лейкозов рассматривают потенциальные белковые мишени TAL1, связанные с реализацией его транскрипционной активности (рис. 6). К числу таких белков относится деметилаза UTX (также называемая KDM6A). Показано, что обработка TAL1-позитивных бластных клеток Т-ОЛЛ ингибитором UTX приводит к снижению скорости их пролиферации и к стимуляции апоптоза [69]. Установлено, что использование

ингибиторов гистоновых деацетилаз HDAC приводит к снижению экспрессии *TAL1* и к индукции апоптоза бластных клеток Т-клеточных лейкозов [70]. В настоящее время активно изучают стехиометрию SCL-комплекса. Ожидается, что результаты этих исследований откроют новые возможности для поиска высокоэффективных терапевтических агентов, направленных на *TAL1*-позитивные лейкозы, которые действуют путем нарушения белок-белковых вза-

имодействий между компонентами SCL-комплекса и не влияют на жизнеспособность нормальных гемопоэтических клеток [41]. ●

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы (тема № 01201363823) за счет средств Российского научного фонда (проект № 14-50-00060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hoang T, Lambert J.A., Martin R. // *Curr. Top. Dev. Biol.* 2016. V. 118. P. 163–204.
- Robb L., Lyons I., Li R., Hartley L., Kontgen F., Harvey R.P., Metcalf D., Begley C.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. № 15. P. 7075–7079.
- Mikkola H.K., Klintman J., Yang H., Hock H., Schlaeger T.M., Fujiwara Y., Orkin S.H. // *Nature.* 2003. V. 421. № 6922. P. 547–551.
- Lécuyer E., Hoang T. // *Exp. Hematol.* 2004. V. 32. № 1. P. 11–24.
- Goardon N., Lambert J.A., Rodriguez P., Nissaire P., Herblot S., Thibault P., Dumenil D., Strouboulis J., Romeo P.H., Hoang T. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 2. P. 357–366.
- Anderson K.P., Crable S.C., Lingrel J.B. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 23. P. 14347–14354.
- Org T., Duan D., Ferrari R., Montel-Hagen A., van Handel B., Kerenyi M.A., Sasidharan R., Rubbi L., Fujiwara Y., Pellegrini M., et al. // *EMBO J.* 2015. V. 34. № 6. P. 759–777.
- Wu W., Morrissey C.S., Keller C.A., Mishra T., Pimkin M., Blobel G.A., Weiss M.J., Hardison R.C. // *Genome Res.* 2014. V. 24. № 12. P. 1945–1962.
- Ferrando A.A., Neuberg D.S., Staunton J., Loh M.L., Huard C., Raimondi S.C., Behm F.G., Pui C.H., Downing J.R., Gilliland D.G., et al. // *Cancer Cell.* 2002. V. 1. № 1. P. 75–87.
- Begley C.G., Aplan P.D., Davey M.P., Nakahara K., Tchorz K., Kurtzberg J., Hershfield M.S., Haynes B.F., Cohen D.I., Waldmann T.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 6. P. 2031–2035.
- Spirin P.V., Lebedev T.D., Orlova N.N., Gornostaeva A.S., Prokofjeva M.M., Nikitenko N.A., Dmitriev S.E., Buzdin A.A., Borisov N.M., Aliper A.M., et al. // *Leukemia.* 2014. V. 28. № 11. P. 2222–2228.
- Orlova N.N., Lebedev T.D., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Molec. Biol.* 2016. V. 50. № 3. P. 344–352.
- Jin S., Su H., Tran N.T., Song J., Lu S.S., Li Y., Huang S., Abdel-Wahab O., Liu Y., Zhao X. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 5. P. e0175523.
- Calkhoven C.F., Muller C., Martin R., Kros G., Pietsch H., Hoang T., Leutz A. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 8. P. 959–964.
- Zhen F., Lan Y., Yan B., Zhang W., Wen Z. // *Development.* 2013. V. 140. № 19. P. 3977–3985.
- Kallianpur A.R., Jordan J.E., Brandt S.J. // *Blood.* 1994. V. 83. № 5. P. 1200–1208.
- Landry J.R., Kinston S., Knezevic K., de Bruijn M.F., Wilson N., Nottingham W.T., Peitz M., Edenhofer F., Pimanda J.E., Ottersbach K., et al. // *Blood.* 2008. V. 111. № 6. P. 3005–3014.
- Real P.J., Ligerio G., Ayllon V., Ramos-Mejia V., Bueno C., Gutierrez-Aranda I., Navarro-Montero O., Lako M., Menendez P. // *Mol. Ther.* 2012. V. 20. № 7. P. 1443–1453.
- Lancrin C., Sroczyńska P., Stephenson C., Allen T., Kouskoff V., Lacaud G. // *Nature.* 2009. V. 457. № 7231. P. 892–895.
- Toscano M.G., Navarro-Montero O., Ayllon V., Ramos-Mejia V., Guerrero-Carreño X., Bueno C., Romero T., Lamolda M., Cobo M., Martin F., et al. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 1. P. 158–170.
- Shivdasani R.A., Mayer E.L., Orkin S.H. // *Nature.* 1995. V. 373. № 6513. P. 432–434.
- Robertson S.M., Kennedy M., Shannon J.M., Keller G. // *Development.* 2000. V. 127. № 11. P. 2447–2459.
- Porcher C., Chagraoui H., Kristiansen M.S. // *Blood.* 2017. V. 129. № 15. P. 2051–2060.
- Curtis D.J., Hall M.A., van Stekelenburg L.J., Robb L., Jane S.M., Begley C.G. // *Blood.* 2004. V. 103. № 9. P. 3342–3348.
- Gottgens B., Nastos A., Kinston S., Piltz S., Delabesse E.C., Stanley M., Sanchez M.J., Ciau-Uitz A., Patient R., Green A.R. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 12. P. 3039–3050.
- Zhang Y., Payne K.J., Zhu Y., Price M.A., Parrish Y.K., Zielinska E., Barsky L.W., Crooks G.M. // *Stem Cells.* 2005. V. 23. № 6. P. 852–860.
- Lacombe J., Herblot S., Rojas-Sutterlin S., Haman A., Barakat S., Iscove N.N., Sauvageau G., Hoang T. // *Blood.* 2010. V. 115. № 4. P. 792–803.
- Capron C., Lecluse Y., Kaushik A.L., Foudi A., Lacout C., Sekkai D., Godin I., Albagli O., Poullion I., Svinartchouk F., et al. // *Blood.* 2006. V. 107. № 12. P. 4678–4686.
- Benyoucef A., Calvo J., Renou L., Arcangeli M.L., van den Heuvel A., Amsellem S., Mehrpour M., Larghero J., Soler E., Naguibneva I., et al. // *Stem Cells.* 2015. V. 33. № 7. P. 2268–2279.
- Souroullas G.P., Salmon J.M., Sablitzky F., Curtis D.J., Goodell M.A. // *Cell Stem Cell.* 2009. V. 4. № 2. P. 180–186.
- Chagraoui H., Kassouf M., Banerjee S., Goardon N., Clark K., Atzberger A., Pearce A.C., Skoda R.C., Ferguson D.J., Watson S.P., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 3. P. 723–735.
- Dey S., Curtis D.J., Jane S.M., Brandt S.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 30. № 9. P. 2181–2192.
- Zhu J., Emerson S.G. // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 21. P. 3295–3313.
- Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. // *Nature.* 2000. V. 404. P. 193–197.
- Green A.R., Salvaris E., Begley C.G. // *Oncogene.* 1991. V. 6. № 3. P. 475–459.
- Hall M.A., Curtis D.J., Metcalf D., Elefanti A.G., Sourris K., Robb L., Gothert J.R., Jane S.M., Begley C.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 3. P. 992–997.
- Mouthon M.A., Bernard O., Mitjavila M.T., Romeo P.H., Vainchenker W., Mathieu-Mahul D. // *Blood.* 1993. V. 81. № 3. P. 647–655.
- Moignard V., Macaulay I.C., Swiers G., Buettner F., Schutte J., Calero-Nieto F.J., Kinston S., Joshi A., Hannah R., Theis F.J., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2013. V. 15. № 4. P. 363–372.

39. Kassouf M.T., Hughes J.R., Taylor S., McGowan S.J., Soneji S., Green A.L., Vyas P., Porcher C. // *Genome Res.* 2010. V. 20. № 8. P. 1064–1083.
40. Zhou R.Q., Wu J.H., Gong Y.P., Guo Y., Xing H.Y. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2014. V. 53. P. 39–46.
41. Palamarchuk A., Efanov A., Maximov V., Aqeilan R.I., Croce C.M., Pekarsky Y. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 11. P. 4515–4519.
42. Prasad K.S., Brandt S.J. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 17. P. 11457–11462.
43. Wadman I.A., Osada H., Grutz G.G., Agulnick A.D., Westphal H., Forster A., Rabbitts T.H. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 11. P. 3145–3157.
44. Osada H., Grutz G.G., Axelson H., Forster A., Rabbitts T.H. // *Leukemia.* 1997. V. 11. P. 307–312.
45. Schuh A.H., Tipping A.J., Clark A.J., Hamlett I., Guyot B., Iborra F.J., Rodriguez P., Strouboulis J., Enver T., Vyas P., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 23. P. 10235–10250.
46. Krosil G., He G., Lefrancois M., Charron F., Romeo P.H., Jolicoeur P., Kirsch I.R., Nemer M., Hoang T. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 188. № 3. P. 439–450.
47. Rojas-Sutterlin S., Lecuyer E., Hoang T. // *Curr. Opin. Hematol.* 2014. V. 21. № 4. P. 256–264.
48. Lacombe J., Krosil G., Tremblay M., Gerby B., Martin R., Aplan P.D., Lemieux S., Hoang T. // *Blood.* 2013. V. 122. № 7. P. 1150–1161.
49. Cheng J.T., Cobb M.H., Baer R. // *Mol. Cell. Biol.* 1993. V. 13. № 2. P. 801–808.
50. Tang T., Prasad K.S., Koury M.J., Brandt S.J. // *Biochem. J.* 1999. V. 343. P. 615–620.
51. Tang T., Arbiser J.L., Brandt S.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 21. P. 18365–18372.
52. Bugarski D., Krstic A., Mojsilovic S., Vlaski M., Petakov M., Jovcic G., Stojanovic N., Milenkovic P. // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2007. V. 232. № 1. P. 156–163.
53. Zeuner A., Eramo A., Testa U., Felli N., Pelosi E., Mariani G., Srinivasula S.M., Alnemri E.S., Condorelli G., Peschle C., et al. // *Cell Death Differ.* 2003. V. 10. № 8. P. 905–913.
54. Liu Y., Easton J., Shao Y., Maciaszek J., Wang Z., Wilkinson M.R., McCastlain K., Edmonson M., Pounds S.B., Shi L., et al. // *Nat. Genet.* 2017. V. 49. № 8. P. 1211–1218.
55. Chen Q., Cheng J.T., Tasi L.H., Schneider N., Buchanan G., Carroll A., Crist W., Ozanne B., Siciliano M.J., Baer R. // *EMBO J.* 1990. V. 9. № 2. P. 415–424.
56. Correia N.C., Arcangeli M.L., Pflumio F., Barata J.T. // *Leukemia.* 2016. V. 30. № 10. P. 1968–1978.
57. Begley C.G., Green A.R. // *Blood.* 1999. V. 93. № 9. P. 2760–2770.
58. Sayitoglu M., Erbilgin Y., Hatirnaz Ng O., Yildiz I., Celkan T., Anak S., Devecioglu O., Aydogan G., Karaman S., Sarper N., et al. // *Turk. J. Haematol.* 2012. V. 29. № 4. P. 325–333.
59. Zhou Y., Kurukuti S., Saffrey P., Vukovic M., Michie A.M., Strogantsev R., West A.G., Vetrie D. // *Blood.* 2013. V. 122. № 26. P. 4199–4209.
60. Liao W.S., Ngoc P.C., Sanda T. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017. V. 962. P. 139–147.
61. Palii C.G., Perez-Iratxeta C., Yao Z., Cao Y., Dai F., Davison J., Atkins H., Allan D., Dilworth F.J., Gentleman R., et al. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 3. P. 494–509.
62. Aplan P.D., Jones C.A., Chervinsky D.S., Zhao X., Ellsworth M., Wu C., McGuire E.A., Gross K.W. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 9. P. 2408–2419.
63. Ryan D.P., Duncan J.L., Lee C., Kuchel P.W., Matthews J.M. // *Proteins.* 2008. V. 70. № 4. P. 1461–1474.
64. Patterson L.J., Gering M., Eckfeldt C.E., Green A.R., Verfaillie C.M., Ekker S.C., Patient R. // *Blood.* 2007. V. 109. № 6. P. 2389–2398.
65. Fleskens V., Mokry M., van der Leun A.M., Huppelschoten S., Pals C.E., Peeters J., Coenen S., Cardoso B.A., Barata J.T., van Loosdregt J., et al. // *Oncogene.* 2016. V. 35. № 31. P. 4141–4148.
66. Lecuyer E., Herblot S., Saint-Denis M., Martin R., Begley C.G., Porcher C., Orkin S.H., Hoang T. // *Blood.* 2002. V. 100. № 7. P. 2430–2440.
67. Spirin P., Lebedev T., Orlova N., Morozov A., Poymenova N., Dmitriev S.E., Buzdin A., Stocking C., Kovalchuk O., Prassolov V. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 34. P. 56991–57002.
68. Uzan B., Poglio S., Gerby B., Wu C.L., Gross J., Armstrong F., Calvo J., Cahu X., Deswarte C., Dumont F., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6. № 6. P. 821–834.
69. Benyoucef A., Palii C.G., Wang C., Porter C.J., Chu A., Dai F., Tremblay V., Rakopoulos P., Singh K., Huang S., et al. // *Genes Devel.* 2016. V. 30. № 5. P. 508–521.
70. Cardoso B.A., de Almeida S.F., Laranjeira A.B., Carmo-Fonseca M., Yunes J.A., Coffey P.J., Barata J.T. // *Leukemia.* 2011. V. 25. № 10. P. 1578–1586.

УДК 616.379-008.64, 57.084.1, 612.349.1, 612.349.7

Патогенез сахарного диабета 1 типа и экспериментальные модели на лабораторных грызунах

И. Г. Гвазава^{1,2*}, О. С. Роговая^{1,2}, М. А. Борисов^{1,2}, Е. А. Воротеяк^{1,2,3}, А. В. Васильев^{1,3}¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: gvazava.inessa@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.05.2017

Принята к печати 26.10.2017

РЕФЕРАТ Сахарный диабет и его осложнения представляют собой самую распространенную эндокринную патологию в большинстве стран мира. Изучение патогенетических механизмов возникновения и прогрессии этого заболевания, а также поиск новых терапевтических средств и способов терапии остаются актуальными на сегодняшний день. Важнейшее значение для изучения сахарного диабета имеют экспериментальные модели. В обзоре обобщены данные о наиболее часто используемых животных моделях. Проанализированы и обсуждены механизмы стрептозотоцинового диабета как наиболее адекватной и легко воспроизводимой экспериментальной модели диабета. Рассмотрены значимые преимущества и недостатки описанных моделей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бета-клетки, гипергликемия, патогенез, сахарный диабет, стрептозотцин, экспериментальные лабораторные животные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СД1 – сахарный диабет 1 типа, СТЗ – стрептозотцин.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время среди так называемых «болезней цивилизации» одно из лидирующих мест по темпам роста заболеваемости, инвалидизации и смертности продолжает занимать сахарный диабет (СД). По последним данным, в 2013 году в мире насчитывалось 382 млн больных диабетом, а по прогнозам количество таких больных к 2035 году может увеличиться до 592 млн, т.е. на 55% [1]. СД – хроническое заболевание, которое характеризуется относительным или абсолютным отсутствием инсулина, что приводит к гипергликемии. Хроническая гипергликемия способствует развитию различных осложнений, таких, как нейропатия, нефропатия и ретинопатия, повышается также риск сердечно-сосудистых заболеваний. В соответствии с современной классификацией выделяют два основных типа СД, которые имеют многочисленные клинические, иммунологические и генетические различия. Предрасположенность к СД опосредуется несколькими группами генов. Следует подчеркнуть, что для развития заболевания необходимо наличие определенных аллелей генов системы главного комплекса гистосовместимости

(МНС) класса II. Помимо генетических факторов в генезе сахарного диабета участвуют факторы внешней среды, поэтому эту патологию относят к многофакторным заболеваниям [2].

Известно, что СД1 – это аутоиммунное заболевание, при котором происходит разрушение продуцирующих инсулин β -клеток поджелудочной железы. СД1 чаще всего диагностируется у детей и молодых людей, и к моменту постановки диагноза у пациентов существенно снижена выработка эндогенного инсулина, поэтому, чтобы уменьшить риск развития гипергликемии, необходимы регулярные инъекции инсулина и постоянный контроль содержания глюкозы в крови. Наиболее популярной теорией патогенеза СД1 является теория, предложенная G.S. Eisenbarth [3]. Согласно этой теории, СД1 развивается у генетически предрасположенных лиц. Аутоиммунные процессы при СД1 инициируются факторами внешней среды. Начальная стадия СД1 – гибель островковых клеток – протекает бессимптомно, но может быть выявлена с помощью определения аутоантител. Клинические признаки появляются только на последних стадиях процесса, когда подавляющее боль-

шинство β -клеток погибает и возникает абсолютная недостаточность инсулина [3, 4]. Изначально генетика СД1 представлялась относительно простой. Считалось, что при наличии определенных аллелей генов системы HLA доминирование заболевания было практически полным [5].

На сегодняшний день известно более 20 локусов и 100 генов-кандидатов, имеющих различную степень влияния на развитие СД1 [6]. Однако широкая распространенность этого заболевания и отсутствие значимых корреляций с генетическими отклонениями позволяют предполагать, что СД1 могут заболеть также люди, генетически не предрасположенные к данному заболеванию. Так, показано, что в 85–90% случаев СД1 встречается в семьях без первичной истории СД1 среди родственников первой линии. V. Nytinen и соавт. считают, что генетическая предрасположенность составляет около 30% [7].

Современная теория патогенеза СД1, предложенная M.A. Atkinson и G.S. Eisenbarth, предполагает, что развитию этого заболевания способствует или препятствует взаимодействие между генами, а не генетическая предрасположенность [8]. Кроме того, считается, что эти гены влияют на восприимчивость и сопротивляемость к СД1 не только в период, предшествующий индукции аутоиммунной реакции, но и в течение всего периода, предшествующего заболеванию.

Считается, что симптомы СД1 обычно проявляются, когда погибло 90–95% β -клеток [4]. Однако по этому поводу существует много расхождений. Не до конца понятен также феномен потери β -клеток. Предполагается, что выраженность этого феномена будет существенно меняться в зависимости от типа инсулита, степени гибели β -клеток и их способности к регенерации [9].

В настоящее время не до конца ясен механизм аутоиммунной реакции, предвещающей распад β -клеток, особенно реакции β -клетки на аутоиммунные антитела.

Согласно современным представлениям о патогенезе СД1, гибель β -клеток может происходить в результате разных патологических процессов. Один из них – деструкция или некроз β -клеток, другой – апоптоз, или генетически запрограммированная гибель клеток [10]. В присутствии избыточного количества свободных радикалов (кислородные радикалы или оксид азота) или под действием провоспалительных цитокинов β -клетки подвергаются некрозу [3, 11].

В последние годы показали, что процессы некроза и апоптоза не противостоят друг другу. Важную роль в процессе клеточной гибели играют цитокины. Такие цитокины, как IFN и IL-2, рассматриваются в качестве триггеров инсулита, способных активировать

механизм сигнализации, ведущей к гибели β -клеток поджелудочной железы [11].

Как все эндокринные расстройства, СД представляет собой довольно сложное заболевание, в которое вовлечены разные системы организма. Несмотря на огромный прогресс молекулярно-генетических исследований, вопросы профилактики и патогенетического лечения диабета до сих пор не разработаны на должном уровне. Основным инструментом патофизиологии на сегодняшний день остаются исследования, проведенные на экспериментальных моделях; при этом от выбора модели, ее этиологического и патогенетического соответствия заболеванию человека зависит успех не только теоретических исследований, но и разработка методов профилактики и терапии. Экспериментальные модели СД позволяют получить ценные сведения для понимания механизма антидиабетического действия различных агентов с целью направленного их применения. К настоящему времени разработано множество моделей экспериментального СД [12–16]. Чтобы избежать ошибочных результатов, важно объективно оценить достоинства и недостатки каждой модели в соответствии с поставленной целью.

Более 50 лет единственной моделью экспериментального сахарного диабета был диабет, вызываемый удалением поджелудочной железы. Для развития в послеоперационный период диабетических нарушений большое значение имеет количество сохраненной ткани поджелудочной железы. В зависимости от этого диабет развивается в период от нескольких часов (при полном удалении) до 9 месяцев (удалено 80% органа). Для получения хронического диабета с длительно существующим высоким уровнем глюкозы в крови часто прибегают к субтотальной панкреатэктомии. Основной причиной развития диабета в данном случае является дефицит инсулина, т.е. абсолютная инсулиновая недостаточность. Использование этой модели на первом этапе развития экспериментальной диабетологии позволило понять многое в механизмах действия инсулина, изменении обмена веществ при его дефиците, патогенезе нарушений, развивающихся при СД. Однако целый ряд причин, осложняющих применение оперативного удаления поджелудочной железы, стимулировал поиск новых моделей. С появлением неоперативных моделей СД применение этого метода резко снизилось. В последнее время его использовали в некоторых случаях с целью изучения механизма влияния ряда природных соединений на резистентность к инсулину и его секрецию у различных животных: крыс, морских свинок, собак. Изучен эффект усвоения глюкозы различными тканями при удалении 90% железы и значительная гипоинсулинемия при субтоталь-

ной резекции органа с последующей дополнительной резекцией [17, 18].

В данном обзоре существующие экспериментальные модели проанализированы с целью выявления наиболее адекватной и доступной животной модели СД1.

Основной характеристикой сахарного диабета 1 типа является аутоиммунное разрушение панкреатических β -клеток, что приводит к недостаточной продукции инсулина. В животных моделях недостаточная продукция инсулина обусловлена действием множества различных механизмов, начиная от химической абляции β -клеток до спонтанного развития аутоиммунного СД.

В зависимости от поставленной задачи используют генетические и негенетические экспериментальные модели. За последнее время благодаря прогрессу в области генной инженерии получено большое количество животных с генетически детерминированным развитием сахарного диабета.

СПОНТАННЫЕ АУТОИММУННЫЕ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

В 1974 году в Японии получили линию мышей *NOD* – это так называемые *Non Obese Diabetic mice* – мыши с диабетом без ожирения. Эти мыши, наряду с другими грызунами, такими, как мыши *AKITA*, биобридинговые (*BB*) крысы, крысы *LEW.IAR1* и др., характеризуются способностью к спонтанному развитию аутоиммунного диабета [16, 19, 20]. В основе спонтанного развития сахарного диабета, по всей видимости, лежит генетическая мутация, влияющая на селекцию Т-лимфоцитов и приводящая к нарушению механизмов контроля аутоагрессивности. Последние 25 лет в качестве модели спонтанного аутоиммунного сахарного диабета 1 типа наиболее широко используются мыши линии *NOD*, иммунологические характеристики которых сходны с характеристиками при инсулинзависимом СД1 у человека [21–26]. Через 3–4 недели после рождения у этих мышей развивается инсулит. На этой преддиабетической стадии панкреатические островки инфильтрированы преимущественно CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцитами [27]. Инсулит вызывает разрушение β -клеток, но еще на 10–14 неделе поджелудочная железа этих животных вырабатывает до 90% инсулина, и диабет у них может развиваться до 30-недельного возраста. У мышей *NOD* диабет чаще встречается у самок (60–90%), в то время как в большинстве колоний заболевают 10–30% самцов [28]. Для мышей линии *NOD* характерно проявление типичных клинических симптомов СД (гипергликемия, глюкозурия, полидипсия и полиурия), но у них не развивается кетоацидоз и, если не вводить эндогенный инсулин, то через 2–4 недели

после заболевания животные погибают в результате обезвоживания, а не от кетоацидоза [23, 29]. У мышей *NOD* многие гены связаны с предрасположенностью к СД1, и важную роль в этом процессе, как и у людей, играют аллели МНС. Однако МНС класса II, придающие устойчивость или восприимчивость к заболеванию, у мышей линии *NOD* отличаются по структуре от МНС класса II человека [27, 30, 31].

Мыши линии *NOD* являются полезной моделью для изучения генетики и механизма СД1. Эти мыши потенциально пригодны для тестирования лекарственных средств, действие которых направлено на модуляцию аутоиммунной реакции [23]. К преимуществам мышей *NOD* относится возможность блокады цитокинов специфическими антисыворотками и изучение изменений в развитии и течении заболевания [11, 32, 33]. Именно таким методом получены многие данные о роли отдельных цитокинов (интерлейкинов, фактора некроза опухоли, интерферона- γ) в патогенезе аутоиммунного инсулита при диабете [34]. Следует, однако, отметить, что, несмотря на высокую чувствительность мышей линии *NOD* к стрептозотоцину (СТЗ), гибель β -клеток у них происходит в отсутствие активации поли(ADP-рибоза)полимеразы (ПАРП) [35]. Этот факт может существенно влиять на корректность исследований чувствительности β -клеток этих животных к диабетогенным факторам [25, 26].

Первоначальный оптимизм, касающийся идентификации метода предупреждения заболеваемости СД1 с использованием животных моделей, привел как к открытиям, так и к разочарованиям в отношении применения аналогичных методов у человека. Опубликовано более 192 методов, которые могут быть использованы для предупреждения заболевания СД1 у мышей *NOD* [36–38]. Процесс предупреждения заболеваемости диабетом у мышей оказывается относительно простым, а у людей он чрезвычайно сложен [5]. Одной из причин может быть то, что большее значение придается сходству заболеваний СД1 у мышей *NOD* и человека, чем различиям [39]. В действительности и у мышей, и у человека диабет имеет полигенную этиологию, характеризуется нарушением регуляции иммунного ответа и способностью к ремиссии после трансплантации костного мозга. Выявлены различия в действии материнских аутоантител у мыши и у человека. Различия наблюдаются также в частоте заболеваний и половой принадлежности. У мышей *NOD* инсулит протекает в легкой форме, доброкачественно [19]. Наконец, функционирование иммунных систем мыши и человека имеет значительные различия [40].

Другая распространенная модель аутоиммунного диабета – крысы линии *BB*, полученные в 70-е годы

в Канаде (BioBreeding Laboratories) на колонии аут-бредных крыс Wistar. У 90% крыс линии *BB* (самцы и самки 8–16-недельного возраста) после полового созревания, как правило, развивается спонтанный СД1 с довольно тяжелым фенотипом и необходимостью инсулинотерапии [41]. У животных наблюдается инсулит с наличием Т-клеток, В-клеток, макрофагов и клеток НК, но с резким сокращением числа CD4⁺ Т-клеток и почти полным отсутствием CD8⁺ Т-клеток. Свойственная этим животным Т-клеточная лимфопения не характерна для СД1 у людей и мышей линии *NOD* и рассматривается как недостаток модели. Следует отметить, что у крыс линии *BB* инсулиту не предшествует периинсулит [42]. Тем не менее крысы *BB* используются в качестве модели на малых животных при индукции толерантности после трансплантации островков [41], а также при изучении диабетической нейропатии.

ГЕНЕТИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИНСУЛИНЗАВИСИМЫЙ ДИАБЕТ

Мыши линии *AKITA* были получены в Японии от мышей C57BL/6NSIc со спонтанной мутацией в гене *ins 2*, предотвращающей правильный процессинг проинсулина и приводящей к стрессу эндоплазматической сети (ER-стрессу). У мышей с такой мутацией, начиная с 3–4-недельного возраста, развивается инсулинзависимый диабет, который характеризуется гипергликемией, гипоинсулинемией, полиурией и полидипсией. Отсутствие β-клеточной массы в этой модели делает ее альтернативой индуцированной СТЗ модели, используемой в исследованиях по трансплантологии [22]. Мыши линии *AKITA* применяются также в качестве модели СД1 при изучении макрососудистых заболеваний [43] и нейропатии [44]. Эта модель широко используется для исследования потенциальных супрессоров ER-стресса в островковых клетках поджелудочной железы, в связи с чем мыши линии *AKITA* могут применяться при изучении некоторых патологий при СД2 [45].

Однако результаты, полученные на грызунах, невозможно использовать в клинической медицине, поскольку существуют как специфические различия в иммунной системе грызунов и человека, так и видоспецифические особенности островков Лангерганса поджелудочной железы. Островки человека и мыши, которые предполагается использовать в качестве мишени для аутоиммунной атаки, отличаются во многих отношениях, включая архитектуру и состав клеток, пролиферативную активность, восприимчивость к травмам, способность образовывать островковый амилоид, а также в экспрессии белков теплового шока, островковых факторов транскрипции, антиоксидантных ферментов и основного переносчика

глюкозы (GLUT-1 или GLUT-2). Так, у грызунов не β-эндокринные клетки окружают внутреннюю β-клеточную массу, тогда как у человека эндокринные клетки островков более перемешаны. Кроме того, в отличие от β-клеток грызунов, способных восстанавливаться или регенерировать в ответ на ряд стимулов (резистентность к инсулину, абляция β-клеток и частичная панкреатэктомия), пролиферативный потенциал β-клеток человека либо очень мал, либо отсутствует [46].

Отличия иммунной системы грызунов и человека связаны, в первую очередь, с главным комплексом гистосовместимости (МНС). Пересадка человеческих иммунных клеток и тканей иммунодефицитным мышам позволяет получать перспективные мышинные модели, используемые для изучения естественных человеческих иммунных реакций. Экспериментальные модели сахарного диабета пытались улучшить, используя для этой цели «гуманизированных» трансгенных мышей, экспрессирующих предрасполагающие к диабету человеческие молекулы МНС класса II. Созданы новые линии мышей с иммунодефицитом, в которых приживаются трансплантированные функциональные ткани человека, включая гемопоэтические стволовые клетки, зрелые лимфоциты и островки поджелудочной железы. Так, на основе мышей *NOD-SCID* получены уникальные линии мышей *NSG*, с целенаправленной мутацией рецептора *IL2ry^{null}* общей γ-цепи. Мыши *NSG* считаются идеальными для исследования функций иммунной системы человека *in vivo* и определения механизмов действия лекарственных средств при СД1 [47–50].

Модели, в которых используют мышей с иммунодефицитом, имеют ряд недостатков. Во-первых, в них активны естественные киллерные клетки (НК), а островки поджелудочной железы человека очень чувствительны к НК-клеткам. Во-вторых, они не поддерживают приживание функциональной иммунной системы человека [37, 39]. Дефицит рецептора *IL2ry^{null}* общей γ-цепи полностью блокирует НК-клетки, вызывая дополнительные дефекты врожденного иммунитета. Мыши *NSG* полностью лишены НК-клеток. *NSG*-мышы служат удобной моделью для изучения функции трансплантированных островков поджелудочной железы человека при отсутствии потенциальных токсических эффектов глюкозы, несмотря на то, что эугликемия (120–160 мг/дл) у этих животных характеризуется большим содержанием глюкозы в крови, в отличие от человека (80–100 мг/дл). Нормогликемические мыши *NSG* доступны в неограниченном количестве, трансплантированные ими клетки не подвергаются воздействию высоких уровней глюкозы, для анали-

за функции требуется меньше клеток, чем для регулирования гипергликемии у реципиентов с диабетом [47–50]. Таким образом, показано, что мыши *NSG* легко доступны, у них по желанию возможно вызвать гипергликемию и восстановить нормогликемию с помощью трансплантации островков Лангерганса, а также суспензии клеток поджелудочной железы человека и мыши, и, основное, этим мышам может быть привита функционирующая иммунная система человека. Однако при воздействии на этих мышей СТЗ, несмотря на ряд вышеописанных преимуществ, существуют и недостатки: неустойчивая индукция гипергликемии, возможность использования эндогенных мышинных островков для восстановления нормогликемии и токсичность СТЗ.

С целью индукции гипергликемии без использования токсических соединений были созданы генетические модели гипергликемии [47, 48]. К ним относятся модели мыши *NOD-Rag1^{null} Prf1^{null} Ins2^{Akita}*, *NOD-Rag1^{null} IL-2^{ry}^{null} Ins2^{Akita}* и др. Преимущества этих моделей: 1) спонтанное развитие гипергликемии без использования токсичных лекарственных средств; 2) постоянная и тяжелая гипергликемия; 3) нет возврата к нормогликемии за счет эндогенных островков мыши; 4) нет необходимости во введении экзогенного инсулина, чтобы предотвратить развитие метаболической декомпенсации и смерти. Эти модели способны поддерживать приживание функциональной иммунной системы человека, поэтому они могут использоваться для изучения аллоиммунитета и аутоиммунитета.

Несмотря на значительный вклад исследований, выполненных на линиях генетически модифицированных животных, в понимание механизма патогенеза сахарного диабета, их роль не следует переоценивать. При использовании этих моделей вне поля зрения могут остаться вопросы приобретенной предрасположенности, играющие не меньшую роль в возникновении сахарного диабета 1 типа. Известно, что СД1 генетически жестко детерминирован лишь в 6–7% случаев, в то время как в остальных случаях заболевание развивается без существенной наследственной предрасположенности [51]. Установлено, что заболевание развивается далеко не у всех носителей аллелей, ассоциированных с диабетом [52]. Таким образом, перспективным представляется экспериментальное изучение механизмов действия неблагоприятных факторов внешней среды. При этом механизмы гибели β -клеток в значительной мере универсальны и во многом не зависят от действующего фактора, что позволяет экстраполировать на человека результаты, полученные на экспериментальных моделях [52].

ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ 1 ТИПА

При химически индуцированном СД1 наблюдается разрушение большого числа эндогенных β -клеток, что ведет к снижению выработки эндогенного инсулина с последующим развитием гипергликемии и потерей веса. Диабет, химически индуцируемый у грызунов и высших животных, представляет собой простую и относительно дешевую модель этого заболевания [53].

СД1, индуцированный с помощью химических веществ (СТЗ, аллоксан, дитизон), целесообразно использовать для оценки лекарственных средств или терапевтических подходов, при которых снижение уровня глюкозы в крови не зависит от β -клеток; например, для тестирования новых форм инсулина [54, 55]. Эта модель подходит и для оценки эффективности трансплантационной терапии, которая также приводит к снижению уровня глюкозы в крови [56, 57]. Считается, что необходимо исключить спонтанную регенерацию β -клеток при трансплантации [58, 59], а также провести гистологическое исследование эндогенной поджелудочной железы для определения инсулин-положительных клеток и измерения количества инсулина [59]. Однако с использованием химически индуцируемой модели СД1 было показано, что присутствие β -клеток не обязательно коррелирует с их функцией [60].

Один из недостатков сахарного диабета, индуцируемого химическими веществами, – их возможная токсичность для других органов. Следует отметить, что после введения СТЗ и аллоксана были зарегистрированы изменения уровня экспрессии изоферментов P450 в печени, почках, легких, кишечнике, семенниках и головном мозге. Этот факт необходимо учитывать при тестировании лекарственных препаратов на животных моделях [61].

Наиболее широко используется СТЗ-индуцируемая модель СД1, пришедшая на смену аллоксановой модели [36, 40], существенные недостатки которой связаны, в том числе, с нейро- и нефротоксичностью аллоксана и с отсутствием четкой зависимости доза–эффект.

Природный антибиотик СТЗ вырабатывается актиномицетами *Streptomyces achromogenes* и представляет собой N-ацетилглюкозамин(2-дезоксид-2-(3-метил-3-нитрозомочевина)-1-D-глюкопираноза), содержащий на месте ацетата остаток нитрозомочевины [36, 37]. СТЗ обладает антибактериальной и противоопухолевой активностью, поэтому его начали применять в терапии опухолей. Однако вскоре обнаружили, что применение СТЗ приводит к развитию гипогликемических состояний. Была показана способность СТЗ вызывать специфический некроз

β -клеток у лабораторных животных. Наблюдаемый инсулинемический синдром назвали «стрептозотоциновым диабетом», а СТЗ стали использовать для получения экспериментального СД1. Рассмотрим подробнее эту модель.

СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ

В настоящее время стрептозотоциновый диабет получен у большинства лабораторных животных: крыс, мышей, морских свинок, кроликов, собак и обезьян. Однако различные виды животных, даже в пределах одного семейства, зачастую значительно различаются по чувствительности к СТЗ. Изучение межвидовых и межгрупповых различий в резистентности к СТЗ является одной из важных задач экспериментальной диабетологии. Считается, что наиболее чувствительны к СТЗ грызуны, особенно крысы, а человек и рыбы максимально резистентны [62], при этом β -клетки человека значительно более устойчивы к СТЗ, чем β -клетки остальных человекоподобных приматов [62]. Данная закономерность имеет генетическую природу, она обусловлена экспрессией различных видов транспортеров глюкозы на плазматической мембране, особенностями ферментативных систем окисления глюкозы в митохондриях и различиями в системе репарации ДНК [63].

ВНУТРИВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ

В пределах одного вида также существуют значительные межгрупповые различия в резистентности к СТЗ. Инбредные линии крыс и мышей могут отличаться по чувствительности к СТЗ в несколько раз [64, 65]. Диабетогенное действие СТЗ усиливается андрогенами и угнетается эстрогенами, что приводит к значительным различиям в чувствительности к СТЗ у самцов и самок [66]. Существенную роль в чувствительности к диабетогенным факторам играют не только связанные с полом различия, но и определенные индивидуальные особенности. Так, среди крыс Wistar можно выделить три группы животных с различной резистентностью к диабетогенным факторам, что проявляется в количестве β -клеток, гибнущих при воздействии СТЗ. Эта неоднородность обусловлена не шириной нормы реакции, а существованием изолированных групп животных с различной резистентностью. Животные первой группы характеризуются быстрым развитием гипергликемии и значительной деструкцией панкреатических островков уже на начальных стадиях диабета. Для второй группы характерно длительное латентное течение патологического процесса, когда при эугликемии натощак наблюдается нарушение толерантности к глюкозе. Третья группа занимает промежуточное положение с периодически возникающей гипергликемией [63].

СПОСОБЫ И ДОЗЫ ВВЕДЕНИЯ СТЗ

Однократное введение высокой дозы СТЗ приводит к развитию гипергликемии, и экспериментальные модели лабораторных грызунов, полученные таким путем, могут быть полезными при трансплантации и тестировании препаратов инсулина. Для моделирования СД1 используют также множественные введения низких доз СТЗ. Тем не менее получить модель СД1 за счет развития аутоиммунного инсулита удастся лишь на немногих линиях мышей с генетической предрасположенностью [62, 67]. Этот метод не позволяет получить адекватную модель СД1 человека на других видах животных [62]. В этих случаях для развития самопрогрессирующего патологического процесса с аутоиммунным компонентом желательнее использовать однократную инъекцию диабетогенной дозы СТЗ (зависящей от вида животного) [62].

Диабетогенные дозы СТЗ, как и способы их введения, различны для разных видов животных. Субдиабетогенная доза СТЗ для крыс составляет 25 мг/кг при оптимальной диабетогенной дозе порядка 50–75 мг/кг [62, 68, 69]. У большинства животных эта доза приводит к манифестации диабета с гипергликемией, гипоинсулинемией, дислипидемией и значительной деструкцией панкреатических островков в сочетании с их лимфоидной инфильтрацией. Следует отметить, что для других видов грызунов диабетогенные дозы значительно выше и находятся в диапазоне от 100 до 200 мг/кг [62, 70]. β -Клетки рыб проявляют высокую резистентность к действию СТЗ, который даже в высоких дозах (350 мг/кг) вызывает лишь кратковременное нарушение синтеза и секреции инсулина без деструкции панкреатических островков. Этот феномен связан не с ускоренной деградацией СТЗ в печени или почках, а с особенностями метаболизма β -клеток у этих животных. В связи с неустойчивостью и коротким периодом полураспада СТЗ самым надежным считается его внутривенное введение. Однако существуют также и другие способы введения препарата для получения экспериментального диабета: внутрибрюшинный метод и прямая инфузия в сосуды поджелудочной железы. СТЗ устойчив лишь при низкой температуре в кислой среде, в то время как в нейтральных и щелочных условиях он быстро (в течение нескольких минут) деградирует до неактивных метаболитов, не обладающих диабетогенным эффектом [71]. В связи с этим СТЗ, растворенный *ex tempore*, рекомендуют вводить в цитратном буфере при кислых значениях (рН 4.5) [66].

ЗАКОНОМЕРНОСТИ РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В ответ на изменение концентрации плазменного инсулина после введения СТЗ изменяется концен-

трация глюкозы в крови [72]. Эти изменения носят трехфазный характер. В отличие от аллоксана, СТЗ не угнетает глюкокиназу. Через 1 ч после введения начинается первая гипергликемическая фаза, которая достигает пика через 2 ч и продолжается до 4 ч. Считается, что развитие ранней гипергликемии обусловлено угнетением секреции инсулина в результате токсического воздействия СТЗ на β -клетки поджелудочной железы [73]. Некоторые авторы связывают ее с повышением скорости печеночного гликогенолиза или рассматривают как вторичную по отношению к повышению содержания свободных жирных кислот [13, 74]. Ультраструктурные изменения синтетического и энергетического аппарата β -клеток, сопровождаемые нарушениями биосинтеза проинсулина и инсулина, наблюдали в период гипергликемической фазы [75]. Через 4–8 ч наступает следующая гипогликемическая фаза, которая продолжается в течение нескольких часов (до суток) и считается следствием высвобождения инсулина из поврежденных β -клеток. Потеря секреторных гранул развивается на фоне необратимых изменений субклеточных оргanelл и ядра. Финальная фаза гликемической кривой характеризуется устойчивой гипергликемией и развитием перманентного диабета через 24 ч после введения СТЗ. Морфологический и ультраструктурный анализы свидетельствуют о полной дегрануляции и потере целостности β -клеток. Вторичная гипергликемия рассматривается как результат абсолютной инсулиновой недостаточности.

Согласно другим авторам, формирование гипергликемии при развитии экспериментального СТЗ-диабета также происходит за несколько последовательных этапов, но они более растянуты по времени. Так, первичная гипергликемическая реакция (в течение 1–4 сут); период эугликемии на фоне нарушенной толерантности к глюкозе (5–9-е сут); период стабильной гипергликемии, гиперфагии, полиурии (10 сут и далее) [66]. Через 12 ч после введения СТЗ наблюдается первичная гипергликемическая реакция, обусловленная гибелью значительной части β -клеток в панкреатических островках. Пик гипергликемии приходится на 2–3-и сут, затем наступает короткий период эугликемии. Причиной этого является то, что β -клетки потенциально способны вступать в митоз под действием высокой концентрации глюкозы [5]. Активация пролиферации β -клеток, как полагают, наступает на 3-и сут развития диабета [63]. Увеличение массы β -клеток в дальнейшем ведет к быстрому снижению гликемии до физиологических значений (до окончания 9-х сут) и соответствует состоянию неполной компенсации функции инсулярного аппарата поджелудочной железы. Неполноценность компенсаторной реакции проявляется нарушенной

толерантностью к глюкозе. К 10–14-му дню у животных наблюдается повторное повышение уровня гликемии [63]. Вероятно, в этот период происходит формирование развернутого аутоиммунного ответа на неоантигены панкреатических островков, ведущие к гибели основной массы β -клеток, фиброзу и склерозу островков, пролиферации альфа-клеток. В сохранившихся β -клетках в значительной степени нарушена индуцированная глюкозой секреция инсулина. Это вызвано рядом причин: неспецифической реакцией β -клеток на любые повреждающие факторы (в том числе СТЗ) и специфическим действием IL-1B и NO на метаболизм глюкозы в митохондриях, что нарушает нормальную активацию β -клеток [75, 76]. Помимо этого активированные островковые макрофаги и T-лимфоциты продуцируют нейропептид- γ (NPY), который подавляет секрецию инсулина [76].

ФАКТОРЫ, ОБУСЛАВЛИВАЮЩИЕ РАЗЛИЧИЯ В УСТОЙЧИВОСТИ К СТЗ

Различия в чувствительности к СТЗ обусловлены в большей мере внутриклеточными событиями, происходящими после переноса СТЗ через плазматическую мембрану в цитозоль и перед истощением запасов NAD⁺ [63]. Согласно опубликованным данным, резистентность к СТЗ определяет ряд факторов.

1. Чувствительность к диабетогенному действию зависит в первую очередь от физиологических свойств β -клеток. От этого зависят различия в скорости инактивации и выведения СТЗ [62, 71].

2. Различная степень экспрессии транспортеров глюкозы второго типа (GLUT-2), которые являются специфическими переносчиками СТЗ в цитоплазму β -клеток. Высокая резистентность β -клеток человека к СТЗ обусловлена преимущественной экспрессией на их поверхности GLUT-1, а не GLUT-2 [62].

3. Различия в активности систем окисления, например, более низкая активность ферментов гликолиза обуславливает большую восприимчивость и степень токсичности СТЗ у полевок в сравнении с мышами.

4. Внутриклеточное накопление различных метаболитов СТЗ, часть которых, как и СТЗ, способствует генерации свободнорадикальных продуктов и возникновению мутаций [77, 78].

5. Различная чувствительность инбредных линий мышей к СТЗ обусловлена разницей в активности поли(ADP-рибоза)полимеразы (ПАРП) [77].

6. Экспрессия белков теплового шока, которые являются мощными факторами резистентности панкреатических β -клеток к токсическому действию СТЗ. Уровень их экспрессии как при неспецифическом (действие СТЗ) воспалении, так и при аутоиммунном считается одним из наиболее важных пара-

метров, определяющих жизнеспособность β -клеток при инсулите [79, 80].

7. Различия в активности антиоксидантных систем, в частности, более высокая активность глутатионпероксидазы у мышей, являются одним из факторов, определяющих высокую устойчивость мышей к СТЗ [63].

8. Трансгенные линии мышей, экспрессирующие в β -клетках интерферон- γ , значительно более резистентны к индукции диабета, чем исходная линия [81]. Этот пример, как полагают, свидетельствует о роли внутриостровковых паракринных факторов [81]. Однако молекулярные механизмы этого феномена остаются не до конца изученными.

9. Также причиной, обуславливающей различия в устойчивости к СТЗ, считается кумулятивное действие повреждающих факторов. Неблагоприятные факторы внешней среды (особенно действующие в период раннего онтогенеза), вызывающие стресс-реакцию через высокий уровень глюкокортикоидов и изменения нейроэндокринной регуляции функции панкреатических островков, способны приводить к эндокринному импринтингу, связанному со значительной перестройкой внутриклеточных систем регуляции функции β -клеток [63]. У взрослых животных, перенесших в пренатальном периоде стресс, нарушена стимулированная глюкозой секреция инсулина и толерантность к глюкозе, а также существенно повышена чувствительность β -клеток к токсическому действию СТЗ [5].

Тропность СТЗ к β -клеткам определяется остатком глюкозы в составе его молекулы [82], благодаря которой он селективно связывается с переносчиком глюкозы GLUT-2 и транспортируется в цитоплазму [83]. Таким образом, чувствительность клеток к СТЗ зависит от экспрессии переносчиков GLUT-2, которые у большинства животных экспрессируются исключительно β -клетками панкреатических островков. Это подтверждается также следующими наблюдениями: инсулинпродуцирующие клетки, не экспрессирующие переносчик глюкозы, устойчивы к СТЗ, они становятся чувствительными к токсическому действию препарата только после экспрессии GLUT-2 в плазматической мембране [84]. Кроме того, другие клетки, экспрессирующие этот переносчик, такие, как гепатоциты и эпителиоциты канальцев почек, также подвергаются токсическому воздействию СТЗ. Поэтому введение животным СТЗ приводит к развитию не только диабета, но и повреждений печени и почек [63].

ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ

СТЗ способен неферментативно высвободить свободный NO, с которым связывают токсический эффект СТЗ [39, 85]. При этом в островковых β -клетках

накапливается большое количество СТЗ и возникает высокая концентрация NO, который, находясь в жидкой среде, быстро превращается в пероксинитрат, что ведет к активации процессов свободнорадикального окисления [39]. В результате нарушается целостность клеточных мембран, снижается эффективность окислительного фосфорилирования в митохондриях [37, 67], возникают точечные мутации в ДНК, такие, как ковалентная модификация пуриновых оснований и появление N-7-метилгуанина, O-6-метилгуанина и 3-метиладенина. СТЗ и его метаболиты являются алкилирующими агентами, которые метилируют остатки гуанина и, в меньшей степени, аденина в ДНК [86]. Следствием повреждения ДНК становится активация систем репарации. Ключевым ферментом, вовлеченным в репарацию при точечных мутациях, является ПАРП, которая замещает дефектное основание хвостом из поли-ADP-рибозы [59, 77]. Для осуществления репарации требуется NAD, что, учитывая огромное количество мутаций, индуцируемых NO и СТЗ, ведет к истощению клеточного пула NAD и гибели клетки [71, 87, 88]. При этом трансгенные мыши с дефицитом ПАРП устойчивы к действию диабетогенных факторов. Исследования последних лет показали, что, хотя СТЗ метилирует также белки, за гибель β -клеток отвечает, в конечном счете, метилирование ДНК [73]. Показано, что решающую роль в токсическом эффекте СТЗ в отношении β -клеток играет его способность вызывать энергетический дефицит в клетках [71, 87, 88].

ПАРП является ключевым фактором, участвующим в гибели β -клеток [37, 62], который активируется вне зависимости от того, вызвано ли повреждение ДНК действием химических факторов (СТЗ, аллоксан), факторами воспаления (NO, цитокины, активные формы кислорода) или β -цитотропными вирусами [62, 89].

С другой стороны, специфическое действие NO на β -клетки заключается также в активации гуанилатциклазы, повышении уровня cGMP и ингибировании митохондриальной аконитазы, что ведет к нарушению аэробного окисления глюкозы и, как следствие, подавлению стимулированной глюкозой секреции и синтеза инсулина [67, 90, 91]. При этом угнетение аконитазы, участвующей в цикле Кребса, на фоне гиперактивации ПАРП, ведет к полному истощению внутриклеточных запасов NAD и АТФ, что и является непосредственной причиной некроза β -клеток. При индуцированной СТЗ гибели β -клеток процессы апоптоза оказываются также блокированными из-за полного истощения внутриклеточных запасов АТФ и NAD [92, 93].

Генерация NO ответственна как за инициацию, так и за развитие СД, обусловленного как действием

вирусов [89] и токсических веществ [94], так и ауто-иммунным ответом. Алкилирующий агент метилметансульфонат, будучи самым токсичным соединением, не является донором NO, доказывая тем самым, что NO не обязателен для токсического действия алкилирующих агентов, в том числе диабетогенного стрептозотоцина. NO и свободные нитроксильные радикалы могут усиливать токсичность СТЗ, но NO, несомненно, не является решающим фактором токсичности для β -клеток [51]. Однако способность СТЗ вызывать истощение пула АТФ и, следовательно, дефицит энергии имеет важное значение для токсического действия на β -клетки. Биологические эффекты СТЗ на гомеостаз глюкозы и инсулина обусловлены повреждением β -клеток. С одной стороны, очевидно нарушение гомеостаза глюкозы (потребление кислорода и окисление глюкозы) и угнетение биосинтеза и секреции инсулина. С другой стороны, установлено, что СТЗ не оказывает непосредственного и прямого действия на транспорт глюкозы или ее фосфорилирование глюкокиназой [33, 95]. Предполагается, что первоначально угнетение биосинтеза и секреции инсулина может быть вызвано индуцированным СТЗ истощением NAD⁺ [96].

Показано, что такие цитокины, как IL-1, в иммунокомпетентных и эндокринных клетках панкреатических островков вызывают экспрессию индуцируемой синтазы оксида азота (иНОС) [85, 97], которая продуцирует значительные количества главного биологического медиатора и тем самым обуславливает гибель β -клеток [39, 98].

Таким образом, СТЗ активирует те же патогенетические механизмы (угнетение окисления глюкозы, мутации ДНК, истощение запасов NAD), как и другие токсичные для β -клеток яды и вирусы, а ключевыми агентами, реализующими эти процессы, вне зависимости от повреждающего фактора, являются NO и ПАРП. Таким образом, следует заключить, что стрептозотоциновая модель диабета этиологически и патогенетически в значительной степени близка к СД1 человека.

Несмотря на разнообразие описанных на сегодняшний день экспериментальных животных моделей СД, предпочтение отдается СТЗ-индуцированному диабету. Преимущество этой модели заключается в относительной простоте воспроизведения, высокой избирательности воздействия, возможности получения диабета различной степени тяжести и длительности, что позволяет смоделировать как постепенно развивающуюся дисфункцию β -клеток, так и нарушение толерантности к глюкозе, и развитие связанных с ней расстройств. Ряд недостатков негенетических СТЗ-моделей диабета (возможность разброса данных по уровню гликемии, возможность спонтан-

ной нормализации инсулинсекретирующей функции) может быть устранен путем правильного подбора диабетогенной дозы препарата и адекватного планирования эксперимента.

Экспериментальные модели СД на лабораторных грызунах, несомненно, считаются очень полезным инструментом для изучения патофизиологии и клинических аспектов заболевания и используются в качестве первого шага для исследования перспективной новой терапии. Однако животные модели в целом и модели СД 1 типа на грызунах в частности являются несовершенными и обладают некоторыми недостатками, когда результаты экстраполируются на человека. Более того, иногда результаты, полученные на грызунах, могут вводить в заблуждение при изучении профилактики СД1 [64, 99]. Чтобы избежать ошибочных результатов, требуется определенная осторожность при выборе модели и дозы препарата для получения экспериментального диабета. Необходимо специально для исследований по профилактике СД стандартизировать модели и эксперименты, получив достоверные результаты, четко их интерпретировать и создавать базу данных, после многократных повторов экспериментов.

Вопрос о том, в какой степени результаты, полученные на моделях, можно экстраполировать на организм человека, является одновременно и важнейшим и сложнейшим при использовании лабораторных животных [100, 101]. Однако вопрос о соответствии той или иной модели процессам, протекающим в организме человека, остается открытым. Оценка адекватности экспериментальных моделей включает систему доказательств, показывающих, что результаты, полученные на животных, с определенной степенью вероятности могут быть экстраполированы на человека.

Приведенные данные не отражают весь спектр разработанных на сегодняшний день моделей СД1. Количество моделей постоянно растет, но они недостаточно изучены. При этом следует учитывать, что каждая экспериментальная модель воссоздает лишь определенные звенья патогенеза СД1 и не имеет полного соответствия с развитием и течением этого заболевания у человека. Поэтому продолжают работы по модификации имеющихся и созданию новых более совершенных моделей, наиболее полно отражающих изменения, присущие СД1 у человека.

Следует подчеркнуть, что адекватное моделирование СД1 является необходимой основой доклинических испытаний антидиабетических средств, а использование разнообразных моделей дает возможность для обоснования экстраполяции экспериментальных результатов на больных СД1. ●

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИБР РАН им. Н.К. Кольцова «Механизмы

клеточной дифференциации в морфогенезе и процессах восстановления» (№ 0108-2018-0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень ВОЗ № 312., апрель 2016 г.
2. Балаболкин М.И., Дедов И.И. // Сахарный диабет. 2000. № 3. С. 2–10.
3. Eisenbarth G.S. // N. Engl. J. Med. 1986. № 314. P. 1360–1368.
4. Daaboul J., Schtz D. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2003. № 4. P. 317–323.
5. Никонова Т.В. // Сахарный диабет. 2006. № 3. С. 59–64.
6. Ide A., Eisenbarth G.S. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2003. № 4. P. 243–253.
7. Hyttinen V., Kaprio J., Kinnunen L., Koskenvuo M., Tuomi-lehto J. // Diabetes. 2003. № 52. P. 1052–1055.
8. Atkinson M.A. // Diabetes. 2005. V. 54. № 5. P. 1253–1263.
9. Homo-Delarche F., Drexhage H.A. // Trends Immunol. 2004. № 25. P. 222–229.
10. Мохорт Т.В., Мельнов С.В., Горанов В.А. // Пробл. эндокринологии. 2000. Т. 46. № 2. С. 8–13.
11. Kawasaki E., Abiru N., Eguchi K. // Diabetes Res. Clin. Practice. 2004. № 66. P. 27–32.
12. Rees D.A., Alcolado J.C. // Diabetic Medicine. 2005. № 4. P. 359–370.
13. Баранов В.Г. Экспериментальный сахарный диабет. М.: Наука, 1983. 240 с.
14. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. М.: Изд-во ВПК, 2004. 608 с.
15. Lukačínová A., Hubková B., Rác O., Ništiar F. // Diabetes Mellitus – Insights and Perspectives / Ed. Oluwafemi O. Oguntibeju. L.: InTech, 2013. Ch. 13.
16. King A.J. // Br. J. Pharmacol. 2012. V. 166. № 3. P. 877–894.
17. Choi S.B., Park C.H., Choi M.K., Jun D.W., Park S. // J. Biotech. Biochem. 2004. V. 68. P. 2257–2264.
18. Masiello P. // Internat. J. Biochem. Cell Biol. 2006. V. 38. № 5–6. P. 873–893.
19. Green E.A., Flavel R.A. // Immunol. Rev. 1999. V. 169. P. 11–22.
20. Yang Y., Santamaria P. // Clin. Sci. (London). 2006. V. 110. № 6. P. 627–639.
21. Lenzen S., Tiedge M., Elsner M., Lortz S., Weiss H., Jörns A., Klöppel G., Wedekind D., Prokop C.M., Hedrich H.J. // Diabetologia. 2001. № 44. P. 1189–1196.
22. Wallis R.H., Wang K., Marandi L., Hsieh E., Ning T., Chao G.Y., Sarmiento J., Paterson A.D., Poussier P. // Diabetes. 2009. № 58. P. 1007–1017.
23. Todd J.A., Wicker L.S. // Immunity. 2001. V. 15. № 3. P. 387–395.
24. Driver J.P., Serreze D.V., Chen Y.G. // Semin. Immunopathol. 2011. № 33. P. 67–87.
25. Niens M., Grier A.E., Marron M., Kay T.W., Greiner D.L., Serreze D.V. // Diabetes. 2011. № 60. P. 1229–1236.
26. Herrath M.G., Nepom G.T. // J. Exp. Med. 2005. V. 202. № 9. P. 1159–1162.
27. Herrath M.G., Nepom G.T. // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 2. P. 129–132.
28. Chan O., Inouye K., Akirav E.M., Park E., Riddell M.C., Matthews S.G., Vranic M. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2005. V. 289. № 1. P. 235–246.
29. Mathews C.E. // Pediatr. Diabetes. 2005. V. 6. № 3. P. 165–177.
30. Yoon J.W., Jun H.S. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2001. № 928. P. 200–211.
31. Wicker L.S., Clark J., Fraser H.I., Garner V.E., Gonzalez-Munoz A., Healy B., Howlett S., Hunter K., Rainbow D., Rosa R.L., et al. // J. Autoimmun. 2005. № 25 (Suppl.). P. 29–33.
32. Toyoda H., Formby B. // Bioessays. 1998. V. 20. № 9. P. 750–757.
33. O'Reilly L.A., Gu D., Sarvetnick N. // Diabetes. 1997. V. 46. P. 4599–4606.
34. Brown G.R., Silva M.D., Thompson P.A., Beutler B. // Diabetologia. 1998. V. 41. № 12. P. 1502–1510.
35. Gonzalez C., Ménissier De Murcia J., Janiak P., Bidouard J.P., Beauvais C., Karray S., Garchon H.J., Lévi-Strauss M. // Diabetes. 2002. V. 51. № 5. P. 1470–1476.
36. Babaya N., Ikegami H., Fujisawa T., Nojima K., Itoi-Babaya M., Inoue K., Ohno T., Shibata M., Ogiwara T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 328. № 1. P. 158–164.
37. Masutani M., Suzuki H., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K., Watanabe T., Sugimoto T., Nakagama H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 5. P. 2301–2304.
38. Baxter A.G., Duckworth R.C. // Drug Discovery Today. 2004. № 4. P. 451–455.
39. Turk J., Corbett J.A., Ramanadham S., Bohrer A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. V. 197. № 3. P. 1458–1464.
40. Hosokawa M., Doici W., Thorens B. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. V. 289. № 5. P. 1114–1117.
41. Roep B.O., Atkinson M., Herrath M. // Nat. Rev. Immunol. 2004. V. 4. № 12. P. 989–997.
42. Mordes J.P., Bortell R., Blankenhorn E.P., Rossini A.A., Greiner D.L. // ILAR J. 2004. V. 45. № 3. P. 278–291.
43. Mathews C.E., Langley S.H., Leiter E.H. // Transplantation. 2002. V. 73. № 8. P. 1333–1336.
44. Zhou C., Pridgen B., King N., Xu J., Breslow J.L. // J. Lipid Res. 2011. V. 52. № 8. P. 1483–1493.
45. Drel V.R., Pacher P., Stavniichuk R., Xu W., Zhang J., Kuchmerovska T.M., Slusher B., Obrosova I.G. // Int. J. Mol. Med. 2011. № 28. P. 629–635.
46. Cailat-Zucman S., Bach J.F. // Clin. Rev. Allerg. Immunol. 2000. V. 19. № 3. P. 227–246.
47. Vandewalle C.L., Falorni A., Lernmark A., Goubert P., Dorchy H., Coucke W., Semakula C., Van der Auwera B., Kaufman L., Schuit F.C. // Diabetes Care. 1997. V. 20. № 10. P. 1547–1552.
48. Chen H., Zheng C., Zhang X., Li J., Li J., Zheng L., Huang K. // Peptides. 2011. V. 32. № 8. P. 1634–1639.
49. Dufrane D., van Steenberghe M., Guiot Y., Goebbels R.M., Saliez A., Gianello P. // Transplantation. 2006. № 81. P. 36–45.
50. Rackham C.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B., Hauge-Evans A.C., Jones P.M., King A.J. // Diabetologia. 2011. № 54. P. 1127–1135.
51. Jederstrom G., Grasjo J., Nordin A., Sjöholm I., Andersson A. // Diabetes Technol. Ther. 2005. V. 7. № 6. P. 948–957.
52. Kargar C., Ktorza A. // Diabetes Obes. Metab. 2008. № 10 (Suppl. 4). P. 43–53.
53. Deeds M.C., Anderson J.M., Armstrong A.S., Gastineau D.A., Hiddinga H.J., Jahangir A., Eberhardt N.L., Kudva Y.C. // Lab. Anim. 2011. V. 45. № 3. P. 131–140.
54. Makhlof L., Duvivier-Kali V.F., Bonner-Weir S., Dieperink H., Weir G.C., Sayegh M.H. // Transplantation. 2003. V. 76. № 4. P. 657–664.
55. Sheshala R., Peh K.K., Darwis Y. // Drug Dev. Ind. Pharm. 2009. V. 35. № 11. P. 1364–1374.

56. Baeyens L., De B.S., Lardon J., Mfopou J.K., Rooman I., Bouwens L. // *Diabetologia*. 2005. V. 48. № 1. P. 49–57.
57. Arai T., Kaneko H., Takagi H., Ogino T., Sasaki M., Matsu-moto H., Sugawara M. // *Vet. Res. Commun*. 1996. V. 20. № 3. P. 215–224.
58. Yang H., Wrigth J.R. // *Endocrinology*. 2002. V. 143. № 7. P. 2491–2495.
59. Орловский М.А. // *Журн. АМН Украины*. 2006. Т. 12. № 2. С. 255–268.
60. Hayashi K., Kojima R., Ito M. // *Biol. Pharm. Bull*. 2006. V. 29. № 6. P. 1110–1119.
61. Srinivasan K., Ramarao P. // *Indian J. Med. Res*. 2007. V. 125. № 3. P. 451–472.
62. Kromann H., Christy M., Lernmark A., Nedergaard M., Nerup J. // *Diabetologia*. 1982. V. 22. № 3. P. 194–198.
63. Орловский М.А. // *Патология*. 2004. Т. 1. № 1. С. 21–26.
64. Reddy S., Sandler S. // *Autoimmunity*. 1995. V. 22. № 2. P. 121–126.
65. Wright J.R., Abraham C., Dickson B.C. // *Gen. Comp. Endocrinol*. 1999. V. 114. № 3. P. 413–440.
66. El-Seweidy M.M., El-Sweify S.E., Ameen R.S., Hachem R.M. // *Parmacol. Res*. 2000. V. 45. № 5. P. 391–398.
67. Gai W., Schott-Ohly P., Schulte im Walde S., Gleichmann H. // *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 2004. V. 112. № 1. P. 29–37.
68. Sharma B.R., Kim M.S., Rhyu D.Y. // *J. Tradit. Chin. Med*. 2016. V. 36. № 1. P. 71–77.
69. Gu D., Arnuch M., Sawyer S.P., Sarvetnick N. // *Am. J. Physiol*. 1995. V. 269. № 6. P. 1089–1094.
70. Fisher M.M., Perez Chumbiauca C.N., Mather K.J., Mirmira R.G., Tersey S.A. // *Endocrinology*. 2013. V. 154. № 9. P. 3476–3481.
71. Lee J.H., Yang S.H., Oh J.M., Lee M.G. // *J. Pharm. Pharmacol*. 2010. V. 62. № 1. P. 1–23.
72. Szkudelski T. // *Physiol. Res*. 2001. V. 50. № 6. P. 537–546.
73. Lenzen S. // *Diabetologia*. 2008. № 51. P. 216–226.
74. Mythili M.D., Vyas R., Akila G., Gunasekaran S. // *Microsc. Res. Tech*. 2004. V. 63. № 5. P. 274–281.
75. Imai Y., Patel H.R., Hawkins E.J., Doliba N.M., Matschinsky F.M., Ahima R.S. // *Endocrinology*. 2007. V. 148. № 12. P. 5716–5723.
76. Cardinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. // *J. Mol. Endocrinol*. 1999. V. 22. № 1. P. 65–70.
77. Cardinal J.W., Allan D.J., Cameron D.P. // *Endocrinology*. 1998. V. 139. № 6. P. 2885–2891.
78. Bellmann K., Wenz A., Radons J., Burkart V., Kleemann R., Kolb H. // *J. Clin. Invest*. 1995. V. 95. № 6. P. 2840–2845.
79. Burkart V., Blaeser K., Kolb H. // *Horm. Metab. Res*. 1999. V. 31. № 12. P. 641–644.
80. Charron M.J., Bonner-Weir S. // *Nat. Med*. 1999. V. 5. № 3. P. 268–270.
81. Elsner M., Guldbakke B., Tiedge M., Munday R., Lenzen S. // *Diabetologia*. 2000. V. 43. № 12. P. 1528–1533.
82. Dekel Y., Glucksam Y., Elron-Gross I., Margalit R. // *Lab. Anim. (NY)*. 2009. V. 38. № 2. P. 55–60.
83. Lee J.Y., Kim M.J., Moon C.K., Chung J.H. // *Biochem. Pharmacol*. 1993. V. 46. № 11. P. 2111–2113.
84. Wada R., Yagihashi S. // *Virchows Archiv*. 2004. V. 444. № 4. P. 375–382.
85. Heitmeier M.R., Scarim A.L., Corbett J.A. // *J. Biol. Chem*. 1997. V. 272. № 21. P. 13697–13704.
86. Chaudhry Z.Z., Morris D.L., Moss D.R., Sims E.K., Chiong Y., Kono T., Evans-Molina C. // *Lab. Anim*. 2013. V. 47. № 4. P. 257–265.
87. Hussein M.I., Kaye A., Zebadua E., Kandeel F., Ferreri K. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. P. 94591.
88. Akirav E.M., Lebastchi J., Galvan E.M., Henegariu O., Akirav M., Ablamunits V., Lizardi P.M., Herold K.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 47. P. 19018–19023.
89. Yamamoto H., Uchigata Y., Okamoto H. // *Nature*. 1981. V. 294. № 5838. P. 284–286.
90. Simonsson E., Ahreacut B. // *Eur. J. Pharm*. 1998. V. 350. № 2–3. P. 243–250.
91. Stevens R.B., Sutherland D.E., Ansit J.D., Saxena M., Rossini T.J., Levay-Young B.K., Hering B.J., Mills C.D. // *J. Immunol*. 1987. V. 159. № 11. P. 5329–5335.
92. Fisher M.M., Watkins R.A., Blum J., Evans-Molina C., Chalasani N., DiMeglio L.A., Mather K.J., Tersey S.A., Mirmira R.G. // *Diabetes*. 2015. V. 64. № 11. P. 3867–3872.
93. Szkudelski T. // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2012. V. 237. № 5. P. 481–490.
94. Tsuji A., Sakurai H. // *Bioch. Biophys. Res. Commun*. 1998. V. 245. № 1. P. 11–16.
95. Howart F.C., Qureschi A., Shahin A., Lukic M.L. // *Mol. Cell. Biochem*. 2005. V. 269. № 1–2. P. 103–108.
96. Andreone T., Meares G.P., Hughes K.J., Hansen P.A., Corbett J.A. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2012. V. 303. № 2. P. 172–179.
97. Arnush M., Scarim A.L., Heitmeier M.R., Kelly C.B., Corbett J.A. // *J. Immunol*. 1998. V. 160. № 6. P. 2684–2691.
98. Rabinovitch A. // *Diabet. Met*. 1998. V. 14. № 2. P. 129–151.
99. Leiter E.H., von Herrath M. // *Diabetologia*. 2004. V. 47. № 10. P. 1657–1660.
100. Roep B.O., Atkinson M. // *Diabetologia*. 2004. V. 47. № 10. P. 1650–1656.
101. Mestas J., Hughes C.C. // *J. Immunol*. 2004. V. 172. № 5. P. 2731–2738.

УДК 576

Влияние TNF и VEGF на свойства эндотелиальных клеток Ea.hy926 в модели многоклеточных сфероидов

С. Ш. Гапизов^{1,2*}, Л. Е. Петровская¹, Л. Н. Шингарова¹, Е. В. Свирщевская¹, Д. А. Долгих^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: gsultan3@gmail.com

Поступила в редакцию 29.11.2017

Принята к печати 27.02.2018

РЕФЕРАТ Клетки эндотелия играют ключевую роль в развитии воспаления и неоангиогенеза при онкологических и хронических воспалительных заболеваниях. Клетки в составе 3D-культур наиболее приближены к условиям, в которых они находятся в органах и тканях человека при различных патологиях. Поэтому создание модели 3D-культур на основе эндотелиальных клеток линии Ea.hy926 является актуальной задачей клеточной биологии. Впервые показано, что культивирование клеток в статичных условиях на антиадгезивной подложке приводит к образованию сфероидов (3D-культур). Изучена экспрессия ICAM-1 и VEGFR-2, а также продукция цитокинов клетками Ea.hy926, культивируемыми в 2D- и 3D-условиях в присутствии TNF и VEGF. Методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии показано, что TNF как в 2D-, так и в 3D-культурах значительно усиливает экспрессию молекулы клеточной адгезии ICAM-1, но не влияет на уровень VEGFR-2. В спонтанных 3D-культурах наблюдалась повышенная продукция как провоспалительных (IL-8, IL-6, IP-10), так и противовоспалительных (IL-10, TGF- β 1–3) факторов по сравнению с 2D-условиями, что показано как методом проточной цитометрии, так и кПЦР. Под действием TNF в 3D-культурах секреция IL-10, GM-CSF и IL-6 повышается в 11, 4,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с 2D-культурами. Таким образом, использование 3D-культур клеток Ea.hy926 представляется перспективным для изучения эффектов противо- и провоспалительных агентов на клетки эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекула межклеточной адгезии, 2D- и 3D-культуры, рецептор фактора роста эндотелия сосудов-2, фактор некроза опухоли, эндотелиальные клетки.

СОКРАЩЕНИЯ 2D- и 3D-культуры – культивирование клеток на пластике и в объеме соответственно; кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция; ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии; IFN – интерферон гамма; IL – интерлейкин; TNF – фактор некроза опухоли альфа; VCAM-1 – молекула клеточной адгезии сосудов; VEGF A – фактор роста эндотелия сосудов; VEGFR-2 – рецептор фактора роста эндотелия сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Рак и хронические воспалительные заболевания различных органов и тканей человека представляют серьезную медицинскую и социальную проблему. Показано, что ключевую роль в развитии и поддержании воспаления при таких заболеваниях, как ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона и других, играет фактор некроза опухоли альфа (TNF) [1, 2]. Как воспалительный процесс, так и опухолевый рост сопровождаются гипоксией тканей, что приводит к образованию новых кровеносных сосудов под дей-

ствием фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), секретируемого клетками эпителия в условиях гипоксии [3, 4]. Известно, что в сосудах опухоли значительно повышен уровень экспрессии интегрин $\alpha\beta 3$ клетками эндотелия [5]. Показано, что TNF и VEGF стимулируют экспрессию молекул адгезии и воспаления на клетках эндотелия, в частности, ICAM-1 и VCAM-1, рецептора 2 фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR-2), PECAM-1, P- и E-селектинов, выход фактора Виллебранда из телец Вейбла – Паладе, а также усиливают секрецию цитокинов

IL-6, IL-8, фактора хемотаксиса моноцитов 1 (MCP-1) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) [6–11]. Изменение экспрессии поверхностных белков эндотелия обеспечивает торможение лейкоцитов в участках воспаления, их адгезию и трансэндотелиальную миграцию [12]. Ответ *in vitro* соответствует процессам, происходящим *in vivo* под действием провоспалительных стимулов, что позволяет использовать культуру клеток эндотелия для моделирования процессов воспаления в целом организме.

Использование терапевтических средств, направленных на подавление роста сосудов, частично тормозит патологический процесс. В частности, разработаны и применяются в клинике антитела к VEGF (Бевацизумаб) и низкомолекулярный ингибитор VEGF (Афлиберцепт), антитела к TNF (Адалimumаб, Инфликсимаб и Этанерцепт), ряд антител к интегринам, таких, как Ведолизумаб и антитела к $\alpha 4\beta 7$ -интегрину [13–15]. На стадии клинических испытаний находятся ингибитор $\alpha \nu \beta 3$ -интегрин Циденгитид, антитела Этарацизумаб и другие препараты [16–18]. Недостатком низкомолекулярных препаратов является достаточно быстро формирующаяся у больного резистентность к ним [19]. Антитела также обладают рядом недостатков, в частности, высокая стоимость производства рекомбинантных гуманизированных антител ограничивает число больных, которым доступен такой вид терапии. С другой стороны, антитела имеют большую молекулярную массу, препятствующую глубокому проникновению в ткани [19, 20].

Разработка аналогов антител и создание иммуноконъюгатов с противоопухолевыми препаратами и/или ингибиторами роста сосудов на их основе позволяют усовершенствовать терапию онкологических и хронических воспалительных заболеваний, а также расширить круг больных, получающих адекватную терапию [19]. Для первичного скрининга новых препаратов требуется клеточная модель *in vitro*, свойства которой максимально приближены к условиям *in vivo*. В настоящее время взаимодействие противовоспалительных препаратов с эндотелиальными клетками анализируют с использованием первичных культур, полученных из пуповинной вены здоровых доноров (HUVES, human umbilical vein endothelial cells) или гибридную линию Ea.hy926 [21–23]. Предпочтительным является использование стабильной линии, так как функциональные характеристики HUVES могут зависеть от качества выделения клеток и от донора; кроме того, донорские клетки не всегда доступны, а количество пассажей первичных клеток ограничено [24]. Функциональные характеристики HUVES и Ea.hy926 во многом совпадают, в частности, оба типа клеток отвечают измене-

нием экспрессии молекул адгезии и продукцией IL-6 и IL-8 под действием TNF [25–27].

В организме мелкие сосуды и капилляры состоят преимущественно из эндотелиоцитов; в более крупных сосудах стенка формируется эндотелиальными клетками, соединительной тканью и гладкими мышцами. Монокультура эндотелиальных клеток во многом моделирует структуру капилляров, при этом использование многоклеточных сфероидов эндотелиальных клеток позволяет изучить эффекты различных препаратов не только на эндотелиальные клетки, но и на их ассоциаты с соединительным матриксом, формируемым в 3D-культурах [28–31]. Ранее предпринимались попытки получения 3D-культур эндотелиальных клеток методом клиностатирования [32–35]. Этот метод основан на вращении культуры клеток в гравитационном поле, что приводит к формированию сфероидов на поверхности монослойной культуры. Целью данной работы была разработка статичной модели 3D-культур эндотелиальных клеток линии Ea.hy926 и сравнительное изучение ответа на TNF и VEGF в 2D- и 3D-культурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Bio-Rad (США), Sigma (США), Merck (США), Panreac (Испания), «ПанЭко» (Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ. Использовали рекомбинантные белки TNF (получен в лаборатории инженерии белка ИБХ РАН) и VEGFA165 (Protein Synthesis, Россия).

Клеточные культуры

В работе использовали клеточную линию человека Ea.hy926 эндотелиального происхождения (ATCC, CRL-2922), предоставленную А.А. Соколовской (НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН) с разрешения Dr. C.-J. Edgell (University of North Carolina). Клетки инкубировали в среде DMEM/F12 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% инактивированной бычьей фетальной сыворотки (HyClon, США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко»). Для формирования трехмерных культур поверхность лунок 24-луночного планшета (Costar) покрывали поли-2-гидроксиэтилметакрилатом (pHEMA) (Sigma). В каждую лунку высевали по 500×10^3 клеток в 1 мл ростовой среды. Клетки культивировали в стандартных условиях в CO_2 -инкубаторе в течение 48 ч до формирования конфлюэнтного монослоя (2D-культуры) или сфероидов (3D-культуры).

Конфокальная микроскопия

Для анализа экспрессии молекул поверхностной адгезии на 2D-культурах эндотелиальных кле-

ток в шестилуночные планшеты вкладывали стерильные покровные стекла, на которые наносили 100×10^3 клеток в 200 мкл среды и инкубировали в течение 16 ч в CO_2 -инкубаторе в стандартных условиях для получения конфлюэнтного монослоя. Для анализа 3D-культур клеток Ea.hy926 сфероиды пипетировали и переносили в лунки 96-луночного планшета. Рекомбинантные белки TNF или VEGFA добавляли в культуру в концентрации 25 нг/мл и инкубировали в течение 5 ч. Клетки окрашивали с использованием моноклональных антител мыши к ICAM-1 человека (CD56) и VEGFR-2 (Flk-1), а также вторичные антитела к IgG мыши, меченные CFL488 (Santa Cruz Biotechnology, США) или Alexa Fluor 555 (Invitrogen, США). Антитела добавляли в концентрации 0.2 мкг/мл на 1 ч. Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе при вращении 40 об/мин. Ядра клеток окрашивали Hoechst 33342 (Sigma). По окончании инкубации 2D- и 3D-культуры фиксировали 1% параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре и промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). После фиксации клетки отмывали от первичных антител и инкубировали с вторичными антителами в ФСБ (разведение 1 : 1000) в течение 40 мин при 37°C. После отмывки клетки полимеризовали при помощи среды Mowiol 4.88 (Calbiochem, Германия) на предметных стеклах и оставляли на ночь при комнатной температуре. Изображения получали и анализировали с помощью конфокального микроскопа Nikon Eclipse TE2000-E (Япония).

Проточная цитофлуориметрия

Экспрессию поверхностных молекул ICAM-1 и VEGFR-2 во всех образцах оценивали с помо-

щью проточного цитофлуориметра FACScan (BD, США). Для получения суспензии клетки из 2D- и 3D-культур обрабатывали раствором трипсин/EDTA («ПанЭко»), отмывали в ФСБ с 1% бычьим сывороточным альбумином и 0.05% NaN_3 (ФСБА), добавляли антитела соответствующей специфичности и инкубировали в течение 60 мин при 4°C в темноте. После отмывки клетки окрашивали вторичными флуоресцентно мечеными антителами (60 мин, 4°C в темноте). Перед анализом в образцы добавляли пропидий йодид (0.5 мкг/мл) для дифференциального окрашивания мертвых клеток. В каждой пробе анализировали 10000 клеток. Результаты обрабатывали в программе WinMDI 2.9.

Продукция гуморальных факторов

Продукцию цитокинов и хемокинов клетками Ea.hy926, культивируемыми в 2D- и 3D-условиях, анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии с использованием микрочастиц по протоколу производителя (BioRad, США) на приборе FACS Calibur (BD, США).

Количественная ПЦР (кПЦР)

Суммарную мРНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) и очищали от примеси ДНК обработкой ДНКазой I (Fermentas, США). Синтез кДНК проводили с использованием набора First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, США). Концентрацию мРНК и кДНК определяли с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени (кПЦР) со специфическими праймерами (табл. 1) [36] и смесью qPCRMix-HS SYBR («Евроген»,

Таблица 1. Праймеры, использованные в кПЦР [36]

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Размер ампликона, п.н.	$T_{пл}$, °C
β-актин	BAf	TCATGTTTGAGACSTTCAACAC	512	55
	BAr	GTCTTTGCGGATGTCCACG		
GM-CSF	GMf	CTGCTGCTGAGATGAATGAAACAG	195	55
	GMr	GCACAGGAAGTTTCCGGGGT		
ICAM-1	ICAMf	ACCATGGAGCCAATTTCTC	590	51
	ICAMr	ACAATCCCTCTCGTCCAG		
IL-6	IL6d	GATGCAATAACCACCCCTGACCC	173	52
	IL6r	CAATCTGAGGTGCCCATGCTAC		
VEGFR-2	VEGFR2f	ATGCTCAGCAGGATGGCAA	320	53
	VEGFR2r	TTTGGTTCTGTCTTCCAAAGT		

Россия) на приборе Lightcycler 480 (Roche, США). Реакционная смесь включала 50 нг кДНК, праймеры (0.120 мкМ на образец), смесь qPCRmix-HS SYBR (5x) и воду MilliQ. Температуру отжига подбирали в соответствии с температурой плавления праймеров. Обработку результатов осуществляли последовательно в программах Convert Light-Cycler 480 и LineRegPCR. Экспрессию каждого гена анализировали в трех повторностях.

Статистика

Полученные данные анализировали параметрическими методами с помощью программы Excel; для цитометрических данных использовали программу Cell Quest. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия молекул адгезии клетками Ea.hy926 в 2D- и 3D-культурах

В норме клетки эндотелия, выстилающие сосуды, соединены между собой молекулами адгезии ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 и рядом других, связанных с молекулами актина, что обеспечивает быструю перестройку цитоскелета, необходимую для экстравазации лейкоцитов в ткани при воспалении [6]. В отличие от эндотелиальных клеток, эпителиальные клетки соединены более плотными кадгеринowymi контактами, которые связаны с кератиновыми филаментами цитоскелета. Эпителиальные клетки формируют 3D-культуры разной степени плотности, что зависит от количества кадгеринowych контактов [37]. Ранее не было попыток получить 3D-культуры эндотелиальных клеток, аналогичных культурам эпителиальных клеток. Клиностазированные культуры, в ряде статей называемые 3D-культурами, представляют собой монослойные культуры, выращиваемые при вращении в гравитационном поле [32–35]. При культивировании в течение 5–6 дней на поверхности монослоя появляются сфероиды, которые используют для анализа [33]. Однако при таком длительном культивировании нельзя оценить эффекты быстродействующих факторов, например TNF.

В данной работе клетки Ea.hy926 культивировали на антиадгезивной подложке рНЕМА, в результате чего в течение 18 ч формировались кластеры клеток размером 200–400 мкм, неразбиваемые при пипетировании (рис. 1Б), что подтверждает формирование межклеточных контактов по всей поверхности клетки. В 2D-культуре клетки формируют плотный монослой, в котором клетки образуют контакты только по периметру (рис. 1А). Конфокальный анализ

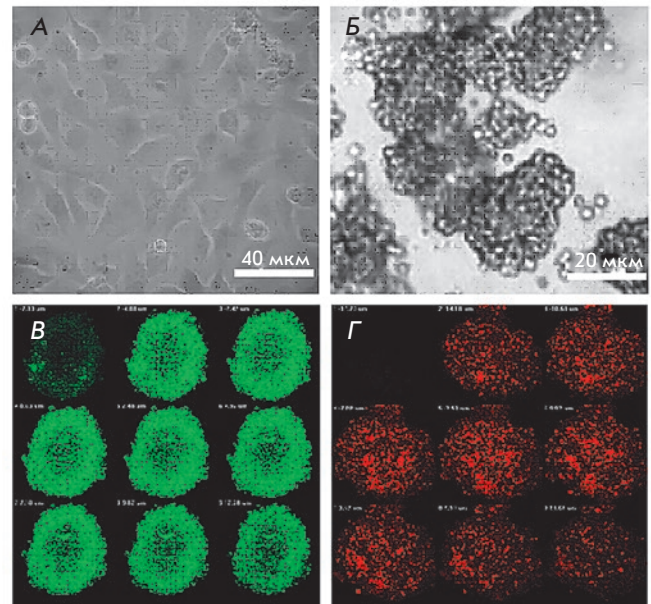


Рис. 1. Морфология клеток Ea.hy926 в 2D- и 3D-условиях культивирования. Клетки Ea.hy926 через 48 ч после переноса в планшет для клеточных культур (А) или в планшет с антиадгезивным покрытием рНЕМА (Б), световой микроскоп. Z-стеки 3D-культур, окрашенных антителами к ICAM-1 (В, зеленый) и VEGFR-2 (Г, красный), полученные методом конфокальной микроскопии

3D-культур выявил различный уровень экспрессии молекул адгезии в зависимости от расположения клеток в культуре. Так, в 3D-культурах Ea.hy926 уровень экспрессии ICAM-1 выше в клетках поверхностного слоя (рис. 1В), в то время как VEGFR-2 равномерно экспрессируется всеми клетками сфероиды (рис. 1Г). Снижение экспрессии молекул адгезии внутри сфероиды связано с формированием иерархии клеток. Наличие адгезионных контактов по всей поверхности клетки снижает экспрессию молекул адгезии – клетка находится в равновесном состоянии. На поверхности сфероиды клетки имеют контакт с нижним слоем и не имеют контактов на поверхности, что стимулирует экспрессию молекул адгезии и имитирует репарацию повреждения в эпителиальных тканях. VEGFR-2, в отличие от ICAM-1, экспрессируется равномерно по всему объему сфероиды. Таким образом, показано, что эндотелиальные клетки, подобно эпителиальным, способны формировать сфероиды с внутренней иерархией в статичных культурах.

Ранее в экспериментах с клиностазированными культурами Ea.hy926 выявили различия в экспрес-

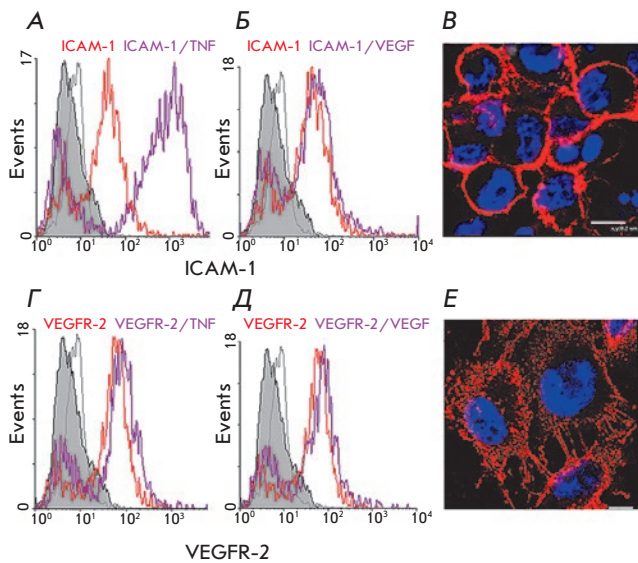


Рис. 2. Анализ экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках линии Ea.hy926 под действием TNF и VEGFA методами конфокальной микроскопии и проточной цитометрии. А, Б, Г, Д – по оси абсцисс отложена средняя интенсивность флуоресценции, по оси ординат количество событий. Клетки Ea.hy926 выращивали в 2D-условиях до достижения монослоя, в течение последних 5 ч культивирования добавляли 25 нг/мл TNF (А и Г) или 25 нг/мл VEGF (Б и Д). Экспрессия клетками определенных белков отображается в виде пиков флуоресценции антител, связанных с белками. Пик, обозначенный сплошным серым цветом, – неокрашенные клетки; клетки со вторичными антителами – серая линия (отрицательный контроль); неактивированные клетки, окрашенные специфическими антителами, – красная линия; клетки, окрашенные специфическими антителами, после стимуляции факторами – фиолетовая линия. В и Е – репрезентативные конфокальные изображения клеток, окрашенных антителами к ICAM-1 (В, красный) и VEGFR-2 (Е, красный). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий). Длина мерного отрезка – 5–8 мкм

сии молекул адгезии, а также в спонтанной и TNF-индуцированной продукции цитокинов, причем обнаружено как подавление [38], так и стимуляция продукции ряда белков [39]. Экспрессию молекул адгезии в статичных 2D- и 3D-культурах Ea.hy926 в ответ на активацию TNF и VEGF анализировали, используя предварительно подобранные условия активации клеток. Методом проточной цитометрии анализировали экспрессию ICAM-1, VEGFR-2, интегрин $\alpha\beta 3$ и VCAM-1 в 2D-культуре под действием TNF и VEGF как в ранних культурах (24 ч инкубации), так и в «старых» (72–96 ч инкубации). Кроме того, изучали динамику изменения экспрессии поверхностных молекул под действием факторов. Изменения экспрессии интегрин $\alpha\beta 3$ и VCAM-1 не наблюдали (данные не приведены). VEGF также не оказывал стимулирующего действия ни на одну из молекул адгезии. Соответственно в дальнейшем изучали эффект TNF. Установлено, что наиболее эффективно TNF действует на ранние культуры (18–24 ч), причем быстро и с максимумом через 2–10 ч после добавления TNF с последующим снижением до значений в контроле через 24–36 ч. Показано, что через 5 ч после добавления TNF экспрессия ICAM-1 на ранних культурах увеличивается в 13 раз, а экспрессия VEGFR-2 практически не меняется (рис. 2, табл. 2). На рис. 2 приведены полученные методом конфокальной микроскопии микрофотографии 2D-культур, окрашенных антителами к ICAM-1 и VEGFR-2 (рис. 2В,Е), показывающие характерную мембранную локализацию этих молекул.

Сравнительные данные по экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 под действием TNF и VEGF для 2D- и 3D-культур Ea.hy926 приведены на рис. 3. Показано, что в 3D-культурах формируется более гомогенный пул клеток. Так, в 2D-культурах 10–20% клеток не экспрессируют молекул адгезии (пик в зоне аутофлуоресценции), а в 3D-культурах

Таблица 2. Влияние TNF и VEGF на экспрессию ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках Ea.hy926 в 2D- и 3D-культурах

Культура	Экспрессия	Контроль	TNF	p	VEGF	p
2D	ICAM-1	49 ± 11	862 ± 148*	< 0.001	57 ± 14	> 0.05
3D	ICAM-1	70 ± 15	630 ± 93	< 0.001	63 ± 14	> 0.05
2D	VEGFR-2	59 ± 11	71 ± 18	> 0.05	67 ± 16	> 0.05
3D	VEGFR-2	32 ± 8**	35 ± 8**	> 0.05	28 ± 7**	> 0.05

Данные приведены в относительных единицах флуоресценции.

*TNF и VEGF добавляли в концентрации 25 нг/мл в течение последних 5 ч инкубации. Экспрессию оценивали методом проточной цитометрии. Жирным шрифтом отмечен эффект статистически значимого повышения экспрессии под действием TNF по сравнению с контролем.

**Статистически значимое снижение экспрессии VEGFR-2 в 3D по сравнению с 2D.

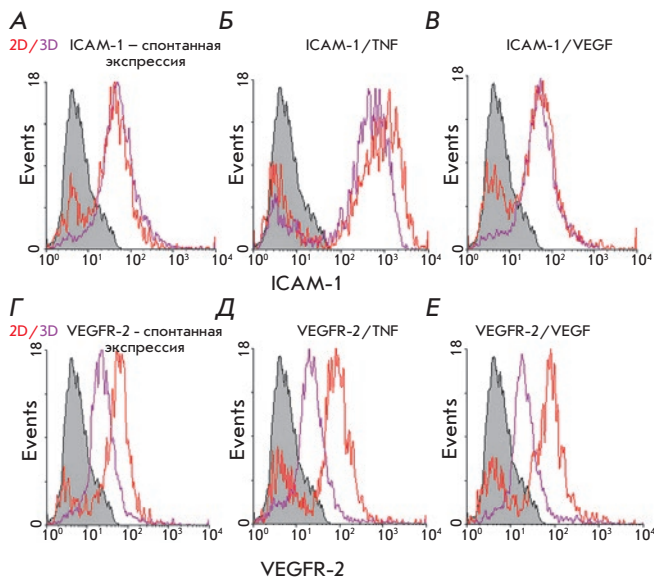


Рис. 3. Сравнение экспрессии ICAM-1 и VEGFR-2 на клетках линии Ea.hy926, культивируемых в 2D- и 3D-условиях, под действием TNF и VEGFA методом проточной цитометрии. По оси абсцисс отложена средняя интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество событий. Клетки Ea.hy926 выращивали в 2D- или 3D-условиях в течение 3 сут и окрашивали антителами к ICAM-1 (А–В) или VEGFR-2 (Г–Е). В культуры добавляли в течение последних 5 ч 25 нг/мл TNF (Б, Д) или 25 нг/мл VEGF (В, Е). Сплошным серым цветом показан пик аутофлуоресценции неокрашенных клеток, красной линией – 2D-культуры, окрашенные специфическими антителами, фиолетовой – 3D-культуры, окрашенные таким же образом

это значение значительно меньше (0–5%). В отличие от ICAM-1 спонтанная экспрессия VEGFR-2 в 3D-культурах снижается в 2 раза, несмотря на отсутствие первого пика (табл. 2, рис. 3Г). Во всех 3D-культурах экспрессия VEGFR-2 была статистически значимо ниже, чем в 2D-условиях культивирования, что показывает роль контактных взаимодействий в экспрессии VEGFR-2 клетками Ea.hy926.

Экспрессия ICAM-1 как в 3D-, так и в 2D-культурах усиливалась под действием TNF, но повышение было менее выраженным, чем в 2D-культурах (в 7 и 11 раз соответственно). При этом появлялась негативная популяция, как и во всех 2D-культурах (рис. 3Б). VEGF не влиял на экспрессию молекул адгезии в 3D-культурах.

В целом влияние различных факторов на уровень экспрессии молекул адгезии в 3D-культурах было незначительным по сравнению с влиянием на 2D-культуры.

Продукция цитокинов клетками Ea.hy926 в 2D- и 3D-культурах

Один из показателей активации эндотелиальных клеток – продукция ими гуморальных факторов: цитокинов, хемокинов, ростовых факторов. Поскольку изменения уровня экспрессии молекул адгезии под действием VEGF не было обнаружено, продукцию цитокинов в 2D- и 3D-культурах анализировали только в присутствии TNF. Определяли продукцию 11 факторов, включая IL-2, -4, -6, -8, -10, GM-CSF, IFN- γ , трансформирующие факторы роста бета (TGF- β) 1–3 и хемокин IP-10. Обнаружено, что в отсутствие TNF клетки Ea.hy926 продуцировали существенное количество только IL-8 (13.4 нг/мл) и TGF- β 1 (7.5 нг/мл), причем продукция в 3D-культурах была значимо выше (в 2–3 раза) (рис. 4А,Б). Под действием TNF продукция IL-8 в 2D-культурах (19 нг/мл) возрастала до спонтанного уровня в 3D-культурах (22 нг/мл) и не изменялась в самих 3D-культурах (рис. 4В,Г). Обработка TNF приводила к продукции цитокинов, сравнимой в 2D и 3D-культурах, которая убывала в ряду IL-6 > IL-10 > IL-2 > IFN- γ > IL-4 (рис. 4В,Г). Отношение спонтанной и индуцированной TNF продукции 3D/2D приведено на рис. 4Д,Е. Спонтанные 3D-культуры продуцировали статистически значимо больше (в 2–5 раз) IL-8, IL-6, IL-10, TGF- β 1–3, IP-10, при этом в них практически отсутствовали (ниже порога чувствительности метода в 2D-культурах) IL-2, IL-4, IFN- γ , GM-CSF (рис. 4Д). В TNF-стимулированных культурах основное различие заключалось в продукции GM-CSF и IL-10 (рис. 4Е). Секретция IL-10 3D-культурами увеличилась в 11 раз, GM-CSF в 4.7 раза, IL-6 в 1.6 раза по сравнению с 2D-культурами. В то же время в 3D-культурах уменьшилась секреция IL-4 в 2 раза, IFN- γ в 1.4 раза, TGF- β 2 и TGF- β 3 в 1.6 раза по сравнению с 2D-культурами (рис. 4Е).

Сравнение синтеза мРНК и белков клетками Ea.hy926 в 2D- и 3D-культурах

Анализ ранних событий в культурах Ea.hy926 после активации TNF оценивали по экспрессии генов ICAM-1, VEGFR-2, GM-CSF и IL-6 с помощью кПЦР. Данные по кПЦР нормированы по экспрессии мРНК актина и приведены в виде значений относительной экспрессии генов (ОЭГ), которая подсчитана по формуле $OЭГ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [40]. Использование этого метода позволяет оценить, во сколько раз изменилось количество копий гена в 2D- и 3D-культурах, активированных TNF, по сравнению с контролем (рис. 5А). Можно также сравнить экспрессию гена в 3D- и 2D-условиях в присутствии TNF и без него (рис. 5В). На рис. 5 приведены результаты сравнения экспрессии VEGFR-2 и ICAM-1 в культурах

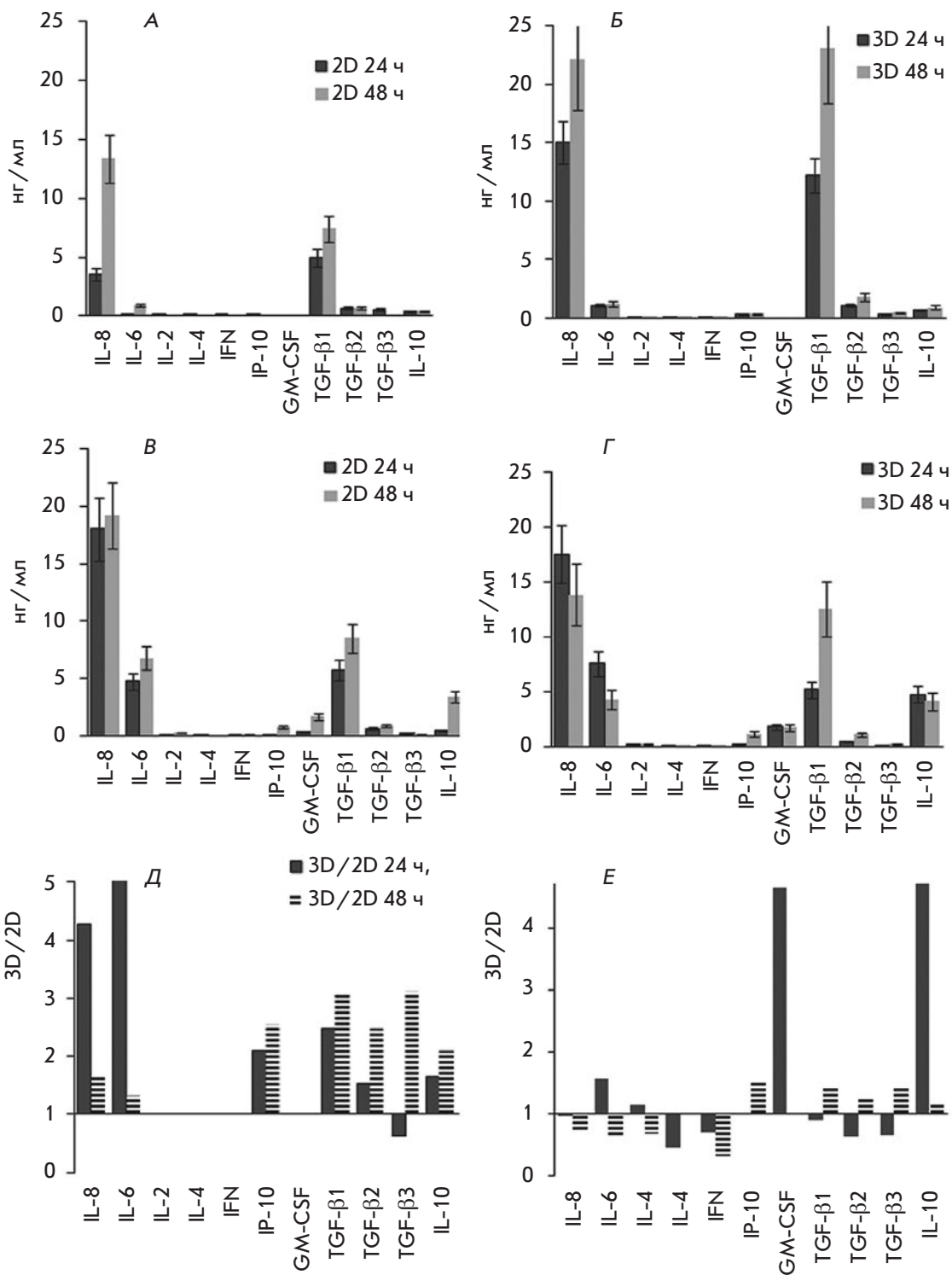


Рис. 4. Продукция гуморальных факторов клетками Ea.hy926, культивируемых в 2D- и 3D-условиях. Клетки Ea.hy926 культивировали в 24-луночных планшетах до достижения адгезии или на антиадгезивной подложке для формирования 3D-культур, после этого в среду добавляли 25 нг/мл TNF. Супернатанты собирали через 24 и 48 ч после добавления TNF. Продукция растворимых факторов в 2D- (А и В) или в 3D- (Б и Г) культурах без активации (А и Б) и после активации TNF (В и Г). Отношение концентрации факторов в культурах 3D/2D без стимуляции (Д), после добавления TNF (Е). Концентрацию определяли методом проточной цитометрии с использованием микрочастиц по протоколу производителя (BioRad) с использованием калибровочных кривых

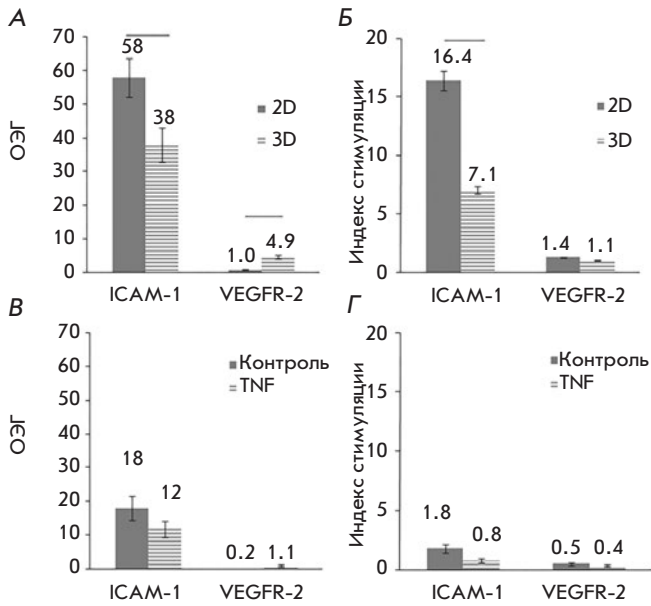


Рис. 5. Анализ экспрессии VEGFR-2 и ICAM-1 в культурах клеток Ea.hu926 без добавления и после добавления TNF методами кПЦР и проточной цитометрии. Клетки Ea.hu926 выращивали в 2D- (А и Б) и 3D- (В и Г) условиях в течение 18 ч для формирования монослоя или сфероидов, после чего добавляли 25 нг /мл TNF. Через 5 ч часть культур использовали для получения мРНК, синтеза кДНК и кПЦР (А и В). Параллельные культуры инкубировали в течение 36 ч и анализировали методом проточной цитометрии после окрашивания антителами к VEGFR-2 и ICAM-1 (Б и Г). Статистически значимая разница (< 0.05) обозначена планками. Данные представлены в виде относительной экспрессии генов (ОЭГ) (А и В). ОЭГ подсчитывали по формуле $OЭГ = 2^{-ddCt}$ [40], где сравнивали 2D-культуры с TNF против контроля без TNF и 3D-культуры с TNF против контроля без TNF (А). Таким же образом сравнивали 3D с 2D в присутствии TNF и без него (В). Цитометрические данные представлены как отношение MFI в культуре с TNF к контролю без TNF (Б) или в 3D-культуре к 2D-культуре (Г)

клеток Ea.hu926 без стимуляции и после стимуляции TNF в течение 5 ч методами кПЦР (рис. 5А,В) и проточной цитометрии (рис. 5Б,Г). Под действием TNF значительно повышался синтез мРНК ICAM-1 как в 2D-, так и в 3D-культурах (рис. 5А), что коррелировало с данными проточной цитометрии (рис. 5Б). Эффект TNF был ниже в 3D-культурах. Что касается экспрессии VEGFR-2, то по данным кПЦР она усиливалась, незначительно, но достоверно (рис. 5В), при этом уровень белка, оцененный цитометриче-

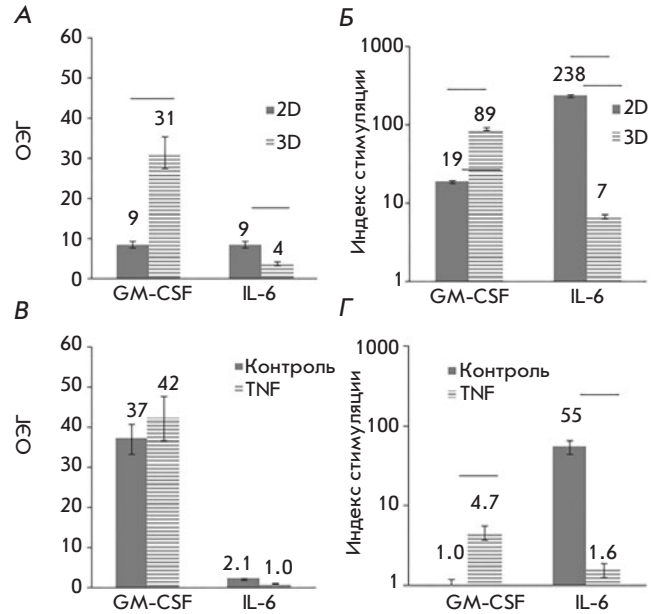


Рис. 6. Анализ продукции GM-CSF и IL-6 в культурах клеток Ea.hu926 без добавления и после добавления TNF методами кПЦР и проточной цитометрии. Культивирование и анализ результатов такие же, как в рис. 5

ским методом, не менялся. Различие данных может быть связано с неоптимальными условиями проведения кПЦР (различная длина праймеров, табл. 1). В любом случае влияние TNF на экспрессию гена ICAM-1 было существенно большим, чем на VEGFR-2.

Аналогичным образом анализировали экспрессию генов GM-CSF и IL-6. РНК выделяли через 5 ч после добавления TNF. Для анализа синтеза белков использовали параллельные культуры, надосадов собирали через 30 ч после активации TNF.

На рис. 6 приведены результаты определения уровня спонтанного и TNF-индуцированного синтеза мРНК и продукции белков GM-CSF и IL-6. Под действием TNF усиливался как синтез мРНК, так и продукция обоих белков. Стимуляция GM-CSF была более выражена в 3D-, а IL-6 – в 2D-культурах (рис. 6А,Б). Сравнение эффективности синтеза мРНК и белков в 2D- и 3D-культурах не выявило различий в уровне экспрессии генов (рис. 6В). Спонтанная продукция GM-CSF была одинаковой в 2D- и 3D-условиях, тогда как в 3D-культурах продукция IL-6 была значительно выше. При стимуляции TNF различия снижались, и в 3D-культурах наблюдалась большая продукция как GM-CSF, так и IL-6 (рис. 6Г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые показано, что культивирование клеток эндотелиального типа Ea.hy926 возможно в статических условиях на антиадгезивной подложке. В спонтанных культурах Ea.hy926 в 3D-условиях продукция как провоспалительных, так и противовоспалительных факторов повышена по сравнению с 2D-условиями, что позволяет проводить более детальный анализ при тестировании новых терапевтических агентов. Активация TNF сходным образом влияет на клетки Ea.hy926, культивируемые в 2D- или 3D-условиях, за исключением усиления в 4–5 раз продукции GM-CSF и IL-10 в 3D-культурах. Наиболее характерными маркерами клеток Ea.hy926 являются молекула адгезии ICAM-1 и растворимые факторы IL-6, IL-8, TGF- β 1, IL-10. 3D-культуры удобны для манипуляций, их можно переносить в новые планшеты, например 96-луночные, что позволяет изучать панель препаратов в разных разведении-

ях. Для анализа методом конфокальной микроскопии не требуется выращивания клеток на предметных стеклах. Все это делает 3D-культуру клеток Ea.hy926 удобной для скрининга новых противовоспалительных и ангиостатических препаратов. ●

Авторы выражают благодарность сотруднице лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН С.А. Кондратьевой за помощь в обработке данных кПЦР.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ Российской Федерации НШ-8384.2016.4 и гранта по программе «УМНИК» Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Astrakhantseva IV., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. // *Biochemistry*. 2014. V. 79. № 12. P. 1308–1321.
2. Petrovskaya L.E., Shingarova L.N., Kryukova E.A., Boldyreva E.F., Yakimov S.A., Guryanova S.V., Novoseletsky V.N., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Biochemistry*. 2012. V. 77. № 1. P. 79–89.
3. Arjamaa O., Aaltonen V., Piippo N., Csont T., Petrovski G., Kaarniranta K., Kauppinen A. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2017. Doi: 10.1007/s00417-017-3711-0
4. Song H., Kim Y., Cho H., Kim S., Kang M., Kim J., Min H., Kang J., Yoon J., Kim C. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2017. Doi: 10.1165/rcmb.2016-0080OC
5. Bauer K., Mierke C., Behrens J. // *Int. J. Cancer*. 2007. V. 121. № 9. P. 1910–1918.
6. Pober J.S., Sessa W.C. // *Nat. Rev. Immunol.* 2007. V. 7. P. 803–815.
7. Bouis D., Hospers G.A., Meijer C., Molema G., Mulder N.H. // *Angiogenesis*. 2001. V. 4. № 2. P. 91–102.
8. Cervenak L., Morbidelli L., Donati D., Donnini S., Kambayashi T., Wilson J.L., Axelson H., Castañios-Velez E., Ljunggren H.G., Malefyt R.D. // *Blood*. 2000. V. 96. № 7. P. 2568–2573.
9. Meager A. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999. V. 10. № 1. P. 27–39.
10. Galley H.F., Blaylock M.G., Dubbels A.M., Webster N.R. // *Cell Biol. Internat.* 2000. V. 24. № 2. P. 91–99.
11. Melder R.J., Koenig G.C., Witwer B.P., Safabakhsh N., Munn L.L., Jain R.K. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. № 9. P. 992–997.
12. Madri J.A., Graesser D., Haas T. // *Biochem. Cell Biol.* 1996. V. 74. № 6. P. 749–757.
13. Moens S., Goveia J., Stapor P., Cantelmo A., Carmeliet P. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014. V. 25. № 4. P. 473–482.
14. Komaki Y., Yamada A., Komaki F., Kudaravalli P., Micic D., Ido A., Sakuraba A. // *J. Autoimmunity*. 2017. V. 79. P. 4–16.
15. Bergqvist V., Hertervig E., Gedeon P., Kopjar M., Griph H., Kinhult S., Carneiro A., Marsal J. // *Cancer Immunol. Immunotherapy*. 2017. V. 66. № 5. P. 581–592.
16. Manegold C., Vansteenkiste J., Cardenal F., Schuette W., Woll P., Ulsperger E., Kerber A., Eckmayr J., von Pawel J. // *Invest. New Drugs*. 2013. V. 31. № 1. P. 175–182.
17. Hersey P., Sosman J., O'Day S., Richards J., Bedikian A., Gonzalez R., Sharfman W., Weber R., Logan T., Buzoianu M., et al. // *Cancer*. 2010. V. 116. № 6. P. 1526–1534.
18. Liu Y., Goswami R., Liu C., Sinha S. // *Mol. Pharm.* 2015. V. 12. № 7. P. 2544–2550.
19. Deyev S., Lebedenko E., Petrovskaya L., Dolgikh D., Gabibov A., Kirpichnikov M. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
20. Gebauer M., Skerra A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009. V. 13. № 3. P. 245–255.
21. Oost B.A., Edgell C.-J.S., Hay C.W., MacGillivray R.T.-A. // *Biochem. Cell Biol.* 1986. V. 64. № 7. P. 699–705.
22. Edgell C.-J., McDonald C.C., Graham J.B. // *Cell Biology*. 1983. V. 80. № 12. P. 3734–3737.
23. Bauer J., Marcolis M., Schreiner C., Edgell C.-J., Azizkhan J., Lazarowski E., Juliano R.L. // *J. Cell. Physiol.* 1992. V. 153. № 3. P. 437–449.
24. Heiss M., Hellstrom M., Kalen M., May T., Weber H., Hecker M., Augustin H., Korff T. // *FASEB J.* 2015. V. 29. № 7. P. 3076–3084.
25. Щегловитова О.Н., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Баба-янец А.А., Фролова И.С., Капкаева М.Р. // *Вест. РАМН*. 2014. V. 3. № 4. P. 31–35.
26. Riesbeck K., Billström A., Tordsson J., Brodin T., Kristensson K., Dohlsten M. // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998. V. 5. № 5. P. 675–682.
27. Chao C., Lii C., Tsai I., Li C., Liu K., Tsai C., Chen H. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5263–5271.
28. Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. // *J. Biotechnol.* 2010. V. 148. P. 3–15.
29. Fennema E., Rivron N., Rouwkema J., Blitterswijk C., Boer J. // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. № 2. P. 108–115.
30. Page H., Flood P., Reynaud E.G. // *Cell Tissue Res.* 2013. V. 352. P. 123–131.

31. Breslin S., O'Driscoll L. // *Drug Discovery Today*. 2013. V. 18. № 5–6. P. 240–249.
32. Ma X., Sickmann A., Pietsch J., Wildgruber R., Weber G., Infanger M., Bauer J., Grimm D. // *Proteomics*. 2014. V. 14. № 6. P. 689–698.
33. Ma X., Wehland M., Schulz H., Saar K., Hübner N., Infanger M., Bauer J., Grimm D. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. 1–10.
34. Sokolovskaya A.A., Ignashkova T.I., Bochenkova A.V., Moskovtsev A.A., Baranov V.M., Kubatiev A.A. // *Acta Astronautica*. 2014. V. 99. P. 16–23.
35. Grimm D., Bauer J., Ulbrich C., Westphal K., Wehland M., Infanger M., Aleshcheva G., Pietsch J., Ghardi M., Beck M., et al. // *Tissue Engineering: Part A*. 2010. V. 16. № 5. P. 1559–1573.
36. Unger R.E., Krump-Konvalinkova V., Peters K., Kirkpatrick C.J. // *Microvascular Res*. 2002. V. 64. P. 384–397.
37. Kim J.B. // *Semin. Cancer Biol*. 2005. V. 15. № 5. P. 365–377.
38. Griffoni C., Di Molfetta S., Fantozzi L., Zanetti C., Pippia P., Tomasi V., Spisni E. // *J. Cell Biochem*. 2011. V. 112. № 1. P. 265–272.
39. Sanchez-Bustamante C., Kelm J-M., Mitta B., Fussenegger M. // *Biotechnol. Bioeng*. 2006. V. 93. № 1. P. 169–180.
40. Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.

УДК 577.218

Псевдоген *PTENP1*, в отличие от гена *PTEN*, метилирован в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия женщин среднего и пожилого возраста

Т. Ф. Коваленко¹, К. В. Морозова², Л. А. Озолина², И. А. Лапина², Л. И. Патрушев^{1*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

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

Поступила в редакцию 09.03.2017

Принята к печати 03.10.2017

РЕФЕРАТ Опухолевый супрессор *PTEN* контролирует многие клеточные функции, включая клеточный цикл, апоптоз, старение, транскрипцию и трансляцию мРНК многих генов. В клетках различных опухолей *PTEN* часто инактивируется генетическими мутациями и эпимутациями. В данной работе изучено метилирование гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1* как возможного генетического маркера гиперплазий (ГЭ) и рака (РЭ) эндометрия. Метилирование 5'-концевых участков *PTEN* и *PTENP1* анализировали с помощью метилчувствительной ПЦР в геномной ДНК, выделенной из тканей 57 злокачественных опухолей и 43 гиперплазий эндометрия, нормальных тканей 24 женщин в возрасте 17–34 лет и 19 женщин в возрасте 45–65 лет, а также из 20 образцов периферической венозной крови больных РЭ. Установлено, что ни в одном из образцов ДНК ген *PTEN* не был метилирован. В отличие от этого, метилирование псевдогена *PTENP1* обнаружено во всех исследованных тканях, кроме периферической крови. Сравнение частот метилирования *PTENP1* в группах РЭ и ГЭ и в контрольной группе женщин среднего и пожилого возраста (СПВ) не выявило статистически значимых различий между ними ($0.80 < p < 0.50$). Во всех этих группах выявлен высокий уровень метилирования (71–77% у пациенток против 58% в контрольной группе). При этом обнаружены значимые различия в частотах метилирования *PTENP1* в нормальном эндометрии молодых (4%) и СПВ (58%) женщин ($p < 0.001$). Сделан вывод, что метилирование псевдогена *PTENP1* может отражать возрастные изменения и не имеет прямой связи с исследуемой патологией эндометрия. Предполагается, что в зависимости от влияния метилированного *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* метилирование псевдогена может защищать организм от развития РЭ и/или служить маркером предракового состояния клеток эндометрия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гиперплазия эндометрия, длинные некодирующие РНК, метилирование ДНК, рак эндометрия, *PTEN*, *PTENP1*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭ – гиперплазия эндометрия; РЭ – рак эндометрия; днРНК – длинные некодирующие РНК; кэРНК – конкурирующая эндогенная РНК; миРНК – микроРНК; СПВ – средний (45–55 лет) и пожилой (старше 55 лет) возраст; сРНК – смысловая РНК; асРНК – антисмысловая РНК; MRE – microRNA recognition element (элемент, узнающий микроРНК); PICS – *PTEN*-loss-induced cellular senescence (клеточное старение, индуцированное потерей *PTEN*); *PTEN* – phosphatase and tensin homolog (гомолог фосфатазы и тензина).

ВВЕДЕНИЕ

Рак эндометрия (РЭ) – одно из самых распространенных онкологических заболеваний женских половых путей, частота которого составляет 4.8% от всех онкопатологий у женщин [1]. Вероятность возникновения РЭ увеличивается с возрастом: к 75 годам кумулятивные риски заболевания достигают 1%, а смерти – 0.2%. Хотя РЭ рассматривается как постменопаузальное заболевание, которое развивается у женщин старше 50 лет, до 14% клинических случаев РЭ диагностируется в пременопаузе, и из них только 5% у женщин моложе 40 лет [2–4]. Распространение ожирения и метаболического синдрома в популяциях Европы и Северной Америки, сопровождающиеся повышением уровня эндогенных эстрогенов, а также общее старение населения этих стран позволяет предполагать значительное возрастание инцидентов заболевания в этих регионах в ближайшем будущем [5]. Все это диктует необходимость исследования этиологии, а также поиска биомаркеров ранней диагностики РЭ с целью его предупреждения и проведения своевременного адекватного лечения.

В зависимости от сферы применения в медицине биомаркеры принято разделять на прогностические, предиктивные и фармакодинамические [6]. Биомаркеры первого типа используют для оценки тяжести заболевания и выживаемости пациентов независимо от проводимого лечения. Предиктивные биомаркеры позволяют предсказывать реакцию больных на проводимое лечение, а фармакодинамические – индивидуальный ответ пациента на воздействие лекарственных препаратов с учетом генетических особенностей молекулярных мишеней используемых лекарств, а также ферментов их метаболизма.

На основе биомаркеров РЭ традиционно разделяют на два подтипа [1, 7–9]. Наиболее часто встречающийся и, как правило, спорадически возникающий РЭ типа I, обычно характеризуется наличием высококодифференцированных клеток, по гистологическим характеристикам является эндометриоидным, а сами клетки опухоли обнаруживают нормальный диплоидный кариотип, нестабильность микросателлитов (MSI) и экспрессируют рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR). При РЭ типа I мутации в гене опухолевого супрессора TP53 происходят редко, и больные имеют хорошие шансы на выздоровление. В отличие от этого, РЭ типа II не относится к эндометриоидным опухолям, содержит низкодифференцированные клетки, для многих из которых характерна анеуплоидия, отсутствуют генетические изменения в белке p53, а ER и PR не экспрессируются. При этом течение болезни имеет неблагоприятный прогноз.

Данные гистологического и молекулярно-генетического анализа позволяют разделить РЭ типа II на несколько дополнительных подтипов, в том числе серозный и светлоклеточный РЭ, а также сарциносаркому [1]. Проведенный недавно с использованием глубокого секвенирования геномной ДНК метаанализ мутаций в опухолях эндометрия выявил также значительную гетерогенность их мутационных спектров и позволил разделить РЭ на четыре группы [7].

Одним из факторов риска развития РЭ являются гиперпластические процессы в эндометрии, которые происходят на фоне дисбаланса эндогенных стероидных гормонов: эстрогенов и прогестерона [10–12]. ГЭ отличает избыточная пролиферация клеток, сопровождаемая характерными морфологическими изменениями ткани. По классификации ВОЗ 94 в гиперплазии эндометрия выделяют ГЭ без атипии и ГЭ с атипией, которые, в свою очередь, делятся на простые и комплексные [10, 11]. Своевременно выявленные ГЭ обычно хорошо отвечают на терапию. Тем не менее комплексные ГЭ без атипии и с атипией трансформируются в РЭ приблизительно в 25 и 50% случаев соответственно [13]. Как при раке, так и при гиперплазии в разной степени нарушен контроль пролиферации клеток, что сопровождается увеличением числа клеток в единице объема ткани.

Клетки РЭ гораздо чаще содержат мутации в генах сигнального пути PI3K/AKT, чем клетки опухолей других типов [7, 14]. Серин-треониновая протеинкиназа AKT регулирует многие клеточные функции [15]. Важнейшим негативным регулятором передачи сигналов по этому пути является фосфатаза двойной специфичности PTEN. Мутации в гене PTEN, расположенном на хромосоме 10q23.3, часто обнаруживают при ГЭ и в 93% случаев РЭ. Основной субстрат PTEN – вторичный посредник фосфатидилинозитол-(3,4,5)-трифосфат (PIP3), под действием PTEN утрачивает 3'-фосфатную группу, превращаясь в PIP2. Дефосфорилированный PIP2 теряет способность активировать AKT, что блокирует передачу сигнала по этому пути и подавляет многие клеточные активности и функции, включая прохождение по клеточному циклу, апоптоз, подвижность и полярность клеток, их старение, самообновление стволовых клеток, процессы транскрипции и трансляции. Для проявления супрессорных свойств PTEN важна его альтернативная протеинфосфатазная активность, вовлеченная в дефосфорилирование проапоптотических белков, протеинкиназ и факторов транскрипции [15–17]. Недавно обнаружили внеклеточные и внутриклеточные супрессорные функции PTEN, независимые от его фосфатазной активности [18]. Все это указывает на PTEN как на важный прогностический и предиктивный биомаркер канцерогенеза [19], а также

освещает молекулярные механизмы участия *PTEN* в этиологии РЭ и подчеркивает необходимость изучения регуляции его активности в норме и при РЭ.

В нормальных тканях ген *PTEN* экспрессируется конститутивно, и его функции строго контролируются [17, 20]. Активность *PTEN* регулируется на всех уровнях его экспрессии: путем активации и подавления транскрипции [21–23], посттранскрипционно на уровне мРНК с участием многочисленных микроРНК [24, 25], а также на посттрансляционном уровне посредством ковалентных модификаций белкового продукта и взаимодействий с многочисленными мембранными, цитоплазматическими и ядерными белками [20]. Как позитивный, так и негативный контроль транскрипции гена *PTEN* происходит с участием нескольких факторов транскрипции, а в подавление транскрипции вовлечены эпигенетические механизмы. В последнем случае имеет место метилирование промоторных участков ДНК гена *PTEN*, а также деацетилирование гистонов хроматина на промоторе. Таким образом, имеющиеся данные показывают, что инактивация гена опухолевого супрессора *PTEN*, ассоциированная с прогрессией опухолей при ГЭ и РЭ, может происходить под действием как генетических, так и эпигенетических мутаций.

Процессированный (не содержащий интронов) псевдоген *PTENP1*, расположенный на хромосоме 9p13.3, на 98.6% гомологичен функциональному гену *PTEN*, однако не экспрессирует белок *PTEN* из-за потери кодона инициации трансляции в результате мутации [26]. *PTENP1*, как правило, транскрибируется с образованием трех длинных некодирующих РНК (днРНК) – одной смысловой (сРНК) и двух антисмысловых (асРНК) α и β [27]. Транскрипция происходит с двух разнонаправленных, перекрывающихся промоторов, и образующиеся транскрипты выполняют важные регуляторные функции: сРНК проявляет в клетке свойства конкурирующей эндогенной РНК (кэРНК) [28–30]. В соответствии с этим механизмом, сайты связывания микроРНК (миРНК) MRE, локализованные на сРНК псевдогена, конкурируют с MRE мРНК гена *PTEN* за взаимодействующие с ними специфические миРНК, препятствуя их ингибирующему действию на трансляцию *PTEN*-мРНК. В том же направлении действует и полиаденилированная асРНК- β . Она взаимодействует с 5'-концом неполиаденилированной *PTENP1*-сРНК и стабилизирует ее, обеспечивая более эффективное конкурирующее действие последней. В отличие от этого, асРНК- α обеспечивает доставку по крайней мере двух белков, участвующих в перестройке хроматина – ДНК-метилтрансферазы 3A (DNMT3A) и Zeste-энхансера (EZH2), к промотору гена *PTEN* [27]. Эти белки обеспечивают тримети-

лирование гистона H3 по остатку Lys27 (H3K27me3), маркеру неактивного хроматина с подавленной транскрипцией. Разнонаправленное действие транскриптов псевдогена *PTENP1* на экспрессию гена опухолевого супрессора *PTEN* предполагает необходимость тонкой регуляции их соотношения в клетке. Механизмы такой регуляции, которые могут быть нарушены в опухолях, не изучены. Делеции псевдогена *PTENP1* обнаружены в спорадических опухолях прямой кишки [28], а также при первичной и метастатической меланоме [31]. Другой возможный механизм инактивации псевдогена *PTENP1* путем метилирования его промоторной области выявлен при раке легкого [32], а недавно в опухолях светлоклеточного рака почки [33].

Ранее мы впервые обнаружили метилирование 5'-концевой промоторной области псевдогена *PTENP1* при РЭ и ГЭ [34]. В настоящей работе метилирование *PTENP1* при РЭ и ГЭ было изучено более детально, а также впервые выявлено метилирование исследуемой области псевдогена в клетках нормального эндометрия женщин среднего и пожилого возраста (СПВ). Кроме того, проанализирован статус метилирования областей промотора гена *PTEN*, не изученных ранее при РЭ и ГЭ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты и образцы тканей

В работе использовали образцы тканей 143 пациентов Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, а также московских клинических больниц № 4 и 55. В исследование были включены образцы тканей 57 больных РЭ (средний возраст 61.9 ± 7.8 лет) и 43 пациенток с простой гиперплазией эндометрия (средний возраст 52.1 ± 6.5 лет). Кроме того, исследовали периферическую венозную кровь 20 больных РЭ из основной группы (средний возраст 57.1 ± 7.6 лет), у которых обнаружено метилирование *PTENP1* в эндометрии. Контрольную группу составили 43 женщины с гистологически неизменным эндометрием, проходившие обследование в связи с подозрением на предраковое состояние эндометрия. Данная группа включала две подгруппы: 24 женщины в возрасте от 17 до 34 лет (средний возраст 24.2 ± 4.8 лет) и 19 женщин в возрасте от 45 до 65 лет (средний возраст 52.5 ± 6.0 лет). Сравнение среднего возраста контрольной подгруппы (45–65 лет) и группы больных РЭ (57 человек) с использованием критерия Манна–Уитни выявило статистически значимые различия ($p < 0.05$). Поэтому при сравнении метилирования псевдогена *PTENP1* из группы больных РЭ были исключены женщины старше 59 лет и выделена подгруппа из 24 больных (48–59 лет, средний

возраст – 54.3 ± 3.4 лет), которая по этому признаку не отличалась от контрольной подгруппы ($p = 0.095$). Использовали как свежемороженые ткани, полученные во время операций или при взятии биопсии, так и образцы, фиксированные формалином и заключенные в парафиновые блоки. Периферическую венозную кровь брали путем пункции локтевой вены. В качестве антикоагулянта добавляли 3.8% раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 9. Стадии РЭ классифицировали в соответствии с рекомендациями Международной федерации акушерства и гинекологии (FIGO). Гистологический тип РЭ определяли в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения. Согласие на обработку данных получено от всех пациенток, включенных в исследование.

Выделение ДНК и ее бисульфитная конверсия

Геномную ДНК выделяли стандартным методом с применением фенола и гуанидинхлорида [35]. В случае образцов ткани, заключенных в парафиновые блоки, каждый блок измельчали с помощью микротомы до фрагментов толщиной 10 мкм. Далее проводили депарафинизацию образца и экстракцию ДНК согласно методике [36] с незначительными модификациями. Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США). Бисульфитную конверсию проводили с помощью EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу, предложенному фирмой-производителем.

Метилчувствительная ПЦР

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 67 мМ Трис-НСl (рН 8.8), 16.6 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.01% Твин 20, 2 мМ MgCl_2 , четыре дезоксирибонуклеозидтрифосфата (0.2 мМ каждый; «Сибэнзим», Россия), прямой и обратный праймеры (0.5 мкМ каждый), 25 нг конвертированной бисульфитом ДНК и 0.5–1.0 ед. Taq-ДНК-полимеразы. Taq-ДНК-полимеразу получали из рекомбинантного штамма *E. coli* PVG-A1 по методу Патрушева и др. с незначительными модификациями [37]. В качестве полностью метилированного контроля использовали ДНК, выделенную из лимфоцитов крови человека, метилированную *in vitro* с помощью метилазы SssI («Сибэнзим», Россия) и обработанную бисульфитом натрия. Неметилированным контролем служила ДНК лимфоцитов крови, конвертированная бисульфитом натрия. После проведения ПЦР на термоциклере Mastercycler pro (Eppendorf, Германия) продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 3% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали 100 + 50 п.н. ДНК-маркер («Сибэнзим», Россия). Типичный результат,

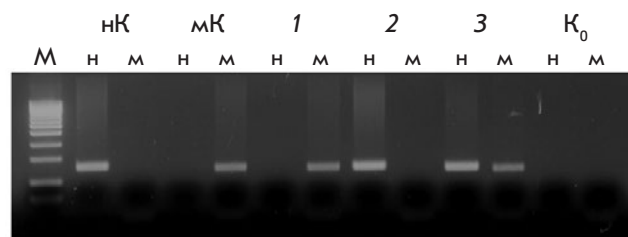


Рис. 1. Анализ статуса метилирования 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* с помощью метилчувствительной ПЦР. н и м – продукт ПЦР-амплификации, образующийся в присутствии праймеров к неметилированной или метилированной матрице соответственно. В качестве матрицы использовали следующие образцы ДНК, подвергнутые бисульфитной конверсии: нК – из периферической крови (неметилированный контроль), мК – из периферической крови, метилированная *in vitro* с помощью метилазы SssI (метилированный контроль), 3 – из разных опухолей, в которых исследуемая область псевдогена метилирована во всех клетках (1), неметилирована во всех клетках (2), метилирована в части клеток (3). K_0 – амплификация в отсутствие ДНК, М – маркер молекулярных масс

полученный с использованием метилчувствительной ПЦР, представлен на рис. 1. Последовательности праймеров, а также условия проведения ПЦР-амплификации с каждой из пар праймеров приведены в табл. 1. С целью исключения неспецифического отжига праймеров для каждой их пары проводили оптимизацию температуры отжига в градиенте температур. Кроме того, для предотвращения появления неспецифических продуктов ПЦР в результате «переамплификации» подбирали оптимальное количество циклов. При анализе 5'-концевой области псевдогена *PTENP1* использовали праймеры, приведенные в [32]. Участок *PTEN2* промотора гена *PTEN* (рис. 2) анализировали с помощью праймеров, разработанных нами. Статус метилирования локусов *PTEN4* и *PTEN5* анализировали с использованием праймеров [38] и [32] соответственно.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью пакета программ SPSS v. 22 (SPSS Inc.). Различия в частотах метилирования гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1* в группах оценивали с использованием двухстороннего метода Хи-квадрат и точного критерия Фишера. Статистические различия среднего возраста между группами оценивали с применением критерия Манна–Уитни.

Таблица 1. Праймеры и условия ПЦР, использованные для определения статуса метилирования промоторов гена *PTEN* и его псевдогена *PTENP1*

Праймер	Нуклеотидная последовательность	T _{отж.} , °C	Число циклов ПЦР	Размер продукта ПЦР, п.н.
<i>PNP1-U-F</i>	5'-TTGTAGTTGTGATGGAAGTTTGAAT	64	33	156
<i>PNP1-U-R</i>	5'-CCACCCCCACAAATACTCACA			
<i>PNP1-M-F</i>	5-TGTAGTCGTGATGGAAGTTTGAAT	63	33	152
<i>PNP1-M-R</i>	5'-CCCCCGCGAATACTCACG			
<i>PN2-U-F</i>	5-TTGTAGTTATGATGGAAGTTTGAG	61	33	165
<i>PN2-U-R</i>	5'-CCACCACCACAAACCAACCA			
<i>PN2-M-F</i>	5-TTGTAGTTATGATGGAAGTTTGAG	61	33	162
<i>PN2-M-R</i>	5'-CGCCGCAAACCGACCGA			
<i>PN4-U-F</i>	5-GTTGGGGTGTGTGGAGTTTGGTT	61	36	135
<i>PN4-U-R</i>	5'-CCCTCAAACCTCCAAATCAATTCACAA			
<i>PN4-M-F</i>	5-CGCGCGGAGTTTGGTTTTCG	62	32	117
<i>PN4-M-R</i>	5'-CAAATCGATTTCGCGACGTCG			
<i>PN5-U-F</i>	5-TATTAGTTTGGGGATTTTTTTTTTGT	60	36	186
<i>PN5-U-R</i>	5'-CCCAACCCTTCCTACACCACA			
<i>PN5-M-F</i>	5-GTTTGGGGATTTTTTTTTTTCGC	60	36	178
<i>PN5-M-R</i>	5'-AACCCCTCCTACGCCGCG			

Примечание. М – метилированный; U – неметилированный; F – прямой праймер; R – обратный праймер; *PNP* – праймеры для амплификации участков псевдогена; *PN* – праймеры для амплификации участков гена *PTEN*.

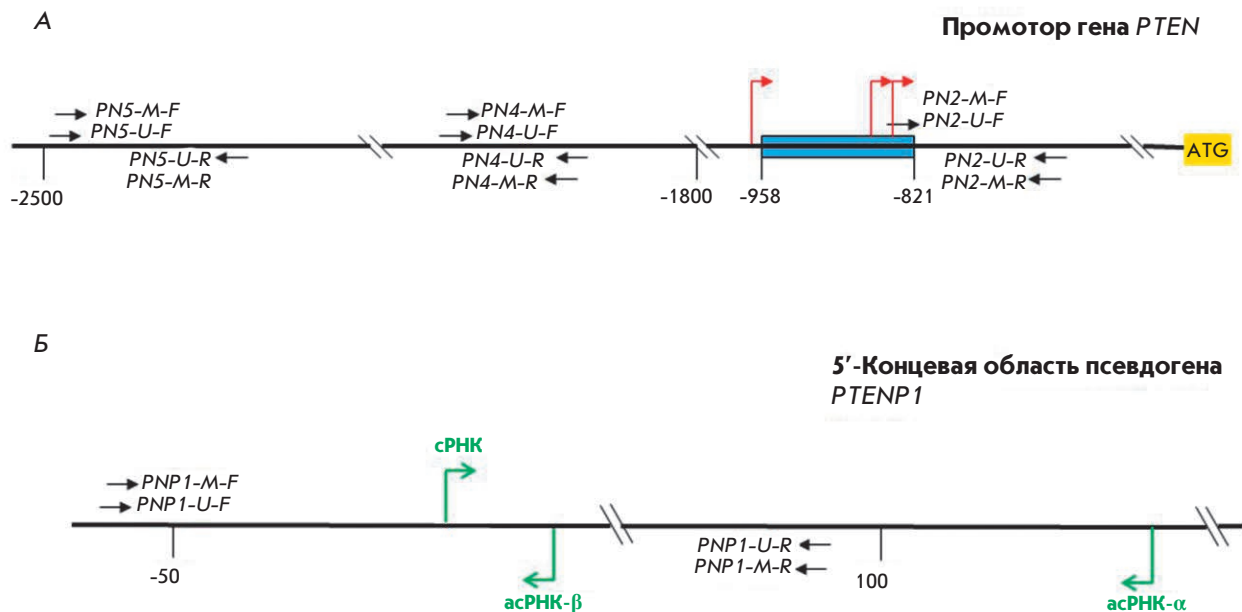


Рис. 2. Исследованные участки гена *PTEN* (А) и псевдогена *PTENP1* (Б). Голубым прямоугольником обозначена область минимального промотора гена *PTEN*; загнутые красные и зеленые стрелки обозначают точки инициации транскрипции *PTEN* и *PTENP1* соответственно; черные разнонаправленные стрелки обозначают положение праймеров для ПЦР; сРНК – смысловая РНК, асРНК-α и -β – антисмысловые РНК-α и -β, цифры указывают на расстояние от ATG-кодона (А) или от точки инициации синтеза сРНК (Б)

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данной работе нами исследованы три участка в окрестностях минимального промотора гена *PTEN*, которые включают потенциально метилируемые CpG-последовательности, ранее не анализированные при РЭ (рис. 2). Последовательность, фланкированная праймерами *PN2*, располагается на 685 п.н. выше АТG-кодона и примыкает непосредственно к минимальному промотору. Область между праймерами *PN4* расположена на 1913 п.н. выше АТG-кодона. Метилирование данного участка изучали при меланоме [38]. Последовательность, локализованная между праймерами *PN5*, метилирование которой уже изучено при раке легкого, располагается на 2300 п.н. выше АТG-кодона [32].

Начиная работу, мы прежде всего установили, что ни в одном из образцов ДНК, выделенных из анализируемых тканей, включая РЭ, ГЭ и нормальный эндометрий, ген *PTEN* в изучаемых областях промотора не метилирован (табл. 2). Хотя это не исключало наличия в нем генетических мутаций, однако указывало на то, что у наших пациенток ген не мог быть инактивирован с помощью такого эпигенетического механизма. Поэтому в соответствии с опубликованными данными, мы предположили, что инактивация *PTEN* могла осуществляться по известному механизму кЭРНК через подавление транскрипции псевдогена *PTENP1* путем метилирования его 5'-концевой области.

Действительно, высокая частота метилирования *PTENP1* обнаружена во всех образцах ткани эндометрия, кроме нормального эндометрия молодых женщин (табл. 2). В то же время 73% (8 из 11, табл. 2) образцов нормального эндометрия женщин СПВ с метилированным *PTENP1* оказались

мозаичными, т.е. содержали некоторое количество клеток с неметилованным или частично метилированным псевдогеном (данные не представлены). Мозаичное метилирование псевдогена выявлено и в ряде образцов тканей эндометрия пациенток с ГЭ и РЭ (см., например, рис. 1, дорожки 3н и 3м), что могло быть обусловлено, в том числе, загрязнением биоптатов опухолей нормальными клетками. Метилирование было тканеспецифичным и не наблюдалось в крови пациенток. Сравнение частот метилирования *PTENP1* в группах РЭ и ГЭ и в контрольной группе женщин СПВ не выявило статистически значимых различий между ними ($0.45 < p < 0.35$). Во всех группах уровень метилирования был высоким (71–77% у пациенток против 58% в контрольной подгруппе 2). При этом средний возраст пациенток с РЭ и ГЭ, включенных в это исследование, соответствовал среднему возрасту женщин контрольной подгруппы 2 (54.3, 52.1 и 52.5 лет соответственно). Не обнаружено значимых различий в метилировании *PTENP1* и в подгруппах основной группы РЭ, в которых пациентки были разделены по клинико-патологическим характеристикам: возрасту, стадии заболевания, глубине инвазии опухолей в миометрий, степени дифференцировки раковых клеток, а также подтипам опухолей (табл. 3). Однако найдены статистически значимые различия в частотах метилирования *PTENP1* в нормальном эндометрии молодых (4%) и женщин СПВ (58%) ($p < 0.001$). Такие результаты оказались неожиданными. Они позволяют предполагать, что метилирование псевдогена *PTENP1* отражает, в первую очередь, возрастные изменения в организме человека и не связано непосредственно с исследуемой патологией эндометрия.

Таблица 2. Метилирование промоторов гена *PTEN* и псевдогена *PTENP1* в нормальных, гиперпластических и малигнизированных тканях эндометрия

Ген	Кровь	Нормальный эндометрий, средний возраст (крайние значения)		Гиперплазия без атипии	Гиперплазия с атипией	Рак эндометрия
		24 (17–34)	52.5 (45–65)			
<i>PTEN</i>	0.00 (0/25)*	0.00 (0/24)	0.00 (0/19)	0.00 (0/30)	0.00 (0/13)	0.00 (0/57)
<i>PTENP1</i>	0.00 (0/25)	4.17 (1/24)	57.89 (11/19)	73.33 (22/30)	76.92 (10/13)	70.83 (17/24)**
<i>P</i>		<0.001***		0.351****	0.450****	0.521****

Примечание. Двусторонний точный критерий Фишера.

*Первая цифра – процент метилированных образцов ДНК, вторая цифра – число метилированных образцов, третья цифра – общее число образцов.

**Из основной группы в 57 человек с РЭ выделена подгруппа, соответствующая по возрасту контрольной группе сравнения.

***Нормальный эндометрий 24 (17–34) против 52.5 (45–65).

****Против нормального эндометрия 52.5 (45–65).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В 2001 г. Salvesen и соавт. впервые попытались проанализировать статус метилирования промотора гена *P TEN* при РЭ. Метилирование было обнаружено у 19% пациенток. Однако эти данные оказались ошибочными, поскольку не учитывали высокую гомологию между геном и его псевдогеном *P TENP1* [39]. Позднее Zysman и соавт. также исследовали метилирование промоторной области *P TEN* при РЭ [40]. В этом случае в метилчувствительной ПЦР использовали уже *P TEN*-специфичные праймеры. Анализировали два сайта: первый – в минимальном промоторе гена *P TEN*, а второй – вблизи АТГ-кодона. Оба сайта оказались неметилированными. Эти данные позволили предположить, что при исследовании промотора гена *P TEN* с использованием праймеров, не дифференцирующих *P TEN* и его псевдоген, выявляется метилирование именно *P TENP1*, но не *P TEN*. Статус метилирования других участков гена *P TEN* с *P TEN*-специфичными праймерами при РЭ и ГЭ больше не анализировали. Тем не менее метилирование иных участков промоторной области этого гена обнаружено и при других онкологических заболеваниях [32, 38, 41]. Поэтому мы предположили, что в тканях РЭ могли быть метилированы уже исследованные и новые последовательности промоторной области гена *P TEN*, которые ранее не изучали

при этом заболевании. Руководствуясь этим, мы выбрали для исследования новый локус, расположенный в непосредственной близости от минимального промотора, а также две дистально расположенных последовательности, которые уже анализировали ранее (рис. 2, подробнее см. раздел «Результаты»). Один из них, локализованный между праймерами *PN4*, был метилирован в 60% случаев меланомы [38].

Как показано нами, проанализированные последовательности промоторной области гена *P TEN* не метилированы ни в одном из изученных образцов тканей. С учетом этих, а также опубликованных данных мы сделали вывод о том, что метилирование промотора гена *P TEN* не участвует в его инактивации при РЭ и ГЭ, по крайней мере, у наших пациенток. Поэтому мы предположили, что в этом случае подавление экспрессии гена *P TEN* могло происходить по механизму конкурирующих эндогенных РНК или с участием асРНК путем ингибирования транскрипции псевдогена *P TENP1* через метилирование его промоторной области.

Действительно, мы обнаружили высокую частоту метилирования 5'-концевой области *P TENP1* у пациенток с РЭ (70.83%), а также при ГЭ без атипии и с атипией (73.33 и 76.92 % соответственно, табл. 2). Эти результаты соответствуют опубликованным данным. В частности, метилирование 5'-концевой области псевдогена *P TENP1* выявляли в 66% случаев мелкоклеточного рака легкого [32]. Однако неожиданным оказалось метилирование псевдогена в образцах эндометрия, полученного от здоровых женщин в возрасте 45–65 лет. Метилирование в этой контрольной подгруппе обнаружили в 57.89% случаев. В то же время метилирование *P TENP1* имело место лишь у 4% здоровых молодых женщин в возрасте от 17 до 34 лет (табл. 2). Различия в частотах метилирования ДНК в этих подгруппах были статистически значимыми ($p < 0.001$). Дальнейший анализ не выявил значимых различий в частотах метилирования *P TENP1* у здоровых женщин СПВ и пациенток с РЭ и ГЭ. Также не обнаружено корреляции между метилированием псевдогена и стадиями РЭ, степенью дифференцировки клеток, глубиной инвазии в миометрий или подтипами рака (табл. 3). Необходимо также подчеркнуть отсутствие метилирования в крови пациенток с РЭ, в эндометрии которых псевдоген был метилирован. Все это указывает на тканеспецифический характер данного явления, которое сопровождается изменениями в здоровом эндометрии при старении организма человека.

В настоящее время не известно, как обнаруженное нами метилирование исследуемой области псевдогена *P TENP1* влияет на его экспрессию и экспрессию гена *P TEN*. Теоретически возможны три

Таблица 3. Ассоциация метилирования псевдогена *P TENP1* с клинико-патологическими характеристиками больных раком эндометрия

Клинико-патологические характеристики	n	M(H)	M, %	p
<i>Средний возраст (крайние значения)</i>				0.784
55 (48–60)	27	19(8)	70.37	
68 (61–76)	30	20(10)	66.66	
<i>Стадия FIGO</i>				1.00
I	46	31(15)	67.39	
II + III	11	8(3)	72.73	
<i>Инвазия в миометрий</i>				0.359
Есть	17	10(7)	58.82	
Нет	40	29(11)	72.50	
<i>Дифференцировка опухоли</i>				0.774
высокая (G1)	31	21(10)	67.74	
умеренная и низкая (G2 + G3)	26	19(7)	73.08	
<i>Подтип по Bokhman</i>				
I	19	14(5)	73.68	1.00
II	11	8(3)	72.73	

Примечание. Точный критерий Фишера, двусторонний. М – метилированный, Н – неметилированный.

варианта последствий метилирования: отсутствие влияния на экспрессию *PTEN*, подавление или стимуляция его работы. Упомянутые во «Введении» три *PTENP1*-днРНК (рис. 2), синтезируемые с исследуемого промотора, оказывают противоположное действие [27]. *PTENP1*-асРНК- α ингибирует транскрипцию *PTEN* через гетерохроматинизацию его промотора путем триметилирования гистона H3 в этом участке хроматина. *PTENP1*-сРНК, конкурируя за мРНК с *PTEN*-мРНК, выполняет функции кэРНК, а *PTENP1*-асРНК- β стабилизирует *PTENP1*-сРНК. Физиологический исход метилирования псевдогена будет зависеть от изменения соотношения между этими тремя *PTENP1*-РНК в клетках эндометрия. Стабилизация или стимуляция работы гена опухолевого супрессора *PTEN* при преимущественном одновременном синтезе *PTENP1*-сРНК и *PTENP1*-асРНК- β может защищать от канцерогенеза. Последствие подавления его активности может быть двояким. Частичная инактивация *PTEN* под действием этого эпигенетического механизма может быть маркером предракового состояния клеток эндометрия. В то же время полная быстрая его инактивация также могла бы выполнять защитные функции в стареющих клетках эндометрия.

Недавно группой Р. Pandolfi был обнаружен новый *PTEN*-зависимый механизм старения клеток, получивший название клеточного старения, индуцированного инактивацией *PTEN* (*PTEN*-loss-induced cellular senescence – PICS) [42]. В отличие от классических механизмов старения, например, под действием гиперактивации онкогенов PICS (по крайней мере, у мышей [42] и в первичных клетках эпителия человека [43]) может быстро развиваться в непролиферирующих клетках в отсутствие клеточного ответа на повреждение ДНК. При этом развитие PICS зависит от уровня активности внутриклеточного *PTEN*. Старение клеток и блокирование клеточного цикла по этому механизму в еще немалигнизированных клетках происходят при полной инактивации *PTEN*, тогда как его частичная инактивация может сопровождаться инициацией канцерогенеза и пролиферацией малигнизированных клеток [42]. В этой связи можно предположить, что *PTEN*, частично инактивированный соматическими мутациями в клетках эндометрия, создает опасность малигнизации кле-

ток. Поэтому для полного подавления прохождения клеток по клеточному циклу и предотвращения развития опухолей по этому механизму необходима быстрая полная инактивация *PTEN*. Это, по-видимому, могло происходить путем подавления транскрипции псевдогена *PTENP1* через метилирование его промотора и/или истощения кэРНК, функции которой выполняет *PTENP1*-сРНК. Если такое предположение верно, то метилирование *PTENP1* можно рассматривать как одно из звеньев защиты от стареющих клеток с высоким риском малигнизации. В этом случае метилирование *PTENP1*, обнаруживаемое в клетках ГЭ и РЭ, может быть следствием предшествовавшей или еще происходящей борьбы с их злокачественным перерождением. Для подтверждения или опровержения этой модели требуется проведение дополнительных исследований влияния метилирования *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате изучения нормальных тканей, злокачественных опухолей и гиперплазий эндометрия у женщин разного возраста установлено, что ни в одной из них промоторная область гена опухолевого супрессора *PTEN* не метилирована. В отличие от этого, двунаправленный промотор псевдогена *PTENP1* метилирован с высокой частотой во всех исследованных тканях, кроме эндометрия молодых здоровых женщин, а также крови больных раком эндометрия. Сделан вывод, что метилирование псевдогена *PTENP1* отражает возрастные изменения в организме человека и может не быть связано непосредственно с исследуемой патологией эндометрия. Обосновано предположение, согласно которому в зависимости от влияния метилированного *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* метилирование псевдогена может защищать организм от развития РЭ или служить маркером предракового состояния клеток. Для выбора между этими альтернативными возможностями необходимо дополнительно исследовать влияние метилирования *PTENP1* на экспрессию гена *PTEN* в культивируемых клетках человека. ●

Работа проведена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-08-00801).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morice P, Leary A, Creutzberg C, Abu-Rustum N, Darai E. // *Lancet*. 2016. V. 387. № 10023. P. 1094–1108.
- Evans-Metcalf E.R., Brooks S.E., Reale F.R., Baker S.P. // *Obstet. Gynecol.* 1998. V. 91. P. 349–354.
- Duska L.R., Garrett A., Rueda B.R., Haas J., Chang Y., Fuller A.F. // *Gynecol. Oncol.* 2001. V. 83. P. 388–393.
- Garg K., Soslow R.A. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2014. V. 138. P. 335–342.
- Sheikh M.A., Althouse A.D., Freese K.E., Soisson S., Edwards R.P., Welburn S., Sukumvanich P., Comerci J., Kelley J., LaPorte R.E., et al. // *Future Oncol.* 2014. V. 10. P. 2561–2568.
- Werner H.M.J., Salvesen H.B. // *Curr. Oncol. Rep.* 2014. V. 16. P. 403.

7. Cancer Genome Atlas Research Network, Kandoth C., Schultz N., Cherniack A.D., Akbani R., Liu Y., Shen H., et al. // *Nature*. 2013. V. 497. № 7447. P. 67–73.
8. Bokhman J.V. // *Gynecol. Oncol.* 1983. V. 15. P. 10–17.
9. Tsikouras P., Bouchlariotou S., Vrachnis N., Dafopoulos A., Galazios G., Csorba R., von Tempelhoff F.G. // *Eur. J. Obstetr. Gynecol. Reprod. Biol.* 2013. V. 169. P. 1–9.
10. Mazur M.T. // *Annals Diagn. Pathol.* 2005. V. 9. P. 174–181.
11. Sivridis E., Giatromanolaki A. // *Virchows Arch.* 2008. V. 453. P. 223–231.
12. Mills A.M., Longacre T.A. // *Semin. Diagn. Pathol.* 2010. V. 27. P. 199–214.
13. Wise M.R., Jordan V., Lagas A., Showell M., Wong N., Lensen S., Farquhar C.M. // *Am. J. Obst. Gynecol.* 2016. V. 214. № 6. P. 689.e1–689.e17.
14. Kandoth C., McLellan M.D., Vandin F., Ye K., Niu B., Lu C., Xie M., Zhang Q., McMichael J.F., Wyczalkowski M.A., et al. // *Nature*. 2013. V. 502. P. 333–339.
15. Blanco-Aparicio C., Renner OLeal J.F.M., Carnero A. // *Carcinogenesis*. 2007. V. 28. № 7. P. 1379–1386.
16. Matias-Guiu X., Prat J. // *Histopathology*. 2013. V. 62. P. 111–112.
17. Song M.S., Salmena L., Pandolfi P.P. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012. V. 13. P. 283–296.
18. Milella M., Falcone I., Conciatori F., Cesta Incani U., Del Curatolo A., Inzerilli N., Nuzzo C.M., Vaccaro V., Vari S., Cognetti F., Ciuffreda L. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 24.
19. McCabe N., Kennedy R.D., Prise K.M. // *Oncoscience*. 2016. V. 3. № 2. P. 54–55.
20. Brito M.B., Goulielmaki E., Papakonstanti E.A. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 166.
21. Stambolic V., MacPherson D., Sas D., Lin Y., Snow B., Jang Y., Benchimol S., Mak T.W. // *Mol. Cell*. 2001. V. 8. № 2. P. 317–325.
22. Song L.B., Li J., Liao W.T., Feng Y., Yu C.P., Hu L.J., Kong Q.L., Xu L.H., Zhang X., Liu W.L., et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 12. P. 3626–3636.
23. Whelan J.T., Forbes S.L., Bertrand F.E. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 1. P. 80–84.
24. He L. // *Sci. Signal*. 2010. V. 3. P. 146, pe39.
25. Polisen L., Salmena L., Riccardi L., Fornari A., Song M.S., Hobbs R.M., Sportoletti P., Varmeh S., Egia A., Fedele G., et al. // *Sci. Signal*. 2010. V. 3. P. 117, ra29.
26. Dahia P.L.M., FitzGerald M.G., Zhang X., Marsh D.J., Zheng Z., Pietsch T., von Deimling A., Haluska F.G., Haber D.A., Eng C. // *Oncogene*. 1998. V. 16. P. 2403–2406.
27. Johnsson P., Ackley A., Vidarsdottir L., Lui W., Corcoran M., Grandner D., Morris K.V. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 4. P. 440–446.
28. Polisen L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W.J., Pandolfi P.P. // *Nature*. 2010. V. 465. P. 1033–1038.
29. Tay Y., Kats L., Salmena L., Weiss D., Tan S.M., Ala U., Karreth F., Polisen L., Provero P., Di Cunto F., et al. // *Cell*. 2011. V. 147. P. 344–357.
30. Polisen L., Pandolfi P.P. // *Methods*. 2015. V. 77–78. P. 41–50.
31. Polisen L., Haimovic A., Christos P.J., Vega Y., Saenz de Miera E.C., Shapiro R., Pavlick A., Berman R.S., Darvishian F., Osman I. // *J. Invest. Dermatol.* 2011. V. 131. № 12. P. 2497–2500.
32. Marsit C.J., Zheng S., Aldape K., Hinds P.W., Nelson H.H., Wiencke J.K., Kelsey K.T. // *Hum. Pathol.* 2005. V. 6. № 7. P. 768–776.
33. Yu G., Yao W., Gumireddy K., Li A., Wang J., Xiao W., Chen K., Xiao H., Li H., Tang K. // *Mol. Cancer Ther.* 2014. V. 13. № 12. P. 3086–3097.
34. Kovalenko T.F., Sorokina A.V., Ozolinya L.A., Patrushev L.I. // *Bioorg. Khim.* 2013. V. 39. № 4. P. 445–453.
35. Lindblom B., Holmlund G. // *Gene Anal. Techn.* 1998. № 5. P. 97–101.
36. Pikor L.A., Enfield K.S., Cameron H., Lam W.L. // *J. Visual. Exp.* 2011. e2763. P. 1–3.
37. Patrushev L.I., Valiaev A.G., Golovchenko P.A., Vinogradov S.V., Chikindas M.L., Kiselev V.I. // *Mol. Biol. (Mosk.)*. 1993. V. 27. № 5. P. 1100–1112.
38. Lahtz Ch., Stranzenbach R., Fielder E., Hembola P., Dammann R.H. // *J. Invest. Dermatol.* 2010. V. 130. P. 620–622.
39. Salvesen H.B., Mac Donald N., Ryan A., Jacobs I.J., Lynch E.D., Akslen L.A., Das S. // *Int. J. Cancer*. 2001. V. 91. P. 22–26.
40. Zysman M.A., Chapman W.B., Bapat B. // *Am. J. Pathol.* 2002. V. 160. № 3. P. 795–800.
41. Garcia J.M., Silva J., Peña C., Garcia V., Rodriguez R., Cruz M.A., Cantos B., Provencio M., España P., Bonilla F. // *Genes. Chromosomes Cancer*. 2004. V. 41. P. 117–124.
42. Alimonti A., Nardella C., Chen Z., Clohessy J.G., Carracedo A., Trotman L.C., Cheng K., Varmeh S., Kozma S.C., Thomas G., et al. // *J. Clin. Invest.* 2010. V. 120. P. 681–693.
43. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. P. 1424–1435.

УДК 577.2

Высокопродуктивная линия-продуцент фактора свертывания крови IX человека на основе клеток СНО

С. В. Ковнир¹, Н. А. Орлова¹, М. И. Шахпаронов², К. Г. Скрябин¹, А. Г. Габибов²,
И. И. Воробьев^{1,2*}

¹Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия
Октября, 7, корп. 1

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

*E-mail: ptichman@gmail.com

Поступила в редакцию 03.03.2017

Принята к печати 05.02.2018

РЕФЕРАТ Больные гемофилией В – наследственным нарушением свертывания крови – нуждаются в регулярном применении препаратов фактора свертывания крови IX. Рекомбинантный фактор IX человека, продуцируемый в культивируемых клетках линии СНО, практически эквивалентен природному фактору IX плазмы крови и широко используется в современной клинической практике. Получение биосимильного рекомбинантного фактора IX человека предполагает создание клональной клеточной линии с максимально возможной удельной продуктивностью и высоким уровнем удельной прокоагуляционной активности секретируемого фактора IX. Ранее на основе нетранслируемых участков гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка нами было разработано семейство плазмидных векторов p1.1 и p1.2, позволяющее проводить амплификацию целевого гена в геноме клеток-продуцентов под действием метотрексата, а также котрансфекцию вспомогательных генов, сцепленных с различными селекционными маркерами. Природная область открытой рамки считывания гена фактора IX человека в векторе p1.1 была трансфицирована в клетки линии СНО DG44. В результате трех последовательных шагов амплификации и последующего клонирования получена линия клеток, продуцирующая фактор IX с удельной продуктивностью 10.7 ± 0.4 пг/клетка/день. Прокоагуляционная активность секретируемого фактора IX была практически полностью восстановлена путем котрансфекции клеток плазмидами семейства p1.2, несущими гены растворимого варианта протеазы PACE/furin и витамин K-оксидоредуктазы китайского хомячка. Клональная линия-продуцент 3B12-86 позволяла накапливать фактор IX в бессывороточной культуральной среде до концентрации 6 МЕ/мл при простом периодическом культивировании, при этом копияность интегрированного гена фактора IX составила всего 20 копий/геном, а интегрированных генов PACE/furin и VKORC1 – три и две копии/геном соответственно. Фактор IX человека, секретируемый линией 3B12-86, был очищен при помощи трех стадий хроматографии до удельной активности 230 МЕ/мг с выходом более 30%. Полученная клональная линия-продуцент фактора IX и метод очистки продукта позволяют вести экономически обоснованное промышленное производство биосимильного рекомбинантного фактора IX для терапии гемофилии В.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемофилия В, системы гетерологичной экспрессии рекомбинантных белков, фактор свертывания крови IX.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СНО – Chinese hamster ovary – клетки яичника китайского хомячка *Cricetulus griseus*; DHFR – дигидрофолатредуктаза [КФ 1.5.1.3]; EMCV – вирус энцефаломиокардита; FIX – фактор свертывания крови IX; среда NAT – среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин; IRES – внутренний сайт связывания рибосом; MTX – метотрексат; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; VKORC1 – субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксидредуктазы витамина K [КФ 1.17.4.4]; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; БСА – бычий сывороточный альбумин; МЕ – международная единица активности фактора IX (соответствует содержанию фактора IX в 1 мл пулированной донорской плазмы); ОРС – открытая рамка считывания; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор IX (FIX) – это профермент сериновой протеазы каскада свертывания крови, которая в присутствии Ca^{2+} и мембранных фосфолипидов гидролизует связь аргинин–изолейцин в молекуле фактора X с образованием активированного фактора X (FXa). Нековалентный комплекс факторов IXa, VIIIa и X, связанных с фосфолипидной мембраной – «теназа» – является основным элементом петли положительной обратной связи каскада свертывания крови.

Ген *FIX* расположен на X-хромосоме. Врожденное отсутствие или низкий уровень функционально активного фактора IX приводят к развитию гемофилии В, X-связанному рецессивному генетическому заболеванию, встречающемуся приблизительно у одного из 30 тысяч мужчин. В частности, гемофилия королевских семей Европы – Royal family disease, обусловлена точечной мутацией гена *FIX*, приводящей к нарушению сплайсинга его мРНК и появлению неактивного укороченного белка *FIX* [1].

Первоначально терапия гемофилии В ограничивалась периодическими переливаниями плазмы крови, впоследствии замененными на концентраты протромбинового комплекса – смеси витамин К-зависимых факторов свертывания крови IX, II, VII и X. Основным ограничением такой терапии был риск развития тромбоза. При фракционировании плазмы крови методом Кона получены лекарственные препараты *FIX* с большей степенью чистоты, содержавшие, однако, примеси активированного *FIX* (*FIXa*) и других факторов свертывания, таким образом, риск тромботических эпизодов сохранялся. Дополнительная иммуноаффинная очистка *FIX* позволила полностью удалять эти примеси, но, как и в случае других продуктов переработки плазмы крови, не устраняла угрозу вирусного или прионного заражения. Препараты природного *FIX*, полученные путем очистки на иммобилизованных моноклональных антителах мыши, также могут вызывать аллергические реакции на иммуноглобулин мыши и потенциально способствовать появлению нейтрализующих *FIX* антител, т.е. ингибиторной формы гемофилии В [2].

Клонирование кДНК *FIX* [3] и первые успешные попытки получения рекомбинантного *FIX* в гетерологических системах [4, 5] были проведены в 1980–1985 гг. В 1986 г. на основе линии CHO получили продуцент *FIX* с достаточно высокой удельной продуктивностью [6]. Лекарственный препарат рекомбинантного *FIX* – наонаког альфа (торговое название Бенефикс) – одобрен к применению в США и странах ЕС в 1997 г. В процессе получения лекарственного препарата исключено использование веществ животного происхождения и компонентов донорской

плазмы. Нонаког альфа получают в клетках CHO, культивируемых в питательной среде, не содержащей сыворотки или других продуктов животного происхождения. Выделение и очистку *FIX* проводят в четыре хроматографические стадии, не используя иммуноаффинную хроматографию, потенциально присутствующие вирусы удаляют при помощи нанофильтрации на фильтре с порогом отсека 70 кДа. В готовой лекарственной форме наонакога альфа не используется альбумин человека [7].

Циркулирующий зрелый *FIX* имеет молекулярную массу около 57 кДа и среднюю концентрацию в плазме крови около 90 нМ. *FIX* состоит из четырех структурных доменов – Gla-домена, двух ЭФР-подобных доменов (ЭФР – эпидермальный фактор роста) и С-концевого домена сериновой протеазы. N-Концевой лидерный пептид *FIX* отделяется при транслокации полипептида в эндоплазматический ретикулум; пропептид, непосредственно предшествующий Gla-домену, отделяется при секреции зрелого белка. Активационный пептид, расположенный между вторым ЭФР-подобным доменом и доменом сериновой протеазы, отделяется при активации *FIX*. Активация *FIX* в каскаде свертывания крови осуществляется активированным фактором XI (внутренний путь) или активированным фактором VII (внешний путь).

Содержащий 12 γ -карбоксилированных остатков Glu Gla-домен расположен на N-конце молекулы зрелого *FIX*. Он обеспечивает связывание *FIX* и *FIXa* с поверхностью эндотелиальных клеток [8]. Первый ЭФР-подобный домен *FIX* содержит высокоаффинный сайт связывания иона кальция, а также обуславливает взаимодействие *FIX* с фактором VIIIa и с тканевым фактором (фактором III). Вторым ЭФР-подобным домен *FIX* принимает участие в образовании комплекса *FIXa*–FVIIIa–FX. Он соединяется с доменом сериновой протеазы при помощи активационного пептида и единственной дисульфидной связи.

Активационный пептид *FIX* содержит большую часть сайтов посттрансляционных модификаций, влияющих на свойства *FIX*, в том числе N-связанные олигосахариды [9]. Вследствие этого единственным существенным отличием рекомбинантного *FIXa*, полученного в клетках CHO, от природного *FIXa*, является уровень β -гидроксилирования остатка Asp64, составляющий в природном *FIX* 0.24 моль/моль, а в рекомбинантном – 0.4 моль/моль [8]. Блокирование этой посттрансляционной модификации при помощи ингибиторов 2-кетоглутарат-диоксигеназы не приводило к существенному изменению прокоагуляционной активности *FIX*. С-Концевой домен сериновой протеазы составляет около полови-

ны общей массы FIX, содержащийся в нем активный сайт скрыт активационным пептидом и экспонируется после его отщепления.

Из всех посттрансляционных модификаций только γ -карбоксилирование в домене Gla непосредственно определяет прокоагуляционную активность FIX. Тем не менее рекомбинантный FIX, полученный в клетках CHO, имеет одно существенное отличие от природного FIX в качестве лекарственного средства – уровень восстановления прокоагуляционной активности FIX *in vivo* у пациентов при инфузии препаратов рекомбинантного FIX в среднем в 1.29 раза ниже, чем в случае природного концентрата FIX человека [10]. Причины, вызывающие меньшее восстановление прокоагуляционной активности у рекомбинантного FIX, остаются неясными, поскольку сравнительные клинические исследования фармакокинетики препаратов FIX показывают несколько больший период полувыведения рекомбинантного FIX: 36 ч у рекомбинантного FIX против 32.7 ч у природного FIX [11]. Возможной причиной пониженного восстановления активности рекомбинантного FIX *in vivo* может быть отсутствие сульфатирования Tyr158 и/или фосфорилирования Ser155 в составе активационного пептида, однако доказательства в пользу этой гипотезы получены только на животных моделях гемофилии В [12].

Во многих случаях продуктивность систем гетерологичной экспрессии гена *FIX* человека определялась не уровнем биосинтеза собственно FIX, а способностью клетки-хозяина осуществлять его корректную посттрансляционную модификацию. В частности, значительная доля секретируемого FIX, продуцируемого в клетках CHO, неактивна при практически любом уровне удельной продуктивности, так как содержит непроцессированный пропептид, полностью блокирующий функционирование Gla-домена. Восстановление нормального процессинга пропептида FIX возможно при коэкспрессии субтилизин/кексин-подобной конвертазы PACE/furin или гомологичной ей конвертазы PC5. Наилучший уровень удаления пропептида у секретированного FIX может быть достигнут при коэкспрессии укороченного варианта PACE/furin человека, также секретируемого в культуральную среду. Таким образом, удаление пропептида может происходить не только в аппарате Гольджи, но и во внеклеточном пространстве [7].

Активность FIX также определяется уровнем γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене. В полностью активном FIX первые 10 остатков Glu из 12 должны быть конвертированы в остатки Gla. В молекуле природного FIX все 12 остатков Glu в Gla-домене полностью γ -карбоксилированы, а в препаратах рекомбинантного FIX уровень мо-

дификации двух последних остатков снижен, что не влияет на свойства FIX. Следует отметить, что стандартный метод очистки рекомбинантного FIX при помощи анионообменной хроматографии с элюцией раствором CaCl_2 при низкой ионной силе позволяет эффективно удалять молекулы FIX с нефункциональным Gla-доменом, поэтому недостаточный уровень γ -карбоксилирования FIX влияет скорее на выход готового продукта, чем на удельную прокоагуляционную активность очищенного FIX. Общее число остатков Gla в очищенном рекомбинантном FIX из клеток CHO достигает 11.5 на одну молекулу белка, а удельная прокоагуляционная активность составляет не менее 200 МЕ/мг, что не отличается от удельной активности природного белка.

Реакцию γ -карбоксилирования остатков Glu в молекулах витамин К-зависимых белков осуществляет витамин К-зависимая γ -глутаминкарбоксилаза (GGCX [КФ 4.1.1.90]) [13], реакция происходит в просвете эндоплазматического ретикулума и предшествует транслокации пробелков в аппарат Гольджи. Источником присоединяемой карбоксильной группы служит растворенный углекислый газ, а донором электронов и кофактором GGСХ – восстановленная дигидрохиноновая форма витамина К (KH_2), превращающаяся при прохождении реакции в 2,3-эпоксид хинона ($\text{K}>\text{O}$). Реакция γ -карбоксилирования требует постоянного поддержания существенной концентрации KH_2 в просвете эндоплазматического ретикулума. Восстановление $\text{K}>\text{O}$ до KH_2 в клетках позвоночных катализируется ферментным комплексом VKOR, или VKORC (vitamin K oxidoreductase complex), основным компонентом которого является интегральный белок – субъединица 1 комплекса 2,3-эпоксид-редуктазы витамина К (VKORC1 [КФ 1.1.4.1]) [14].

При попытках сверхэкспрессии в клетках CHO гена фактора свертывания крови VII человека (FVII), витамин К-зависимого белка, Gla-домен которого функционален только при полном γ -карбоксилировании всех 12 остатков Glu, установлено, что доля функционально активных молекул FVII очень низка и сверхэкспрессия GGСХ не приводит к повышению удельной активности FVII. Одновременно с этим сверхэкспрессия гена *FVII* в клетках линий HepG2 (клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека) и ВНК (клетки почки сирийского хомяка) позволяет получать преимущественно функционально активный белок. Причиной различий в способности клеток разных линий обеспечивать протекание реакции γ -карбоксилирования является различный уровень активности комплекса VKOR. Сверхэкспрессия гена *VKORC1* человека в клетках линии CHO позволяет получить функционально ак-

тивный продукт и существенно повысить скорость секреции фактора VII [15].

Сходные данные получены для FIX, секретируемого клетками линии ВНК [16]. В системах экспрессии фактора IX в клетках CHO, лимитированных уровнем процессинга пропептида целевого белка, уровень γ -карбоксилирования, обеспечиваемый эндогенным ферментом VKORC1, был достаточен для получения фактора IX с полной функциональной активностью [7]. Тем не менее при существенном увеличении уровня экспрессии гена *FIX* степень γ -карбоксилирования остатков Glu в Gla-домене может существенно снизиться, на что указывают сильные различия в уровне секреции FIX клетками линии HepG2 (трансформированные гепатоциты) и линиями клеток, полученных из других тканей [17]. Клетки HepG2 обладают высокой активностью VKORC1 и соответственно секретируют FIX более эффективно.

Обычным способом увеличения витамин K-оксидоредуктазной активности в культивируемых клетках считается их трансфекция плазмидой, кодирующей известный ген *VKORC1* человека. Однако относительная каталитическая эффективность этого метода в клетках других видов млекопитающих не очевидна. Ортологи *VKORC1* разных видов млекопитающих не полностью гомологичны друг другу, и их каталитическая эффективность *in vitro* различается примерно в 4 раза [18]. В настоящий момент белковый состав комплекса VKOR не установлен. Наиболее вероятным источником электронов для работы VKORC1 считают тиоредоксин-подобные белки эндоплазматического люмена, в том числе TMX [19]. Мембранная топология VKORC1 установлена только по аналогии с бактериальным белком из *Synechococcus* sp. Пространственная цепь переноса электронов к цистеинам активного центра VKORC1 пока не описана, в отличие от его гомолога VKORC1L1 [20].

Мы предположили, что низкая активность комплекса VKOR в клетках линии CHO может быть вызвана не низкой каталитической эффективностью собственного VKORC1 китайского хомячка, а лишь недостаточным уровнем его экспрессии. Таким образом, требуемый максимальный уровень секреции FIX человека в клетках CHO может быть обеспечен путем коэкспрессии целевого гена, растворимого варианта *PACE/furin* человека и VKORC1 китайского хомячка. При этом необходимый уровень экспрессии вспомогательных генов может быть определен путем отбора клональных линий клеток-продуцентов по доле коагуляционно активных молекул FIX с удаленным пропептидом. Получение и характеристика таких линий-продуцентов FIX являются целью настоящей работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание генетических конструкций для экспрессии генов

Создание экспрессионных векторов p1.1, p1.2-Zeo и p1.2-Hyg описано в работе [21]. Фрагменты ДНК, кодирующие целевые открытые рамки считывания (ОРС) генов *FIX* человека, *VKORC1* человека или китайского хомячка, или фурина человека, слитые с консенсусной последовательностью Козак (GCCGCCATGG) [22], получали методом ПЦР с использованием соответствующих адапторных праймерных олигонуклеотидов. Продукты ПЦР выделяли из 1% агарозного геля, используя набор реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США), и лигировали с Т-вектором pAL-TA («Евроген», Москва) при помощи ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas, Литва). ПЦР проводили с использованием олигонуклеотидов и смесей для ПЦР Encyclo PCR kit, Tersus polymerase mix, ScreenMix-HS («Евроген») на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research, США). Молекулярное клонирование проводили в штамме *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen, США). Плазмидную ДНК выделяли при помощи набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Литва).

В качестве источника ОРС FIX использовали коммерчески доступный клон кДНК FIX человека pCMV6-XL4/NM_000133.2 (sc126517, Origene, США) и адапторные праймеры AD-9-AbsF и AD-9-NheR, приведенные в табл. 1. Область ОРС VKORC1 человека амплифицировали с плазмиды pCMV6-XL4/NM_024006.4 (sc112318, Origene) с праймерами AD-hVKO-AbsIF и AD-hVKO-NheIR.

С целью получения ОРС VKORC1 китайского хомячка из 2 млн клеток CHO DG44 реагентом TRI Reagent (MRC) выделяли суммарную РНК. кДНК синтезировали при помощи набора MINT («Евроген»), используя 2 мкг РНК-матрицы. Амплификацию кДНК проводили с помощью набора Encyclo PCR Kit, для ПЦР области ОРС использовали праймеры vkof1, vkof2, vkor1. Продукт ПЦР клонировали в вектор pAL-TA с получением плазмиды pAL-CHOVKORC1. Нуклеотидная последовательность вставки была депонирована 03.04.2012 в GenBank под номером JQ400047.1. Аминокислотная последовательность ОРС фермента VKORC1 клеток CHO DG44 депонирована в GenBank (03-APR-2012) под номером AFG26681.1. При помощи адапторных праймеров AD-CVKO-AbsIF и AD-CVKO-NheIR и плазмиды pAL-CHOVKORC1 в качестве матрицы получили ПЦР-продукт, содержащий ОРС VKORC1 китайского хомячка с добавленными сайтами рестрикции для субклонирования в экспрессионный вектор.

Таблица 1. Праймеры для клонирования и секвенирования экспрессионных плазмид

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
FIX	
AD-9-AbsF	ttcctcgaggccgccaccatgcagcgcgtgaac atg
AD-9-NheR	atgctagctttcattaagtgagctttg
9SQf	cggtatgtcaactggattaag
9-AS	ctgctggttcacaggactt
VKORC1	
vkof1	gtcgacatgggcaccacctgag
vkof2	gacatgggca ccacctggag gagccc
vkor1	ctcagggccttttgctgtgttc
AD-CVKO-AbsIF	ttcctcgaggccgccaccatgggcaccacctgg
AD-CVKO-NheIR	atgctagctcaggccctttt ggct
AD-hVKO-AbsIF	ttcctcgaggccgccaccatgggcagcactgg ggga
AD-hVKO-NheIR	atgctagctcagtgcctcttagccttg
Фурин	
AD-FUR-AbsF	ttcctcgaggccgccaccatggagctgaggcctg
AD-FUR-NheR	aatctagactatcactcaggcaggtgtgagggc
IP-fVQ-F	gctgcagaggagcctcaagtacagtggctgga acagcaggtg
IP-fVQ-R	cacctgtgttccagccactgtacttgaggctccc tctgcagc
SQ-FUR639-F	caacggtgtctgtggttagg
SQ-FUR1228-F	gccacctcaatgccaacg
SQ-FUR1563-R	cagggtggagcgggtg
SQ-fVQ-R	gttccagccactgtactg
Праймеры к векторам	
T7prom	taatacgactcactataggg
SP6	gatttagtgacactatag
3CH1-Rev	acaaacagttctgagaccg
SQ-5CH6-F	gccgctgcttctctgtgac
IRESArev	aggtttccgggccctcacattg

ОПС PACE/furin человека получали путем ПЦР с использованием праймеров AD-FUR-AbsF и AD-FUR-XbaR и плазмиды SC118550 (Origene) в качестве матрицы. ПЦР-продукт, содержащий ОПС растворимого делеционного варианта протеазы PACE/furin человека с делецией двух аминокислот (VQ), клонировали в вектор pAL-TA с образованием плазмиды pAL-Fur, после чего приводили ОПС в соответствие с эталонной последовательностью

NM_002569, вводя шесть недостающих нуклеотидов методом инвертированной ПЦР с использованием праймеров IP-fVQ-F и IP-fVQ-R. Мутагенез проводили согласно [23] со следующими модификациями: праймеры фосфорилировали полинуклеотидкиназой фага Т4 («Сибэнзим») в буфере для ДНК-лигазы фага Т4 (Fermentas) в течение 30 мин при 37°C. ПЦР проводили с помощью набора Encyclo PCR kit по следующей схеме: 1 цикл – 4 мин, 94°C, 2 мин, 50°C, 2 мин, 72°C; затем 11 циклов – 1 мин, 94°C, 1 мин, 55°C, 2 мин, 72°C; разводили вдвое однократным буфером для эндонуклеазы DpnI, добавляли 10 ед. акт. этой эндонуклеазы и инкубировали при 37°C в течение 30 мин, затем инкубировали при 72°C с 2.5 ед. акт. полимеразы Pfu еще 30 мин, продукт ПЦР очищали и лигировали. Для поиска измененных участков ДНК методом ПЦР с колоний использовали специфический олигонуклеотид SQ-fVQ-R.

Полученные плазмиды pAL-F9, pAL-hVKORC1-AN, pAL-CHOVKORC1-AN, pAL-FurVQ секвенировали в области вставки, правильные ОПС встраивали в экспрессионные векторы p1.1, p1.2-Zeo или p1.2-Hug по AbsI-NheI-сайтам. ДНК для трансфекции выделяли с помощью препаративного набора EndoFree Plasmid MaxiKit (Qiagen, США) или ДНК GeneJet™ Midi (Fermentas). Перед трансфекцией секвенировали основные функциональные элементы векторов и повторно области целевых ОПС. Плазмиды линейаризовали эндонуклеазами PvuI (p1.1 и p1.2-Zeo) или BspHI (p1.2-Hugro), осаждали этанолом, растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и стерилизовали фильтрацией через 0.22-мкм фильтры (Millipore, США).

Культивирование клеток CHO DG44 (Invitrogen) и трансфекцию плазмидой p1.1-F9 проводили как описано в [21]. Через 48 ч после трансфекции клетки помещали в селекционную среду CD CHO (Invitrogen) с 200 нМ метотрексата (MTX) и 8 мМ глутамина и культивировали до восстановления жизнеспособности клеток выше 85% (около 20 дней), пассивруя 1 раз в 3–4 дня. Полученную популяцию клеток клонировали методом предельных разведений (1 клетка на лунку) в среде EX-CELL® CHO Cloning Medium (Sigma-Aldrich) с добавлением 8 мМ глутамина и без MTX. Продуктивные клоны определяли методом ИФА, отобранные клоны последовательно переносили в 24-луночные планшеты, затем в 6-луночные планшеты с культуральной средой ProCHO 5 (Lonza, Швейцария) с 8 мМ глутамина и переводили в суспензионный режим культивирования. Среди клональных культур, не потерявших жизнеспособность в условиях суспензионного культивирования, с помощью ИФА отбирали наиболее

продуктивные. Для дальнейшей амплификации использовали клон p1.1-F9-T2/S.

Амплификацию проводили в колбах Эрленмейера с 30 мл среды ProCHO с 8 мМ глутамина с добавлением 1, 2, 4 мМ МТХ до восстановления жизнеспособности клеток выше 85% в течение 15–20 дней. Полученную в присутствии 4 мМ МТХ культуру клеток с наибольшей удельной продуктивностью использовали во втором клонировании методом предельных разведений. Отобрали клон 3В12, который реадаптировали для суспензионного культивирования в среде ProCHO 5 и использовали для последовательной котрансфекции линейаризованных плазмид p1.2-Hyg-Fur и p1.2-Zeo-VKORC. Селекцию стабильно трансфицированных популяций проводили при помощи антибиотиков гигромицина Б и зеоцина соответственно. Поликлональную популяцию 3В12-FurVC использовали для окончательного клонирования методом предельных разведений как описано выше. Полученные клоны были последовательно разделены на группы по уровню экспрессии растворимого PACE/furin и уровню прокаогуляционно активного FIX. Отобранные клоны повторно адаптировали к среде ProCHO 5 с 8 мМ глутамина и 1 мМ витамина К3 (менадионсульфат, Sigma-Aldrich) и суспензионному культивированию в колбах Эрленмейера.

ПЦР в реальном времени

ПЦР-РВ проводили с использованием амплификатора iCycler iQ (Bio-Rad, США) и готовой реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген»), содержащей интеркалирующий краситель SYBR Green I. Каждую реакцию повторяли 3 раза в объеме 25 мкл, в 3–5 повторях. Геномную ДНК выделяли при помощи набора Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega). Суммарную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Для получения необходимых количеств кДНК использовали по 1 мкг суммарной РНК и набор реактивов Mint («Евроген»).

Праймеры для ПЦР-РВ подбирали при помощи программы Beacon Designer v7.51, проверяли на специфичность при помощи NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Использовали праймеры, негомологичные последовательностям китайского хомячка (к области FIX и IRES-DHFR). Данные ПЦР-РВ обрабатывали, используя программу iCycler Iq4, включая расчет эффективности реакций. Число копий вставки экспрессионной кассеты в геноме рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для серийных разведений плазмиды p1.1-F9. Результаты ПЦР сравнивали с результатами для контрольного ампликона из состава гена PPIB, представленного в ге-

Таблица 2. Специфические праймеры для ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5' → 3'
RT-F9-F	ttagatgtaacatgtaacattaagaatggcag
RT-F9-R	cattaaatgattgggtgctttgag
RT-ID-F	gccacaagatctgccaccatg
RT-ID-R	gtaggtctccgttcttgcacaatc
RT-HYG-F	ttcgctccaacaatgctc
RT-HYG-R	gtctgctgctccatacaag
RT-Zeo-F	agttgaccagtccgttcc
RT-Zeo-R	ggcgaagtctgctctccac
RT-FURC-F	agcgggacctgaatggaag
RT-FURC-R	ggtgttctctctgatgcca
RT-PPIB-F	gcaggcaagacaccaatg
RT-PPIB-R	ctccacctctcactacatc
RT-bACT-F	gctctttccagccttctt
RT-bACT-R	gagccagagcagtgatctcc
RT-cVKOspN-F	aacgggtttgccgtcagaac
RT-cVKOspN-R	cggtaatcctctgctcgg
RT-cVKOspC-F	gggcttgatgttgcttaatttc
RT-cVKOspC-R	gcaggtgttaggggtaaatg

номе клеток CHO только 1 раз, по поисковой выдаче алгоритма BLAST из базы данных NCBI Nucleotide Collection.

Уровень экспрессии мРНК рассчитывали с использованием относительного метода $\Delta\Delta C_q$ для праймеров с известной эффективностью ПЦР. Относительное увеличение уровня (разы) экспрессии гена, нормированного по контрольному гену, определяли по формуле из [24].

Праймеры для оценки копийности экспрессионной кассеты в геноме и уровня мРНК приведены в табл. 2.

Саузерн-блот гибридизация

Биотиновую метку вводили в ДНК при помощи набора Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Fermentas). В качестве матрицы для получения зондов использовали плазмиду pAL-ID, содержащую общие с экспрессионными плазмидами p1.1 области начала репликации гена бета-лактамазы, EMCV IRES, OPC DHFR [21], либо продукт амплификации плазмиды p1.1-F9 с праймеров AD-9-AbsF и AD-9-NheR, соответствующий OPC FIX. Геномную ДНК для блоттин-

га расщепляли эндонуклеазой *AraI* в течение 16 ч и разделяли в 0.8% агарозном геле. Подготовку геля и перенос на мембрану Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare, США) проводили по протоколу производителя мембраны в буфере с высокой ионной силой 20 × SSC (3 M NaCl, 0.3 M цитрат натрия) в течение 16 ч. ДНК фиксировали нагреванием мембраны до 80°C в течение 2 ч. Прегибридизацию и гибридизацию проводили по [25] в растворе 7% додецилсульфата натрия, 0.5 M фосфата натрия, pH 7.2, 1% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 16 ч при 65°C. Мембрану промывали по протоколу производителя, детекцию проводили при помощи набора Biotin Chromogenic Detection Kit (Fermentas).

Измерение концентрации FIX методом ИФА

Концентрацию FIX определяли по [26] с использованием в качестве иммобилизованного антитела поликлональные антитела кролика к FIX (LifeSpan BioSciences, США) по 50 нг/лунку. В качестве специфичного антитела использовали моноклональные антитела мыши Н1Х-1 (F2645, Sigma-Aldrich). Образцы вносили в лунки без разведения или разводили в PBS с 1% БСА. Долю молекул FIX с неотделенным пропептидом определяли при помощи ИФА, используя в качестве иммобилизованных антител аффинно очищенные антитела кролика к синтетическому пептиду, соответствующему пропептиду FIX человека, согласно [27]. Остальные шаги ИФА проводили как указано выше.

Прокоагуляционную активность FIX определяли методом активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) при помощи «фактор IX-тест» производства НПО «Ренам» (Москва). В качестве стандарта активности использовали рекомбинантный FIX в составе лекарственного средства Benefix (Wyeth, США). Измерения проводили при помощи оптического коагулометра ThromboScreen 400c (Pacific Hemostasis, США).

Измерение активности фурина

Активность фурина определяли при помощи пептидного субстрата с отделяемой группой 7-амино-4-метилкумарина P_{yr}-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC (344935, Merck Millipore, США) по [27].

Измерение активности VKORC1

Активность VKORC1 измеряли с использованием ДТТ в качестве донора электронов по методике [28]. Субстрат ферментативной реакции – 2,3-эпоксид витамина K1 (K > O) – синтезировали и очищали из хиноновой формы витамина K1 (Sigma Aldrich, США) [29].

Выделение и очистка FIX

FIX выделяли и очищали по следующей методике: культуральную среду наносили на колонку с сорбентом Capto MMC, уравновешенную раствором 20 mM цитрата натрия, pH 7.0, 100 mM NaCl, 0.02% Твин-80, промывали раствором 20 mM цитрата натрия, pH 7.0, 0.1 M NaCl. FIX элюировали раствором 20 mM цитрата натрия, pH 6.5, 200 mM NaCl, 0.5 M аргинина, 0.02% Твин-80. Элюат разбавляли в 4 раза водой и наносили на колонку с сорбентом Capto Q, уравновешенную раствором 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; промывали раствором 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 200 mM NaCl и проводили ступенчатую элюцию растворами 50 mM Tris-HCl pH 8.0; 10 mM CaCl₂, 100–500 mM NaCl. Фракции элюата, содержащие FIX с полной прокоагуляционной активностью, разбавляли водой в 2 раза и наносили на колонку с сорбентом Capto Heparin, уравновешенную раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 100 mM NaCl, промывали колонку раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 200 mM NaCl. FIX элюировали раствором 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 500 mM NaCl. Раствор очищенного FIX концентрировали ультрафильтрацией при помощи кассеты VivaFlow200 10 кДа PES (Sartorius Stedim, Германия) и переводили в раствор хранения, содержащий 8 mM L-гистидина, 0.8% сахарозы, 208 mM глицина, pH 7.2 и 0.004% Твин-80. Раствор очищенного FIX разделяли на аликвоты, замораживали и хранили при температуре ниже –70°C.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линии клеток СНО, экспрессирующих ген фактора IX человека

Область открытой рамки считывания FIX с добавленной синтетической консенсусной последовательностью Козак и блоком стоп-кодонов клонировали в ранее разработанный нами экспрессионный вектор p1.1 на основе некодирующих областей гена фактора элонгации трансляции 1α-альфа китайского хомячка с образованием экспрессионной плазмиды p1.1-F9 (рис. 1).

Протяженные геномные области и ген фактора элонгации трансляции 1α-альфа китайского хомячка обеспечивали высокий уровень экспрессии целевых генов и постоянство этого уровня в течение нескольких месяцев последовательных пересевов [21]. Область ОРС гена *FIX* в плазмиде p1.1-F9 была соединена с селекционным маркером – дигидрофолатредуктазой мыши (DHFR) при помощи аттенюированного внутреннего сайта связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV IRES), что обеспечивало экспрессию единой бицистронной мРНК. Такая структура обеспечивает максимально возможное сцепление целевого гена и селекционного марке-

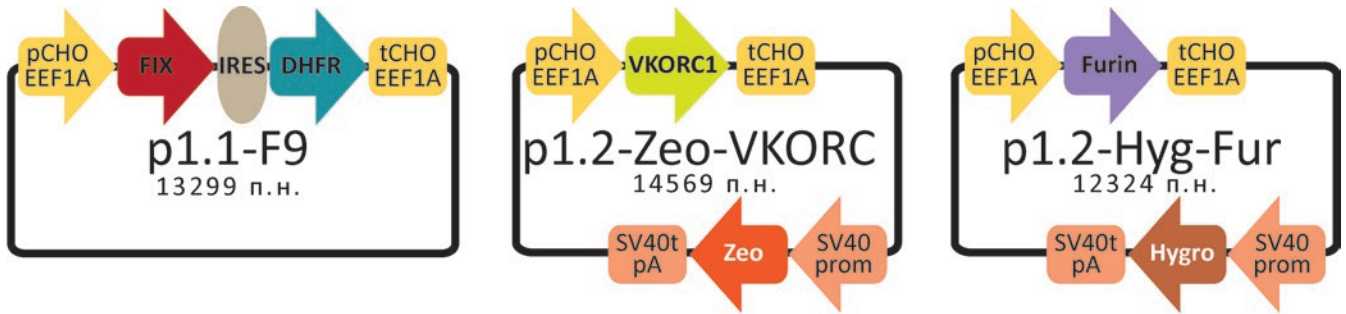


Рис. 1. Схемы экспрессионных плазмид p1.1-F9, p1.2-Zeo-VKORC, p1.2-Hyg-Fur. pCHO EEF1A – функциональный промотор гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 5'-нетранспируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита (EMCV); DHFR – открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши для селективного отбора и амплификации в эукариотических клетках; tCHO EEF1A – функциональный терминатор и сигнал полиаденилирования гена фактора элонгации 1 альфа китайского хомячка, 3'-нетранспируемая область этого гена и нетранскрибируемая область, фланкирующая этот ген; FIX – ОПС фактора IX свертывания крови человека; VKORC – ОПС VKORC1 китайского хомячка; SV40 prom – область промотора вируса SV40; SV40t pA – терминатор и сигнал полиаденилирования вируса SV40; Zeo – ОПС гена *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* bleomycin), обеспечивающего устойчивость к зеоцину; Furin – ОПС протеазы PACE/furin человека; Hygro – ОПС гигромицин-фосфотрансферазы. Стрелками указаны направления действия промоторов и транскрипции генов

ра, что необходимо для амплификации генетических кассет, интегрированных в геном клеток-продуцентов.

Плазмиду p1.1-F9 линейаризовали с разрушением гена бета-лактамазы и использовали для трансфекции клеток линии CHO DG44, дефектных по обоим аллелям гена *dhfr*. Через 48 ч после трансфекции клетки подвергали первичной селекции в присутствии трех различных концентраций метотрексата – 50, 100, 200 нМ. Во всех трех случаях получены стабильно трансфицированные популяции клеток с уровнями секреции FIX 0.69 ± 0.04 , 1.05 ± 0.05 и 1.83 ± 0.24 мкг/мл по данным ИФА соответственно при времени удвоения культур 27–29 ч. Максимальный титр FIX зафиксирован в культуре, полученной в присутствии 200 нМ МТХ, поэтому был проведен иммуноблотинг внутриклеточного и секретируемого этой культурой FIX (рис. 2А). Иммунореактивные полосы FIX с некорректной молекулярной массой не были обнаружены, что косвенно свидетельствовало об отсутствии повреждений генетических кассет, интегрированных в геном клеток. Полученную поликлональную культуру использовали для клонирования клеток методом предельных разведений. Клональные линии-продуценты FIX с максимальным титром продукта повторно адаптировали к условиям культивирования в суспензии среде без добавок нуклеотидов и ингибиторов DHFR. Уровень секреции FIX тремя лучшими клональными линиями составил 11.9 ± 0.4 ,

12.3 ± 0.4 , 9.9 ± 0.3 мкг/мл после 3 дней культивирования. Для дальнейшей работы выбрали клональную линию p1.1-F9-T2/S с удельной продуктивностью (Qp) 2.99 ± 0.06 пг/клетка/день и временем удвоения 22.5 ч.

Продуктивность клональной линии увеличивали путем амплификации целевого гена под действием возрастающих концентраций метотрексата. После повышения концентрации МТХ до 4 мкМ получили олигоклональную линию клеток с Qp 5.97 ± 0.18 пг/клетка/день, которую использовали для второго клонирования методом предельных разведений. Среди 12 наиболее продуктивных клонов клеток, повторно адаптированных к суспензионному культивированию, отобрали клон p1.1-F9-T2/4к-3В12 (далее в тексте и на рисунках – 3В12) с Qp 10.7 ± 0.4 пг/клетка/день и временем удвоения культуры 20.2 ч (рис. 2В).

Получение линии клеток, секретирующих биологически активный FIX

FIX, секретируемый клональной клеточной линией 3В12, был практически полностью неактивным. Прокоагуляционная активность FIX в культуральной среде составляла 0.22 МЕ/мл при общей концентрации 59 мкг/мл (определение методом ИФА), что соответствовало удельной активности, составляющей 1.8% от активности природного фактора IX человека. Отсутствие биологической активности FIX могло быть вызвано двумя известными причинами – недо-

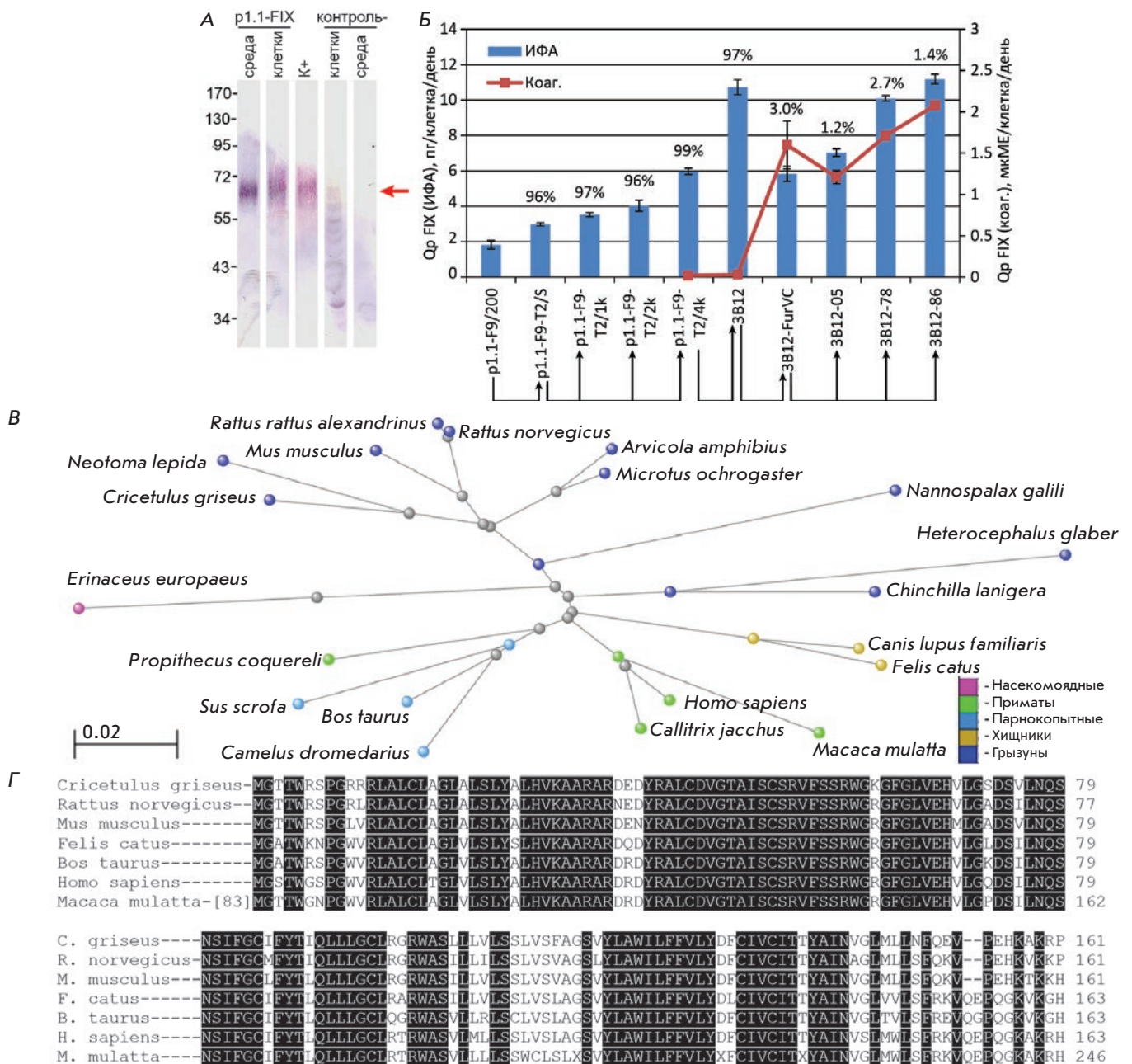


Рис. 2. Целостность секретируемого и внутриклеточного FIX линии клеток p1.1-F9-T2/S, уровни секреции FIX и изменение прокоагуляционной активности в линиях-производителях, филогения VKORC1 китайского хомячка. **А** – иммуноблоттинг секретируемого и внутриклеточного FIX. Электрофорез в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, детекция поликлональными антителами к фактору IX, молекулярная масса полос маркера указана в кДа. Обозначения: K+ – стандарт рекомбинантного FIX, контроль– – нетрансфицированные клетки CHO DG44. Положение полноразмерного FIX обозначено стрелкой. **Б** – уровень секреции FIX и степень отделения пропептида в популяциях клеток и клональных линиях. Удельная продуктивность линий клеток, измеренная методом ИФА, обозначена столбиками, левая шкала. Удельная продуктивность в терминах прокоагуляционной активности приведена как ломаная линия, правая шкала. Доля молекул FIX с отделенным пропептидом (%), определенная по ИФА, приведена над соответствующими столбиками. Удельная продуктивность для обоих методов приведена как среднее и стандартное отклонение, $n = 2$. Стрелками обозначен порядок получения соответствующих линий и популяций клеток. **В** – таксономическое дерево VKORC1 млекопитающих, визуализировано при помощи программы Tree-Viewer (NCBI, США). Масштабный отрезок показывает эволюционное расстояние, соответствующее числу замен на одну аминокислоту. **Г** – множественное выравнивание последовательностей вариантов VKORC1 нескольких видов млекопитающих. Консервативные аминокислотные остатки обозначены черным фоном

Таблица 3. Уровень активности VKORC1 в стабильно трансфицированных клетках

Плазмида	Удельная активность VKORC1, % конверсии субстрата на 1 мг/мл общего белка в лизате за 1 ч	Относительный уровень увеличения активности VKORC1, разы
Интактные клетки CHO DG44	0.38	-
p1.2-Zeo-VKORC1	9.21	24.2
p1.2-Zeo-hVKORC1	3.03	8.0

Примечание: удельную активность рассчитывали для диапазонов линейной зависимости уровня конверсии субстрата от концентрации общего белка в лизатах.

статочным γ -карбоксилированием его Gla-домена [7] и сохранением пропептида у секретированных молекул FIX, что связано с невозможностью осуществления сколько-нибудь эффективного процессинга пропептида FIX эндогенными протеазами семейства PACE/furin клеток-хозяев [7].

Правильный процессинг пропептида фактора IX человека может быть обеспечен коэкспрессией гена сигнальной протеазы PACE/furin человека. Для коэкспрессии растворимого укороченного варианта PACE/furin человека мы использовали вектор p1.2-HYG, аналогичный вектору p1.1, но содержащий расположенный вне контекста гена *EEF1A* ген гиромидин-фосфотрансферазы под контролем промотора SV40, обеспечивающий устойчивость к антибиотику гиромидину B (рис. 1).

Для сверхэкспрессии эндогенного VKORC1 мы клонировали область открытой рамки считывания гена *vkorc1* из кДНК клеток CHO DG44 при помощи праймеров, гомологичных началу и концу ОРС гена *vkorc1* мыши. Секвенирование клонированного продукта ПЦР выявило приблизительно одинаковый уровень гомологии между *vkorc1* китайского хомячка и *vkorc1* мыши и человека (рис. 2B). VKORC1 китайского хомячка, в отличие от его ортологов у других млекопитающих, содержит мотив RRR [30] на границе первого трансмембранного домена и обладает значительно меньшей гомологией с *vkorc1* человека (рис. 2Г).

Охарактеризованная область ОРС гена *vkorc1* китайского хомячка депонирована в GenBank (AFG26681.1), а также клонирована в вектор p1.2-Zeo с образованием плазмиды p1.2-Zeo-VKORC1 (рис. 1). На основе того же вектора экспрессии создана также контрольная конструкция p1.2-Zeo-hVKORC1, содержащая область ОРС *vkorc1* человека.

На основе клеток CHO DG44 получены стабильно трансфицированные поликлональные популяции, экспрессирующие оба ортолога гена *vkorc1*. В лизате клеток была измерена витамин

K-оксидоредуктазная активность, а также определено число копий интегрированных экспрессионных кассет. Сверхэкспрессия обоих ортологов *vkorc1* привела к сильному увеличению оксидоредуктазной активности в лизате клеток (табл. 3), при этом VKORC1 китайского хомячка обеспечивал втрое большую удельную ферментативную активность, чем VKORC1 человека при практически одинаковом числе копий интегрированных кассет – 5.8 ± 0.3 и 5.5 ± 0.5 копии/геном для генов *vkorc1* китайского хомячка и человека соответственно. Уровень транскрипции обоих ортологов также не имел существенных отличий – у мРНК VKORC1 китайского хомячка составил $0.12 \pm 0.03\%$ от уровня мРНК β -актина; у мРНК VKORC1 человека – 0.09 ± 0.01 ; $P = 0.16$. Одновременно с этим обнаружено, что максимальная скорость конверсии субстрата VK > O микросомальной фракцией белков, полученных из клеток, трансфицированных геном VKORC1 человека, составляет около 5% в 1 ч, а в случае VKORC1 китайского хомячка – не менее 9% в 1 ч (данные не приведены). Поскольку сверхэкспрессия аутологичного гена *vkorc1* в клетках CHO позволяет добиться максимальной витамин K-оксидоредуктазной активности, то этот вариант *vkorc1* использовали для котрансфекции линии клеток-продуцентов FIX.

Клетки клональной линии 3B12 последовательно трансфицировали линейаризованными плазмидами p1.2-Zeo-VKORC и p1.2-Hygro-Fur. В полученной популяции стабильно трансфицированных клеток, содержащих три генетические кассеты – для экспрессии фактора IX и двух вспомогательных ферментов, удельная прокоагуляционная активность FIX в культуральной среде составила 27% от стандарта, при этом по данным ИФА доля молекул секретированного FIX с неотделенным пропептидом составляла только 3.1% (рис. 2B). Таким образом, активность растворимого PACE/furin человека в полученной популяции клеток была достаточной для практически полного отделения пропептида, однако уровень

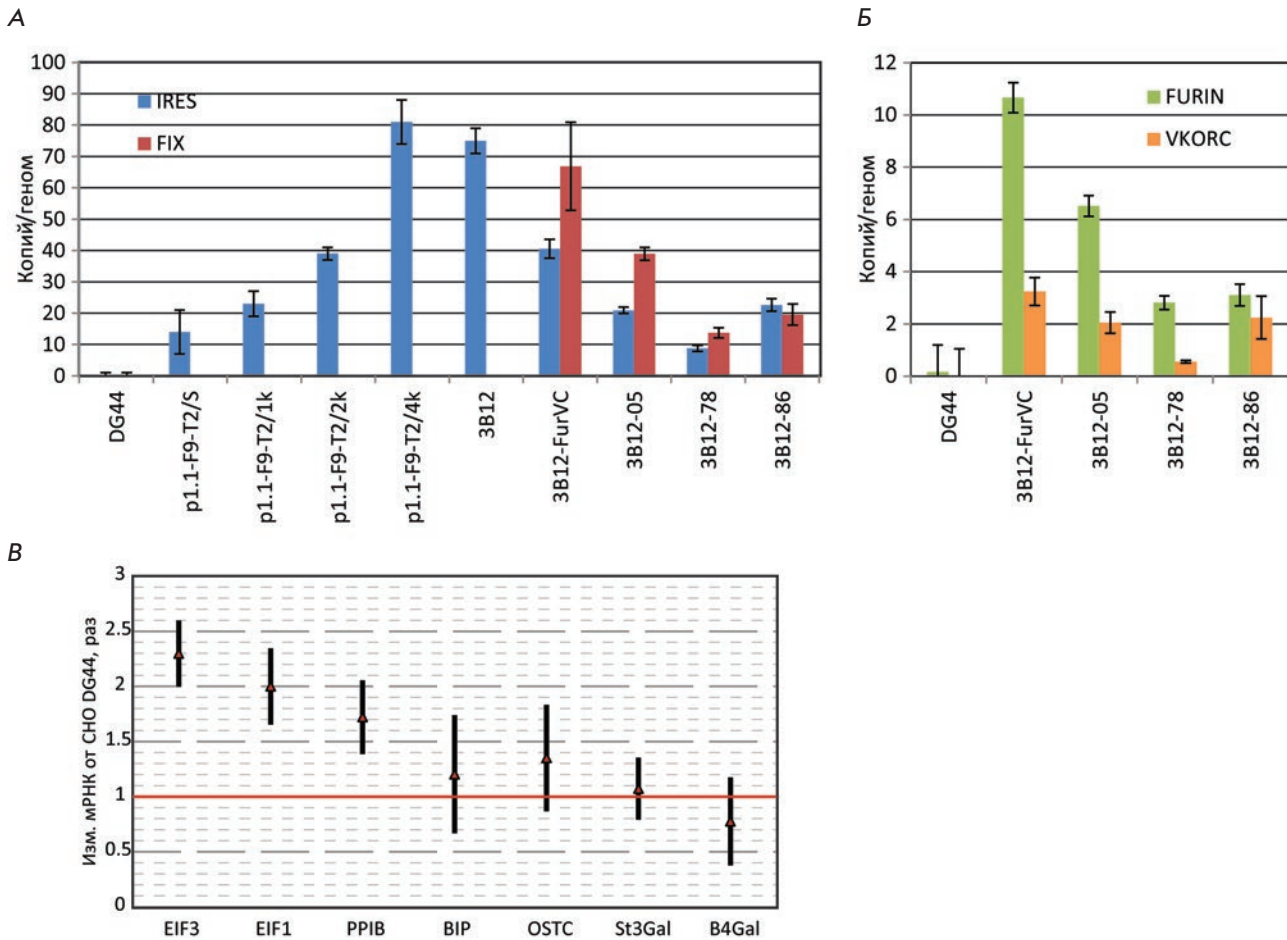


Рис. 3. Копийность целевого гена и вспомогательных генов ферментов фурина и VKORC1 в геноме линий-продуцентов, изменение уровня экспрессии генов домашнего хозяйства в линии клеток 3B12-86 методом количественной ПЦР. А – копииность гена *FIX* и области селекционного маркера (IRES). Обозначения: IRES – ампликон из области IRES и гена *DHFR*; *FIX* – ампликон из области OPC фактора IX. Б – копииность вспомогательных генов фурина и VKORC1. Обозначения – FURIN – ампликон из области OPC furin, VKORC – ампликон из области OPC VKORC1. В – изменения в уровне экспрессии генов CHO, связанных с процессами трансляции и посттрансляционных модификаций синтезируемых белков в сравнении с нетрансфицированными клетками CHO DG44. Нормирование результатов по уровню мРНК бета-актина. Обозначения: EIF1 – эукариотический фактор инициации трансляции 1а, EIF3 – эукариотический фактор инициации трансляции 3, PPIB – пептидилпролилизомераза В, BIP – иммуноглобулинсвязывающий белок (Grp78); OSTC – олигосахаридтрансфераза; St3Gal – бета-галактозид-альфа-2,3-сиалилтрансфераза 3; B4Gal – бета-1,4-галактозилтрансфераза 1. На всех панелях планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям, $n = 3-4$, приведены данные одного репрезентативного измерения из трех

γ -карбоксилирования в большей части клеток был недостаточным для правильного формирования Gla-домена FIX. Можно предположить, что не во всех стабильно трансфицированных клетках экспрессия вспомогательных ферментов была одинаково эффективной, но, в отличие от VKORC1, растворимый PACE/furin, выделяемый в культуральную среду частью клеток, обеспечивал отделение пропептида у всех секретированных молекул FIX.

Для выделения клеток, в которых максимально эффективно работают оба вспомогательных фер-

мента, т.е. образуется биологически активный FIX, провели клонирование полученной популяции методом предельных разведений, используя в качестве критериев отбора перспективных клонов прокоагуляционную активность секретируемого FIX и уровень пептидазной активности PACE/furin в культуральной среде. Из 199 первичных клонов клеток отобрали 80 с максимальной концентрацией FIX, из которых отобрали 24 клон с максимальной активностью PACE/furin, а из них 12 клонов с максимальной прокоагуляционной активностью FIX

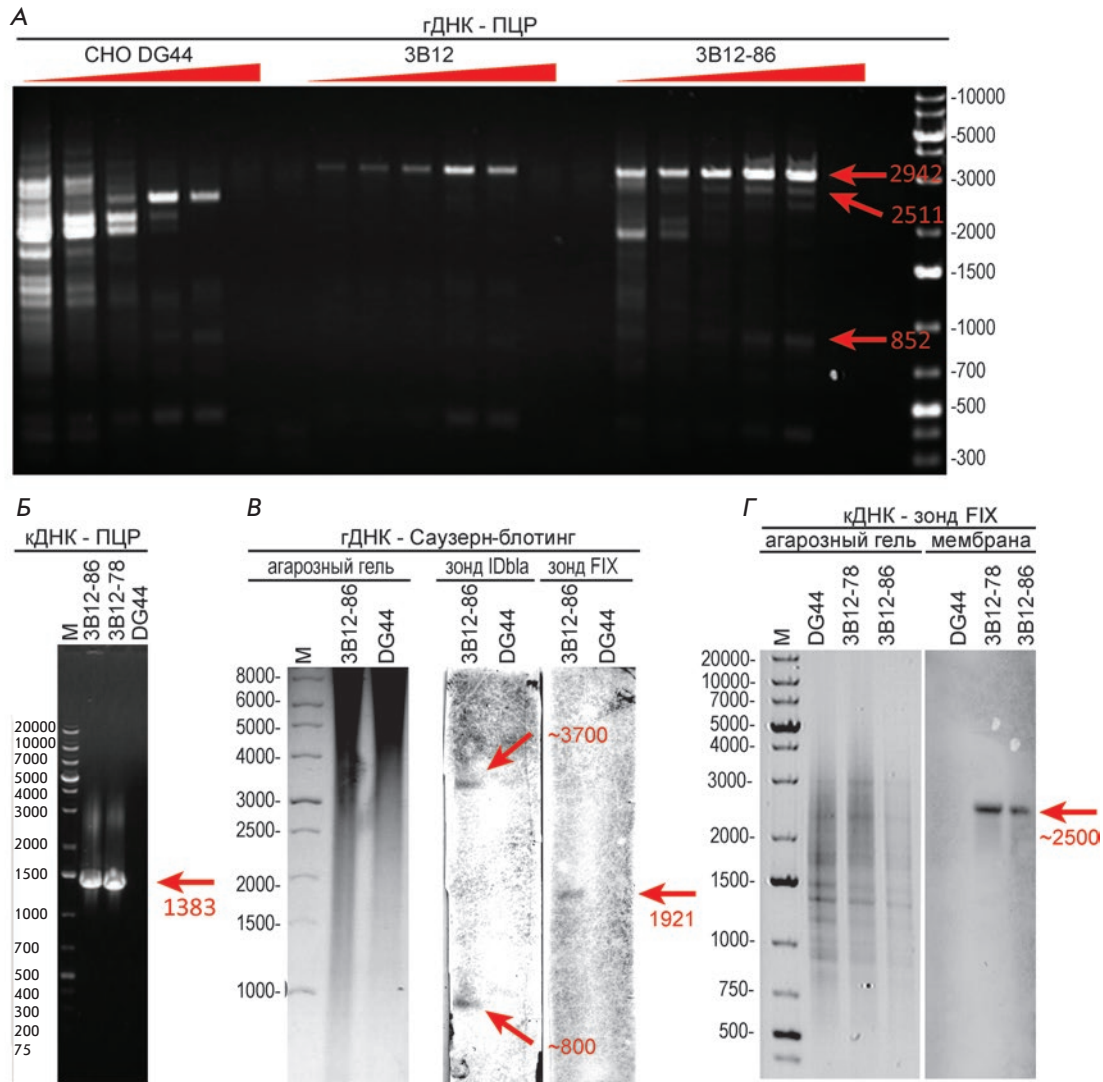


Рис. 4. Анализ области целевого гена в геномной ДНК и кДНК линий-продуцентов FIX методами ПЦР, ПЦР-РВ, Саузерн-блотинга и псевдонозерн-блотинга. Размеры полос маркера приведены в п.н. **А** – амплификация полных областей целевых генов в составе геномной ДНК (гДНК) методом ПЦР. Температурный градиент обозначен красными треугольниками, линейное изменение температуры отжига праймеров от 53 до 68. Красными стрелками обозначены продукты амплификации генов *FIX*, *фурина* и *VKORC1* соответственно. **Б** – ПЦР-РВ мРНК, праймеры к 5'- и 3'-концам ОРС *FIX*, красной стрелкой обозначен продукт амплификации ожидаемого размера. **В** – анализ геномной ДНК методом гибридизации по Саузерну с мечеными биотином зондами. Зонд IDbla – зонд, направленный к областям IRES, DHFR, гена устойчивости к ампициллину *bla* и области инициации репликации плазмид *ori*, зонд *FIX* – зонд к области ОРС *FIX*. Красными стрелками указаны размеры обнаруженных рестриционных фрагментов. Изображение электрофореграммы инвертировано, контраст изображений мембран увеличен для улучшения видимости. **Г** – анализ кДНК методом псевдонозерн-гибридизации. Обозначения как на панели **В**, стрелкой указан фактический размер кДНК *FIX*

(данные не приведены). Пять из 12 отобранных таким образом клональных линий успешно адаптировали к суспензионному культивированию в присутствии водорастворимого витамина К3, удельная прокоагуляционная активность *FIX* у всех клонов составляла более 185 МЕ/мг. Среди этих пяти кло-

нов была определена основная линия 3B12-86 с Q_p 11.2 ± 0.3 пг/клетка/день и две запасные линии – 3B12-78 и 3B12-05.

Копийность гена *FIX*, области его селекционного маркера и вспомогательных генов в геноме линий-продуцентов и родительских популяций кле-

Таблица 4. Таблица очистки FIX

Название фракции	FIX:Ag, МЕ/мл	Объем фракции, лм	FIX:C, МЕ/мл	FIX:Ag, МЕ	Общий белок по УФ, мг	FIX:C, МЕ	FIX:C/белок, МЕ/мг	FIX:Ag/белок, МЕ/мг	Выход стадий по FIX:Ag	Общий выход по FIX:Ag	Доля FIX с пептидом, %
Культуральная среда	6.04	115	3.6	695	-	414	-	-	-	-	2.6
Capto MMC фракция проскока и промывки	0.166	273	-	45	-	-	-	-	7%	-	-
Capto MMC элюат	64.79	9	-	583	4.28	-	-	136	84%	84%	-
Capto Q фракция проскока	0.07	37	-	3	0.69	-	-	4	0.4%	-	-
Capto Q промывка 200 мМ NaCl	0.05	12.5	-	1	0.48	-	-	-	-	-	-
Capto Q элюция 10 мМ CaCl ₂	31.75	9.2	25.2	292	1.51	232	154	194	50%	62%	2
Capto Q 150 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	12.95	10.5	-	136	0.88	-	-	154	23%		
Capto Q 200 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	4.67	10.7	<1	50	0.83	<10.7	<12	60	9%	-	5.8
Capto Q 500 мМ NaCl + 10 мМ CaCl ₂	13.87	4	-	55	0.57	-	-	98	10%	-	-
Capto Нeparin фракция проскока	0.72	18	-	13	-	-	-	-	3%	-	-
Capto Нeparin элюат	36.10	9	38.6	325	1.46	347	237	222	76%	32%	<2

ток определяли методом количественного ПЦР (рис. 3А,Б). Копийность областей ORC FIX и DHFR не отличалась статистически значимо у всех исследованных объектов, т.е. ни в одном случае не обнаружены признаки «расщепления» целевого гена и гена селекционного маркера, т.е. изменения копииности гена селекционного маркера отдельно от целевого гена, несмотря на амплификацию генетических каскадов в геноме продуцентов. В ходе получения линии 3В12-86 наблюдались изменения копииности гена FIX человека: копииность гена FIX возрастала приблизительно в 5 раз при амплификации, сохранялась при клонировании амплифицированной популяции и затем упала в 4 раза при котрансфекциях плазмид со вспомогательными генами и повторного клонирования. Удельная продуктивность соответствующих линий клеток при этом не уменьшалась. Вероятно, при снятии селекционного давления наблюдалась потеря малоактивных копий генетической кассеты, возникших в процессе геномной амплификации.

Копийность вспомогательных генов во всех полученных клональных линиях была значительно ниже,

чем копииность гена FIX, поскольку отбор клонов клеток по критерию максимальной активности гена *vkorc1* не проводили, а в случае PACE/furin проведен только один раунд отбора, в котором отобрали треть от всех полученных клонов.

В основной линии-продуценте 3В12-86 методом ПЦР-РВ оценили изменение уровня экспрессии нескольких генов домашнего хозяйства, связанных с биосинтезом и посттрансляционным процессингом белков (рис. 3В). Ни у одного из проверенных генов не обнаружили значимого изменения уровня экспрессии, что указывает на отсутствие существенного изменения системы биосинтеза и процессинга белка клеток-хозяев, секретирующих FIX с достигнутой продуктивностью.

Оценка целостности области открытой рамки считывания целевого гена

Методом ПЦР с геномной ДНК и праймеров к областям промотора и терминатора использованных экспрессионных векторов показали, что преобладающие продукты ПЦР имеют «правильную» молекулярную

массу (рис. 4А), а именно, везде выявляется продукт размером 2942 п.н., соответствующий p1.1-F9, а в случае геномной ДНК линии ЗВ12-86 обнаружены также ампликоны длиной 2511 и 852 п.н., соответствующие областям OPC VKORC1 и PACE/furin. Аналогичная амплификация кДНК из линии ЗВ12-86 с праймерами, гомологичными областям начала и конца OPC FIX, также выявила только продукт нужного размера (рис. 4Б), что подтверждает отсутствие протяженных делеций или инсерций в области OPC FIX или мутаций, приводящих к изменению сплайсинга мРНК FIX.

Блотинг по Саузерну на геномной ДНК из линии ЗВ12-86 с зондом, направленным к области OPC FIX, выявил один рестрикционный фрагмент длиной 1921 п.н. (рис. 4В), что указывает на отсутствие в геноме продуцента генетических кассет, встроившихся с разрывом ДНК в области OPC FIX. Блотинг по Саузерну с использованием зонда к участкам ДНК плазмиды, соответствующим области начала репликации плазмиды и области гена *bla*, выявил два рестрикционных фрагмента – тяжелый фрагмент около 3700 п.н., приблизительно соответствующий расчетной интеграции кассеты по сайту ее линейаризации рестриктазой PvuI, а также короткий фрагмент размером около 800 п.н., предположительно соответствующий интеграции кассеты с делецией ДНК вблизи сайта PvuI. Псевдонозерн-блотинг на кДНК, полученных из линий ЗВ12-86 и ЗВ12-78, также выявил только мРНК FIX ожидаемой длины (рис. 4Г).

Отсутствие мутаций в области OPC FIX подтверждено также с помощью ПЦР-амплификации всей области OPC FIX из геномной ДНК линии ЗВ12-86, клонирования ампликона и секвенирования вставки в трех плазмидных клонах. Во всех случаях не выявлено изменений в последовательности OPC FIX (данные не приведены).

Выделение и очистка FIX

Выделение и очистку FIX из кондиционированной среды линии ЗВ12-86 проводили при помощи трех последовательных стадий – мультимодальной хроматографии с сорбентом Capto MMC, позволяющим извлекать FIX из кондиционированной среды без ее дополнительной подготовки; псевдоаффинной хроматографии на анионообменном сорбенте Capto Q с элюцией прокоагуляционно активных молекул FIX хлоридом кальция при низкой ионной силе; аффинной хроматографии на специализированном сорбенте Capto Heparin, отделяющем гепаринсвязывающие белки от остальных молекул. Суммарный выход продукта составил 32%, удельная прокоагуляционная активность FIX в процессе очистки превысила 230 МЕ/мг, что соответствует показателям известного лекарственного препарата рекомбинантного FIX

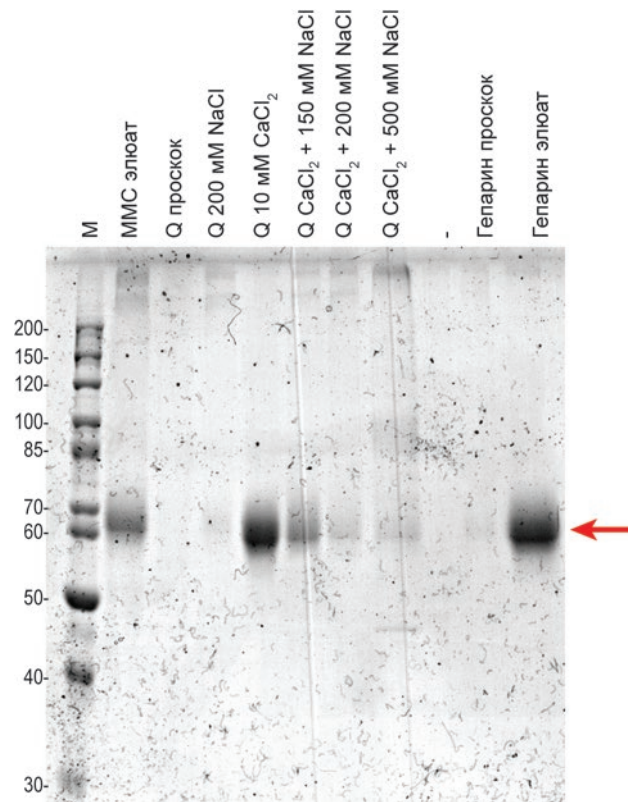


Рис. 5. Анализ белковых фракций при хроматографической очистке FIX методом ДСН-ПААГ. Электрофорез в невозстанавливающих условиях, молекулярные массы в кДа, окраска коллоидным Кумасси синим. Обозначения: М – маркер, «элюат» – фракция элюата соответствующей колонки, «проскок» – фракции не связавшихся с сорбентом белков. Для фракций элюатов с колонки Capto Q указаны соответствующие концентрации NaCl, концентрация CaCl₂ всюду одинакова и составляет 10 мМ

(табл. 4). По данным гель-электрофореза (рис. 5) большая часть молекул FIX элюировалась с сорбента Capto Q при добавлении ионов Ca²⁺ к низкосолевою элюенту, что указывает на наличие у этой части молекул FIX правильно сформированного Gla-домена, структурная перестройка которого при хелатировании ионов Ca²⁺ вызывает элюцию Gla-белков с анионообменного носителя.

ВЫВОДЫ

Разработанный нами ранее набор векторов на основе нетранслируемых участков гена *EEF1A1* китайского хомячка может использоваться для получения линий клеток, секретирующих большие количества функционально активного FIX человека. Целевой ген может быть амплифицирован в геноме продуцентов путем культивирования клеток в присутствии воз-

растающих концентраций МТХ, что приводит к многократному повышению секреции FIX. Достаточный уровень экспрессии вспомогательных генов *vkorc1* и *PACE/furin* может быть обеспечен котрансфекцией «совместимых» плазмид с генами устойчивости к антибиотикам. Полученные клональные линии-продуценты FIX содержат относительно небольшое число копий целевого гена и только несколько копий вспомогательных генов в составе хромосомной ДНК, что может способствовать поддержанию постоянства уровня секреции при длительном культивировании.

Сравнительный анализ сверхэкспрессированных ортологов гена фермента VKORC1 показал, что аутологичный VKORC1 китайского хомячка обеспечивает вдвое большую ферментативную активность при одинаковом числе копий искусственного гена *vkorc1* в геноме. Такой способ сверхэкспрессии гена *vkorc1* может применяться для получения в клетках СНО не только продуцентов FIX, но и других витамин К-зависимых белков. Особенно перспективным представляется использование гена *vkorc1* китайского хомячка для получения фактора VII свертывания крови человека в клетках СНО. Применяемая в настоящее время для промышленного производства FVII линия клеток ВНК сочетает сравнительно высокую актив-

ность комплекса VKOR с низким общим уровнем секреции FVII, а также с определенными ограничениями режима культивирования – в отличие от СНО эта линия требует присутствия в среде фетальной сыворотки крупного рогатого скота и способна к нормальному росту только в адгезионных условиях.

Высокая удельная продуктивность созданной линии-продуцента фактора свертывания крови FIX позволит использовать для промышленного получения FIX простое периодическое культивирование продолжительностью 4–5 дней, титр FIX при этом составляет около 6 МЕ/мл. Такой метод получения FIX не нуждается в специализированных биореакторах с системами перфузии или в разработке способов поддержания жизнеспособности клеточной культуры в течение длительного времени, что значительно упрощает и удешевляет процесс промышленного производства рекомбинантного фактора IX человека. ●

Авторы выражают благодарность

А.Л. Берковскому за ценные рекомендации и реагенты для коагулометрии.

Работа проводилась при поддержке Минпрома (№ 121/13-ФМП-05.07ОК) и РФФИ (№ 16-34-01026 и 16-34-60242).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rogaev E.I., Grigorenko A.P., Faskhutdinova G., Kittler E.L., Moliaka Y.K. // *Science*. 2009. V. 326. № 5954. P. 817.
- Puetz J., Soucie J.M., Kempton C.L., Monahan P.E. // *Haemophilia*. 2014. V. 20. № 1. P. 25–31.
- Kurachi K., Davie E.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 21. P. 6461–6464.
- Anson D.S., Austen D.E., Brownlee G.G. // *Nature*. 1985. V. 315. № 6021. P. 683–685.
- De la Salle H., Altenburger W., Elkaim R., Dott K., Dieterle A., Drillien R., Cazenave J.P., Tolstoshev P., Lecocq J.P. // *Nature*. 1985. V. 316. № 6025. P. 268–270.
- Kaufman R.J., Wasley L.C., Furie B.C., Furie B., Shoemaker C.B. // *J. Biol. Chem*. 1986. V. 261. № 21. P. 9622–9628.
- McGrath B.M., Walsh G. *Directory of Therapeutic Enzymes*. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- Derian C.K., VanDusen W., Przysiecki C.T., Walsh P.N., Berkner K.L., Kaufman R.J., Friedman P.A. // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. № 12. P. 6615–6618.
- Makino Y., Omichi K., Kuraya N., Ogawa H., Nishimura H., Iwanaga S., Hase S. // *J. Biochem*. 2000. V. 128. № 2. P. 175–180.
- Poon M.C., Lillcrap D., Hensman C., Card R., Scully M.F. // *Thromb. Haemost.* 2002. V. 87. № 3. P. 431–435.
- Lissitchkov T., Matysiak M., Zavislska K., Laguna P., Gercheva L., Antonov A., Moret A., Caunedo P., Aznar J.A., Woodward M.K., Paez A. // *Haemophilia*. 2013. V. 19. № 5. P. 674–678.
- Bond M., Jankowski M., Patel H., Karnik S., Strang A., Xu B., Rouse J., Koza S., Letwin B., Steckert J., Amphleand G., Scoble H. // *Semin. Hematol*. 1998. V. 35. № 2 Suppl 2. P. 11–17.
- Berkner K.L. // *Annu. Rev. Nutr*. 2005. V. 25. P. 127–149.
- Garcia A.A., Reitsma P.H. // *Vitam. Horm.* 2008. V. 78. P. 23–33.
- Bolt G., Steenstrup T.D., Kristensen C. // *Thromb. Haemost.* 2007. V. 98. № 5. P. 988–997.
- Wajih N., Hutson S.M., Owen J., Wallin R. // *J. Biol. Chem*. 2005. V. 280. № 36. P. 31603–31607.
- De Castilho Fernandes A., Fontes A., Gonsales N., Swiech K., Picanco-Castro V., Faca S., Covas D. // *Biotechnol. Appl. Biochem*. 2011. V. 58. № 4. P. 243–249.
- Wilson C.R., Sauer J.M., Carlson G.P., Wallin R., Ward M.P., Hooser S.B. // *Toxicology*. 2003. V. 189. № 3. P. 191–198.
- Schulman S., Wang B., Li W., Rapoport T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 34. P. 15027–15032.
- Tie J.K., Jin D.Y., Stafford D.W. // *J. Biol. Chem*. 2014. V. 289. № 13. P. 9396–9407.
- Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. // *BMC Biotechnol*. 2014. V. 14. P. 56.
- Kozak M. // *Nucl. Acids Res*. 1987. V. 15. № 20. P. 8125–8148.
- Griffin A.M., Griffin H.G. *Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends*. Horizon Scientific Press, 1995.
- Dussault A.A., Pouliot M. // *Biol. Procd. Online*. 2006. V. 8. P. 1–10.
- Church G.M., Gilbert W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 7. P. 1991–1995.
- Harlow E., Lane D. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
- Bristol J.A., Furie B.C., Furie B. // *J. Biol. Chem*. 1993. V. 268. № 10. P. 7577–7584.
- Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hortnagel K., Pelz H.J., Lappegard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E.G., Muller C.R., Strom T.M., Oldenburg J. // *Nature*. 2004. V. 427. № 6974. P. 537–541.
- Tishler M., Fieser L.F., Wendler N.L. // *J. Am. Chem. Soc*. 1940. V. 62. № 10. P. 2866–2871.
- Alves D.S., Castello-Banyuls J., Faura C.C., Ballesta J.J. // *FEBS Lett*. 2011. V. 585. № 8. P. 1169–1174.

УДК 575

Изучение генной экспрессии при адаптации к гипотоническим условиям на примере трехиглой колюшки (*Gasterosteus aculeatus*)

С. М. Расторгуев^{1*}, А. В. Недолужко¹, Н. М. Груздева¹, Е. С. Булыгина¹, С. В. Цыганкова¹, Д. Ю. Ощепков⁴, А. М. Мазур², Е. Б. Прохорчук^{2,3}, К. Г. Скрыбин^{1,2,3}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²Институт биоинженерии, ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

⁴Институт цитологии и генетики, ФИЦ ИЦИГ СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

*E-mail: rastorgueff@gmail.com

Поступила в редакцию 09.12.2016

Принята к печати 07.11.2017

РЕФЕРАТ Трехиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus*) является удобным объектом для изучения эволюции и процессов видообразования. Количество исследований с ее участием в последние годы неуклонно растет, что обусловлено процессами образования пресноводных форм у данного вида, которые происходят в настоящее время. Морская форма этого вида, заходя на нерест в пресные водоемы, часто остается там и образует пресноводные популяции. Особи в таких популяциях подвергаются отбору и начинают достаточно сильно отличаться от своих морских предков по многим морфобиологическим признакам. Процессы, происходящие в таких популяциях, представляют большой интерес для эволюционных биологов. Методом RNA-seq нами определены различия в экспрессии генов в жаберных тканях морской и пресноводной форм трехиглой колюшки, содержавшихся в морской и пресной воде соответственно. Метод RNA-seq позволяет оценить активность всех генов, экспрессирующихся в данной ткани. В результате были выявлены 2982 гена, активность которых статистически значимо различается в жабрах морских и пресноводных особей, определены функциональные категории, обогащенные найденными генами. Показано, что дифференциально экспрессируемые гены неслучайным образом распределены по большинству хромосом генома, и такие гены часто находятся в геномных «островках дивергенции», ответственных за пресноводную адаптацию колюшки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трехиглая колюшка, *Gasterosteus aculeatus*, экспрессия генов, дифференциальная экспрессия, RNA-seq, осморегуляция, GO-анализ, видообразование.

ВВЕДЕНИЕ

Трехиглая колюшка (*Gasterosteus aculeatus*) (рис. 1) является модельным объектом для изучения процесса адаптивного видообразования при смене мест обитания [1], поскольку ее морская форма колонизирует пресноводные места обитания по всему побережью Северного полушария. Морская популяция трехиглой колюшки обычно использует пресноводные ручьи и озера для нереста, но при изоляции в новых условиях образуется пресноводная резидентная популяция, морфотип которой со временем изменяется и появляются другие особенности, позволяющие вы-

жить в новых условиях. Такая особенность позволяет использовать эту небольшую рыбу в качестве объекта для изучения адаптивной эволюции в сходных условиях обитания.

К настоящему времени опубликован ряд работ, посвященных полногеномным изменениям, происходящим в процессе адаптационного видообразования у трехиглой колюшки [2–4], в которых были обнаружены геномные островки дивергенции, где концентрируются нуклеотидные замены, характерные для пресноводной формы. Известны исследования, описывающие дифференциальную экспрессию ге-

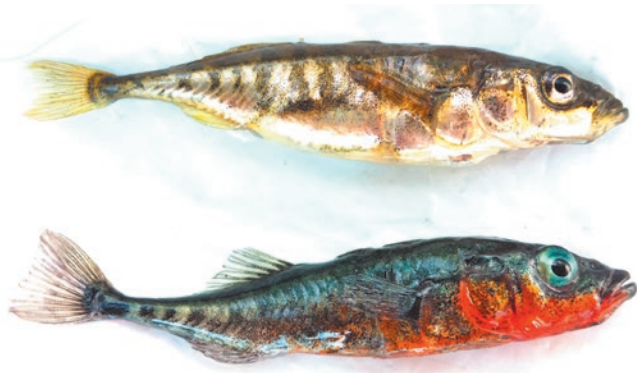


Рис. 1. Трехиглая колюшка. Пресноводный морфотип. Вверху самка, внизу самец в брачном наряде

нов колюшки в тканях почек морской и пресноводной форм и при пересадке пресноводной формы в морскую воду [5], а также в мышцах, эпителиальной и костной тканях морских и пресноводных популяций колюшки при изучении пластичности экспрессии генов в ходе колонизации пресноводных мест обитания [6]. Кроме того, оценивали дифференциальную экспрессию генов *G. aculeatus* в тканях почки и селезенки озерных и речных особей при изучении иммунного ответа на паразитическую фауну [7].

Различия в экспрессии генов у морских и пресноводных форм достаточно широко изучают и на других объектах. Особенно удобны для этого диадромные рыбы, которые могут жить как в морской, так и в пресной воде, поскольку у них есть физиологические механизмы адаптации к воде разной солености. Кроме того, методом RNA-seq изучали глобальные изменения экспрессии генов у морских и пресноводных форм таких видов, как айю *Plecoglossus altivelis* [8], японский речной угорь *Anguilla japonica* [9], европейский угорь *A. anguilla* [10], тилapia *Oreochromis mossambicus* [11, 12], фундулус гетероклитус *Fundulus heteroclitus* [13], обыкновенный лаврак *Dicentrarchus labrax* [14], нерка *Oncorhynchus nerka* [15], арктический голец *Salvelinus alpinus* [16]. В большинстве случаев методом RNA-seq изменения экспрессии генов после изменения внешних условий изучали, используя жабры в качестве целевой ткани. Были выявлены категории онтологии генов (GO, Gene Ontology), которыми обогащены экспериментальные группы, предложены метаболические и биохимические пути, играющие важную роль в адаптации к изменениям осмотических условий. В частности показано, что при смене осмотических условий изменяется экспрессия генов, кодирующих белки-транспортёры и ионные каналы [12], генов, отвечающих за клеточный рост и пролиферацию,

апоптоз и молекулярный транспорт, синтез белков и энергетический обмен [9, 11, 13]. Отдельно хочется отметить активное участие в этом процессе транскрипционных факторов [15], что говорит об обширном эффекте смены осмотических условий на генную экспрессию.

Изучение экспрессии генов может пролить свет на такие фундаментальные проблемы генетики, как связь структуры и функций эукариотического генома. Принято считать, что в эукариотическом геноме гены располагаются случайным образом, не образуя каких-либо функциональных кластеров, сходных с бактериальными оперонами. Однако существуют свидетельства ошибочности данного утверждения – статистический анализ полногеномных данных и данных транскрипционного анализа показал, что в геноме эукариот гены расположены не случайным образом, а организованы в совместно экспрессируемые кластеры [17, 18]. Более того, показано, что гены арктического гольца [16], ортологичные генам трехиглой колюшки, которые дифференциально экспрессируются в жабрах рыб из пресной и морской воды, располагаются друг к другу значимо ближе, чем при случайном расположении, что подтверждает гипотезу о кластерной организации эукариотического генома. Однако эти данные было бы интересно сопоставить с экспрессией генов трехиглой колюшки.

В данной работе приведены результаты RNA-seq-анализа генов, экспрессируемых в жабрах морских и пресноводных особей трехиглой колюшки, определены гены, уровень экспрессии которых значимо отличается у этих двух форм. Мы использовали жабры в качестве целевой ткани, потому что они играют важную роль в водно-солевом обмене, а также их легко выделить, что уменьшает ошибки, связанные с отбором материалов для исследования. Определена геномная локализация дифференциально экспрессируемых генов. Для каждой хромосомы определено отношение межгенных расстояний таких генов к среднему по хромосоме. Проведен функциональный и Gene Ontology-анализ, определены биохимические пути, обогащенные найденными генами, полученные данные сравнили с данными, ранее опубликованными для других видов. Определено отношение дифференциально экспрессируемых генов к геномным «островкам дивергенции», участвующим в адаптации трехиглой колюшки к пресноводному обитанию [4].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Образцы морской трехиглой колюшки (далее по тексту используется идентификатор – «М») были собраны в Белом море, близ Беломорской биологической станции МГУ им. Н.А. Перцова (ББС МГУ, пос. Приморский Мурманской области). Пресноводные

образцы (далее по тексту используется идентификатор – «F») собраны в оз. Машинное, недалеко от поселка Чкаловский, Лоухский район, Республика Карелия. Примерный возраст озера после опреснения составляет, согласно расположению над уровнем моря, 700 лет [4, 19]. В озере представлена только жилая пресноводная форма, так как ручей, вытекающий из озера и впадающий в море, заболочен и непроходим для анадромной колюшки. Кроме того, опасность ошибки сбора уменьшается благодаря значительным морфологическим отличиям морской и пресноводной форм [20]. Для синхронизации физиологического статуса образцов отбирали только самцов в брачном наряде.

Собранные образцы выдерживали в течение 4 сут каждый в своей воде в аквариумах на ББС, чтобы синхронизировать стрессовый фактор, который может отличаться в зависимости от разных условий лова. После этого выделяли жабры и фиксировали их в реагенте IntactRNA® («Евроген», Россия).

РНК из жаберных тканей *G. aculeatus* (по пять образцов из каждой экспериментальной группы) выделяли согласно стандартному протоколу с применением реагента TRIzol® (Invitrogen, США). Концентрацию РНК из каждого образца определяли с помощью прибора BioAnalyzer 2100 (RNA 6000 Nano Kit) (Agilent, США).

Для получения библиотек кДНК сначала на матрице РНК синтезировали кДНК с помощью набора реактивов Mint® («Евроген», Россия) согласно инструкциям фирмы. Затем, используя NEBNext Library Prep Kit for Illumina (NEB, Великобритания), готовили 10 индексированных парно-концевых библиотек для секвенирования на анализаторах Illumina (Illumina, США). Концентрацию и степень чистоты библиотек определяли с помощью прибора Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США), после чего проводили секвенирование на Illumina HiSeq 1500 длиной 2 × 75 нуклеотидов.

Для выявления генов, дифференциально экспрессируемых в морских и пресноводных образцах трехиглой колюшки, нуклеотидные чтения Illumina картировали на референсный геном *G. aculeatus* из базы данных Ensembl (BROAD S1, Feb 2006, assembly 81; <http://www.ensembl.org>) [21], используя программный пакет *bowtie2* [22] с набором параметров – *very-sensitive-local*. В итоге получили файлы формата SAM (Sequence Alignment/Map) [23], которые подвергли дальнейшему процессингу (компрессия, сортировка, индексирование) с помощью пакета *SAMtools* [23, 24]. Относительную активность каждого гена определяли согласно покрытию этого гена нуклеотидными чтениями на референсном геноме после картирования каждой библиотеки. Покрытие

определяли с помощью утилиты *coverageBed* из программного пакета *bedtools* [25], используя *bed*-файл с координатами генов из Ensembl и индексированный *bam*-файл, полученный в результате картирования нуклеотидных чтений. Данные картирования для каждой библиотеки собирали в единую таблицу с помощью *perl*-скрипта. Статистический анализ дифференциальной экспрессии проводили с помощью пакета *edgeR* [26] среды для статистических вычислений R (<http://www.r-project.org>).

Анализ генных онтологий (GO – Gene Ontology) и анализ биохимических путей проводили с помощью программы PANTHER (Protein Annotation through Evolutionary Relationships) (<http://pantherdb.org>) [27], предварительно переведя Ensembl ID генов колюшки в ортологичные гены человека с помощью BioMart Ensembl service, поскольку эта программа не использует геном трехиглой колюшки в качестве референсного для поиска обогащенных категорий GO. Данная утилита использует библиотеки GO PANTHER, основанные на моделях, использующих алгоритм скрытых марковских цепей выявления обогащенных категорий. При этом используются как «полные», так и сокращенные GO slim-категории.

Межгенные расстояния для полного набора генов трехиглой колюшки сравнивали с расстояниями между генами, ответственными за осморегуляцию, используя *perl*-скрипт. Используя координаты генов на каждой хромосоме (указаны в *bed*-файлах из *ftp*-сервера Ensembl), измеряли расстояние от каждого гена до всех остальных генов данной хромосомы, и так для всех генов генома, получая массив межгенных расстояний в нуклеотидах. Аналогичную процедуру проводили только для тех генов, которые дифференциально экспрессировались в жабрах морских и пресноводных особей. Два полученных массива передавали в функцию *t.test* среды для статистических вычислений R, получая показатели различия двух массивов.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мегакласса» НИЦ «Курчатовский институт», <http://ckp.nrcki.ru>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первоначально для изучения дифференциальной экспрессии нами было отобрано по пять образцов колюшки из морской и пресноводной популяций, однако при приготовлении библиотек кДНК два образца (по одному из каждой популяции) имели низкое качество и были исключены из последующего анализа. Таким образом, получены по четыре кДНК-библиотеки, пригодные для секвенирования на платформе Illumina.

Таблица 1. Количество нуклеотидных чтений Illumina*

Библиотека	Количество кластеров	Количество нуклеотидных чтений	Нуклеотидные чтения, картированные на гены	Всего для морских и пресноводных особей	
				произведено	картировано
M2	10566712	21133424	17993109	85438630	74093974
M3	10577457	21154914	18161521		
M4	10262893	20525786	18489001		
M5	11312253	22624506	19450343		
F1	13523593	27047186	24692145	110690898	103570453
F2	15715663	31431326	28960967		
F4	13359490	26718980	26307475		
F5	12746703	25493406	23609866		

*Приведено количество нуклеотидных чтений, полученных в результате RNA-seq, для каждой библиотеки и суммарно для морских и пресноводных образцов.

Общее количество чтений длиной 75 нуклеотидов каждое составило 85438630 и 110690898 в библиотеках из морских и пресноводных образцов соответственно. Нуклеотидные чтения (всего 177664427) картировали на гены, аннотированные в геноме *G. aculeatus*, из базы данных Ensembl. Информация о количестве нуклеотидных чтений, полученных в результате эксперимента, и статистике картирования приведена в табл. 1.

После картирования данных на геном *G. aculeatus* подсчитывали нуклеотидные чтения, картированные на каждый из аннотированных генов трехиглой колюшки и нормировали активность каждого гена с помощью пакета edgeR.

С использованием данных по покрытию аннотированных генов был построен MDS (Multi Dimensional Scaling) график, на котором расположение образцов соответствует различиям в экспрессии их генов. Выявлены ощутимые различия в экспрессии генов в морских и пресноводных образцах колюшки. Вместе с тем, образцы каждой группы образуют достаточно тесный кластер (за исключением морского образца M4), что указывает на хорошую синхронизацию физиологических процессов между изучаемыми образцами (рис. 2).

Дифференциальную экспрессию определяли с помощью пакета edgeR [26], который вычисляет дисперсию показателя экспрессии для каждого гена. Дифференциально экспрессируемыми считали гены, величина активности которых отклоняется от среднего значительно больше величины дисперсии. При вычислении дифференциальной экспрессии также имеет значение степень активности гена – для слабо экспрессируемых генов отклонение от среднего должно быть выше, чтобы раз-

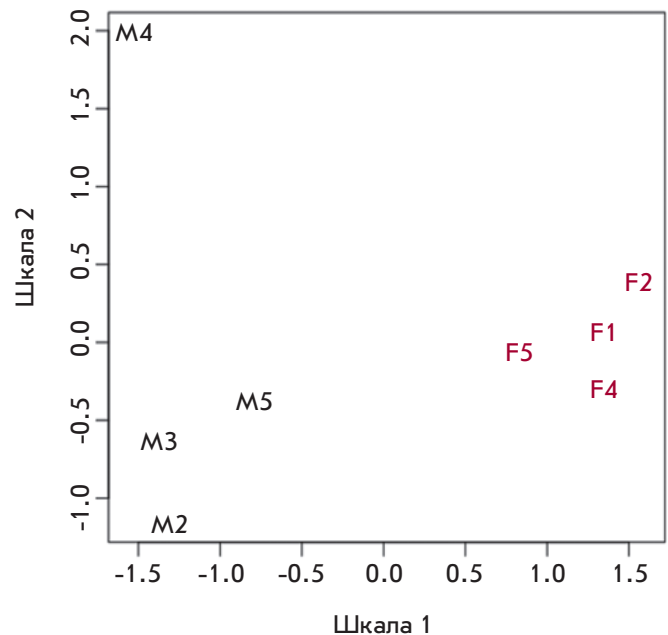


Рис. 2. MDS-график, построенный по результатам анализа экспрессии аннотированных генов морских и пресноводных особей трехиглой колюшки. Морские образцы обозначены черным цветом (M), пресноводные – красным (F). Индексы соответствуют номерам библиотек

ница в экспрессии признавалась достоверной. Рис. 3 иллюстрирует вышесказанное – дифференциально экспрессируемым (красные точки) считали ген, экспрессия которого не только значительно отклонялась от среднего значения, но и наблюдался ее достаточно высокий уровень.

Таблица 2. Гены, экспрессия которых наиболее существенно различается у морской и пресноводной форм трехиглой колюшки

Ensembl gene ID	logFC	logCPM	P-value	FDR
ENSGACG00000013714	-4.193912	10.693346	2.116876e-51	4.753656e-47
ENSGACG00000011986	-5.259545	11.215562	6.575861e-51	7.383376e-47
ENSGACG00000001275	3.860307	6.117474	2.371864e-46	1.775419e-42
ENSGACG00000014967	4.253744	6.943885	6.017277e-41	3.378099e-37
ENSGACG00000018764	-4.056880	9.038716	2.477170e-40	1.112547e-36
ENSGACG00000014959	4.706814	5.650018	7.523387e-40	2.815753e-36
ENSGACG00000003404	-4.617256	8.036567	5.344099e-37	1.714387e-33
ENSGACG00000001373	3.762800	5.512202	4.071101e-35	1.061745e-31
ENSGACG00000019813	5.816259	4.613614	4.255301e-35	1.061745e-31
ENSGACG00000014691	4.449242	4.901331	9.436192e-35	2.118991e-31

Примечание. logFC – двоичный логарифм разницы в экспрессии, logCPM – показатель глубины покрытия гена (count per million), P-value – значение разности экспрессии, FDR (false discovery rate) – значение P, нормализованное на множественное тестирование.

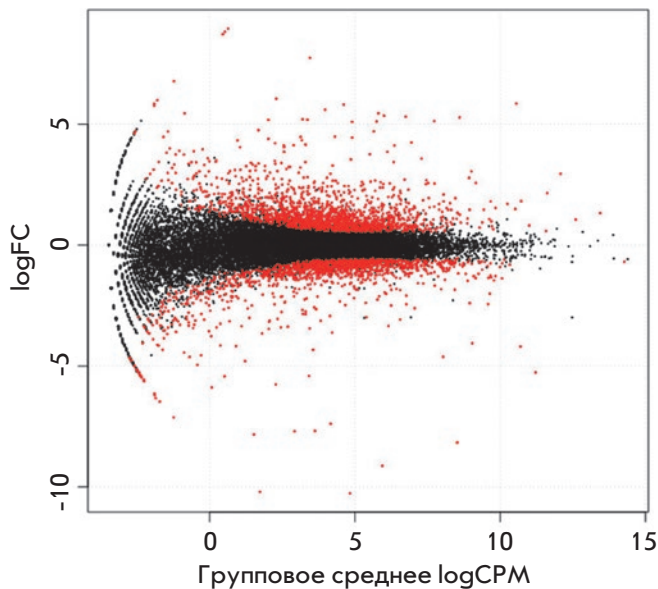


Рис. 3. Дифференциально экспрессируемые гены трехиглой колюшки. Показана зависимость уровня экспрессии (logCPM – logarithm of count per million) от отклонения уровня экспрессии от среднего значения (logFC – logarithm of fold change). Здесь оба логарифма по основанию 2. Красными точками отмечены гены, активность которых статистически значимо различается у морских и пресноводных особей

При сравнении образцов морских и пресноводных особей выявлено статистически значимое отличие в экспрессии 2982 из 22456 аннотированных генов *G. aculeatus* (уровень значимости 95%). При этом у морских колюшек была повышена экспрессия 1304

генов и 1678 у пресноводной формы. В табл. 2 представлены 10 генов, экспрессия которых наиболее отличается у особей разных экотипов.

На рис. 4 в графическом виде представлены результаты дифференциального анализа 50 генов, уровень экспрессии которых наиболее существенно различается в экспериментальных группах трехиглой колюшки. Показано (как и в случае MDS-графика), что морские и пресноводные особи достаточно сильно различаются по уровню экспрессии некоторых генов (судя по кластеризации образцов вверху рисунка). Более того, среди 50 проанализированных генов преобладают гены, экспрессия которых повышена в морских образцах.

Результаты функционального анализа приведены на рис. 5. Гены, обогащенные среди UP-экспрессированных («перезэкспрессированных») в жабрах морской колюшки, отклонены вправо от начала координат, тогда как DOWN-экспрессированные – влево. UP- и DOWN-экспрессированные гены можно интерпретировать как морские и пресноводные соответственно. Кроме того, среди дифференциально экспрессируемых морских генов статистически значимо повышено количество генов, относящихся к категориям, связанным с трансмембранными функциями и цитоскелетом, например, такие категории, как с активностью ионных и анионных каналов, трансмембранных транспортеров, субстрат-специфической трансмембранной транспортной активностью и другими категориями, связанными с мембранами. Это вполне логично и объясняется тем, что для поддержания внутриклеточного гомеостаза в разных осмотических условиях необходима значительная активность трансмембранных систем. Среди генов, экспрессия которых повышена у пресновод-

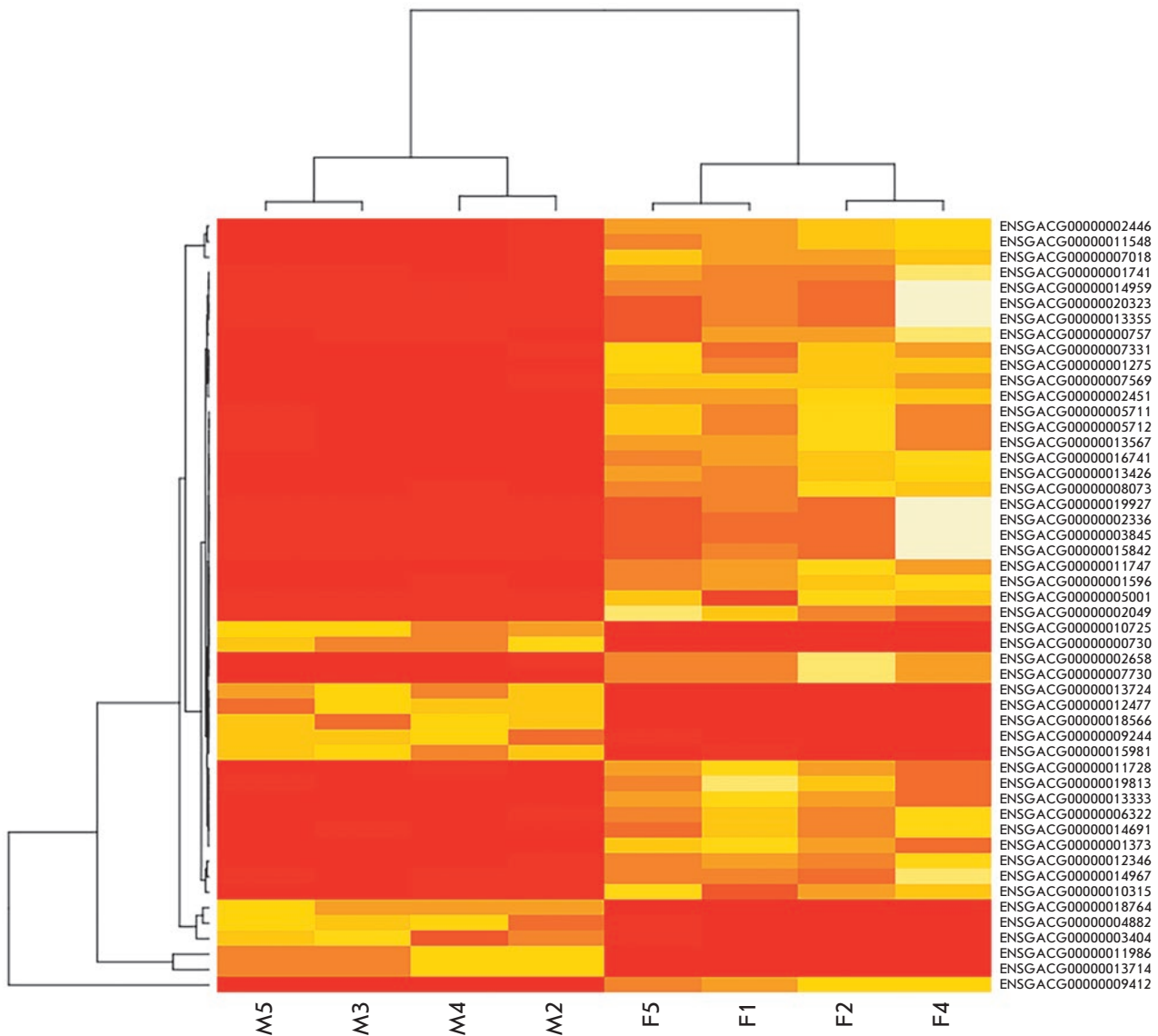


Рис. 4. Heatmap 50 дифференциальных генов. В качестве показателей экспрессии использованы нормализованные данные экспрессии генов CPM (count per million). Красный цвет – повышенная экспрессия, желтый – пониженная. В строках гены, в столбцах образцы (M – морские, F – пресноводные). Дополнительно проведена кластеризация как образцов, так и генов. Видны различия в кластеризации морских и пресноводных образцов

ных особей, много генов, относящихся к категориям, связанным с клеточным циклом – репликацией ДНК, митозом, сегрегацией хромосом, а также с категориями, связанными с внутриклеточным транспортом и микротрубочками. Различия в процессах клеточного деления могут быть связаны с разной скоростью развития колюшки в море и в пресной воде, что, в свою очередь, может определяться температурным режимом. Однако этот феномен требует дальнейшего изучения и объяснения.

Среди дифференциально экспрессируемых генов морской формы повышено содержание генов, связанных с мышечной активностью, что можно объяснить, например, необходимостью морских самцов колюшки перед брачным сезоном мигрировать к побережью, где происходит нерест, тогда как у пресноводных форм такой необходимости нет, так как нерест у них происходит непосредственно в месте обитания. Различия в иммунных процессах у двух форм колюшки, по-видимому, могут быть связаны с раз-

Таблица 3. Межгенные расстояния для всех генов трехиглой колюшки и дифференциально экспрессируемых генов*

Хромосома	Длина, п.н. согласно Ensembl	Число генов	Количество дифференциально экспрессируемых генов	Среднее межгенное расстояние, п.н.	Среднее между дифференциально экспрессируемыми генами, п.н.	P-значение**
groupI	28185914	1647	150	9760533	10405738	< 2.2e-16
groupII	23295652	1158	113	7517040	7507226	0.8372
groupIII	16798506	1226	104	5325760	5764740	< 2.2e-16
groupIV	32632948	1719	171	11075843	10983967	0.04622
groupV	12251397	980	128	4198998	4022731	1.14e-13
groupVI	17083675	965	93	5605389	5223090	< 2.2e-16
groupVII	27937443	1726	183	9642342	10137264	< 2.2e-16
groupVIII	19368704	1177	128	6508569	6477095	0.387
groupIX	20249479	1374	149	6868532	6267635	< 2.2e-16
groupX	15657440	1050	107	5286434	5883914	< 2.2e-16
groupXI	16706052	1344	185	5543259	5455211	4.402e-05
groupXII	18401067	1301	116	6049383	6006811	0.2558
groupXIII	20083130	1303	137	6640756	6646041	0.8806
groupXIV	15246461	984	94	5118033	5192484	0.06052
groupXV	16198764	1026	114	5102727	5321175	2.422e-10
groupXVI	18115788	1063	97	5635724	5357195	6.306e-12
groupXVII	14603141	929	93	4897567	4834424	0.08998
groupXVIII	16282716	1020	101	5251120	4896094	< 2.2e-16
groupXIX	20240660	1373	132	6414729	6790731	< 2.2e-16
groupXX	19732071	1259	113	5868160	5362585	< 2.2e-16
groupXXI	11717487	599	71	3488145	2936194	< 2.2e-16

*Анализ проведен для каждой хромосомы отдельно.

**Указан показатель статистической значимости разницы межгенных расстояний.

личиями в пресноводной и морской паразитической фауне, поражающей колюшку [28].

Полученные нами результаты довольно слабо соответствовали данным для других видов рыб [9, 11–13, 15]. Связано ли это с методическими особенностями функционального анализа списков генов или действительно разные виды по-разному адаптируются к солевым условиям? Этот вопрос остается открытым и требует более углубленных исследований. Однако есть свидетельства в пользу того, что ответ на изменение осмотических условий может быть индивидуальным. Например, исследование изменений генной экспрессии в жабрах двух родственных линий арктического гольца (*S. alpinus*) позволило обнаружить 1045 и 1544 генов дифференциально экспрессирующихся в каждой из этих линий соответственно [16]. При этом общими были лишь 257 генов, т.е. менее чем у четверти генов, реагирующих на изменение осмотических условий, экспрессия изменяется сходным образом. И это у представителей одного вида!

Согласно определению межгенных расстояний для полного набора генов трехиглой колюшки и расстояний между генами, участвующими в осморегуляции, распределение дифференциально экспрессируемых генов по хромосоме действительно неслучайно. Так, только у семи из 21 хромосомы трехиглой колюшки расстояния между генами, регуляция которых изменяется при смене осмотических условий, статистически не отличаются от межгенных расстояний для других генов (табл. 3). Это подтверждает гипотезу о том, что гены в эукариотическом геноме распределены не случайно, а объединены в совместно экспрессируемые кластеры [17, 18]. Этот результат свидетельствует в пользу того, что мы до сих пор мало знаем об устройстве эукариотического генома.

Опубликованные ранее результаты поиска однонуклеотидных полиморфизмов в геноме трехиглой колюшки, ассоциированных с морской и пресноводной формами [3, 4], показали, что подобные полиморфизмы преимущественно локализируются на не-

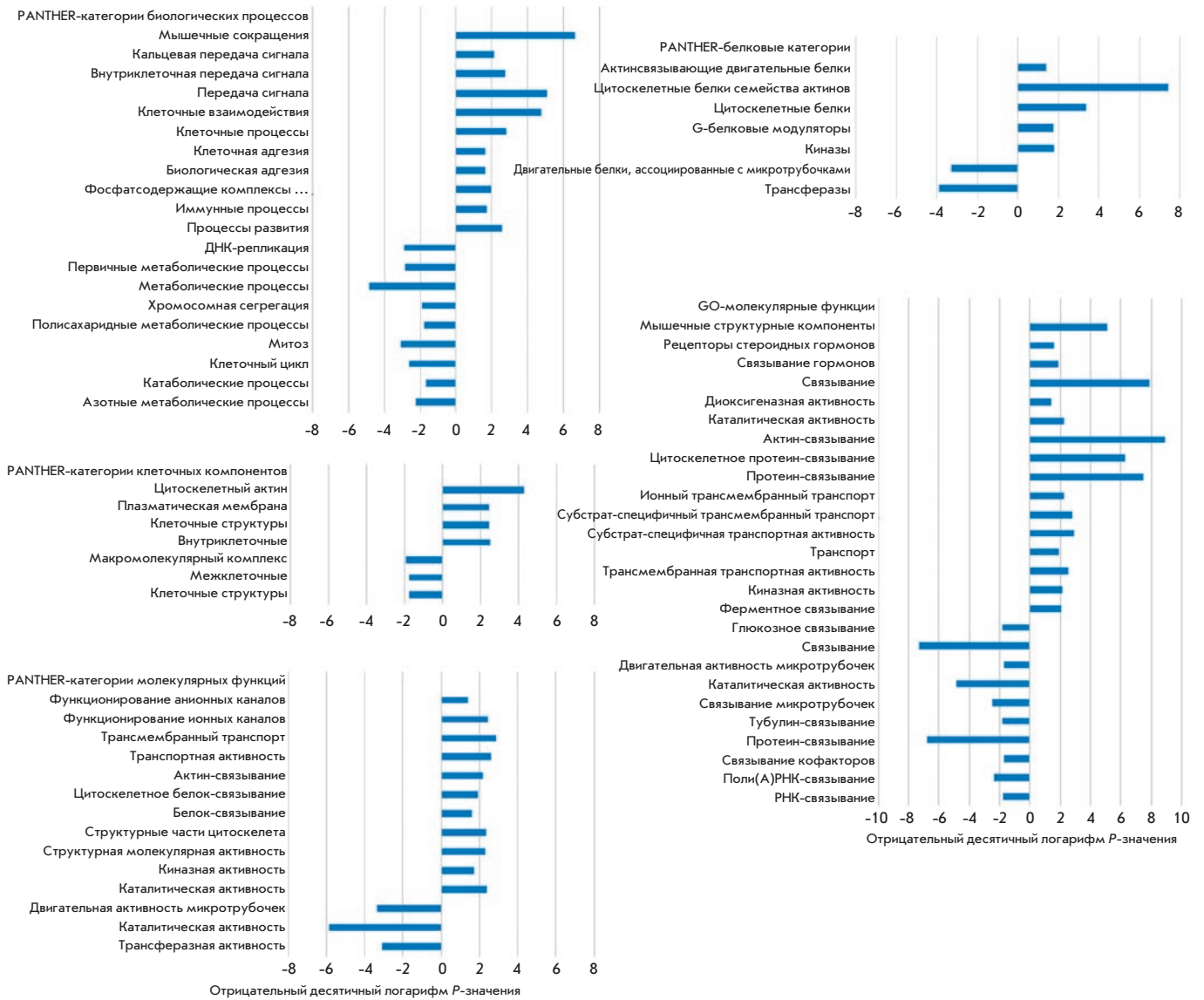


Рис. 5. Обогащение различными GO-категориями списка генов, дифференциально экспрессируемых в жаберных тканях морской и пресноводной трехиглой колюшки. Увеличенная экспрессия генов конкретной функциональной категории в группе морских колюшек по отношению к пресноводным означает отклонение отрицательного десятичного логарифма P -значения в положительную сторону. Название базы данных определенных GO-категорий указано в левом верхнем углу каждого бокса

больших участках генома, названных «островками дивергенции». Мы сопоставили локализацию выявленных нами дифференциально экспрессируемых генов с положением островков дивергенции, участвующих в адаптации колюшки к обитанию в пресной воде. Из 2982 дифференциально экспрессируемых генов 28 находятся в островках адаптивной дивергенции, что значительно превышает количество случайных совпадений. Всего в островках дивергенции находятся 212 из 29245 аннотированных генов трех-

иглой колюшки (согласно тесту Пуассона P -значение равно 0.0001). Этот факт представляется вполне закономерным, поскольку если в определенных локусах находятся однонуклеотидные полиморфизмы, которые отличаются у морских и пресноводных образцов трехиглой колюшки, то логично предположить, что в этих локусах с большой вероятностью будет отличаться и экспрессия генов, хотя бы потому, что часть полиморфизмов может находиться в регуляторных элементах генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Суммируя результаты, приведенные в нашей работе, можно отметить, что применение современных методов параллельного секвенирования для определения активности генной экспрессии позволяет определить массив генов и спектр механизмов, вовлеченных в исследуемый процесс. На примере устойчивости трехиглой колюшки к изменению осмотических условий показано, что гены, экспрессия которых меняется при осмотическом ответе, активно участвуют в таких процессах, как регуляция клеточного цикла, мембранный транспорт, иммунитет, мышечные сокращения и т.д. Вместе с тем, сравнение обогащенных категорий дифференциально экспрессированных генов с результатами, полученными ранее на других объектах, показало невысокую универсальность молекулярных механизмов приспособления к смене условий обитания. Этот феномен требует дальнейшего исследования. ●

Авторы выражают свою признательность сотрудникам Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ВНИРО) Н.С. Мюге и А.Е. Барминцевой за помощь в сборе образцов, обсуждение результатов и предоставленную фотографию исследуемого объекта (рис. 1). Отдельная благодарность сотрудникам Института биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН Б.А. Левину и А.А. Болотовскому за помощь в сборе материала на озере Машинное.

Работа поддержана грантами РФФИ (№ 14-04-01237) – сбор образцов, анализ данных; РФФИ (№ 14-24-00175) – приготовление и секвенирование кДНК-библиотек. Функциональный анализ генов поддержан бюджетным проектом (№ 0324-2018-0017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hagen D., Gilbertson L. // *Evolution*. 1972. V. 26. P. 32–51.
- Hohenlohe P.A., Bassham S., Currey M.C., Cresko W.A. // *Philos. Transact. Royal Soc. B*. 2012. V. 367. P. 395–408.
- Jones F.C., Grabherr M.G., Chan Y.F., Russell P., Mauceli E., Johnson J., Swofford R., Pirun M., Zody M.C., White S., et al. // *Nature*. 2012. V. 484. P. 55–61.
- Terekhanova N., Logacheva M., Penin A., Neretina T., Barmintseva A., Bazykin G., Kondrashov A., Mugue N. // *PLoS Genet*. 2014. V. 10. № 10. e1004696.
- Wang G., Yang E., Smith K.J., Zeng Y., Ji G., Connon R., Fanguie N.A., Cai J.J. // *Front. Genet*. 2014. V. 5. P. 312.
- Morris M.R.J., Richard R., Leder E.H., Barrett R.D.H., Aubin-Horth N., Rogers S.M. // *Mol. Ecol*. 2014. V. 23. P. 3226–3240.
- Huang Y., Chain F.J.J., Panchal M., Eizaguirre C., Kalbe M., Lenz T.L., Samonte I.E., Stoll M., Bornberg-Bauer E., Reusch T.B.H., et al. // *Mol. Ecol*. 2016. V. 25. P. 943–958.
- Lu X.-J., Zhang H., Yang G.-J., Li M.-Y., Chen J. // *Dongwuxue Yanjiu*. 2016. V. 37. № 3. P. 126–135.
- Lai K.P., Li J.-W., Gu J., Chan T.-F., Tse W.K.F., Wong C.K.C. // *BMC Genomics*. 2015. V. 16. P. 1072.
- Kalujnaia S., McWilliam I.S., Zaguinaiko V.A., Feilen A.L., Nicholson J., Hazon N., Cutler C.P., Cramb G. // *Physiol. Genomics*. 2007. V. 31. P. 385–401.
- Lam S.H., Lui E.Y., Li Z., Cai S., Sung W.-K., Mathavan S., Lam T.J., Ip Y.K. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 921.
- Ronkin D., Seroussi E., Nitzan T., Doron-Faigenboim A., Snaani A. // *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics and Proteomics*. 2015. V. 13. P. 35–43.
- Whitehead A., Roach J.L., Zhang S., Galvez F. // *J. Exp. Biol*. 2012. V. 215. P. 1293–1305.
- Boutet I., Long Ky C.L., Bonhomme F. // *Gene*. 2006. V. 379. P. 40–50.
- Evans T.G., Hammill E., Kaukinen K., Schulze A.D., Patterson D.A., English K.K., Curtis J.M.R., Miller K.M. // *Mol. Ecol*. 2011. V. 20. P. 4472–4489.
- Norman J.D., Ferguson M.M., Danzmann R.G. // *J. Exp. Biol*. 2014. V. 217. P. 4029–4042.
- Hurst L.D., Pál C., Lercher M.J. // *Nat. Rev. Genet*. 2004. V. 5. P. 299–310.
- Ng Y.K., Wu W., Zhang L. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 42.
- Kolka V.V., Korsakova O.P. // *Proc. MSTU*. 2005. V. 15. P. 349–356.
- McKinnon J.S., Rundle H.D. // *Trends Ecol. Evol*. 2002. V. 17. P. 480–488.
- Cunningham F., Amode M.R., Barrell D., Beal K., Billis K., Brent S., Carvalho-Silva D., Clapham P., Coates G., Fitzgerald S., et al. // *Nucl. Acids Res*. 2015. V. 43. D662–669.
- Langmead B., Salzberg S.L. // *Nat. Meth*. 2012. V. 9. P. 357–359.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 2078–2079.
- Li H. // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. P. 2987–2993.
- Quinlan A.R., Hall I.M. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 841–842.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. // *Bioinformatics*. 2010. V. 26. P. 139–140.
- Nesvizhskii A.I., Keller A., Kolker E., Aebersold R. // *Anal. Chem*. 2003. V. 75. P. 4646–4658.
- Scharsack J.P., Franke F., Erin N.I., Kuske A., Büscher J., Stolz H., Samonte I.E., Kurtz J., Kalbe M. // *Zoology (Jena)*. 2016. V. 119. № 4. P. 375–383.

УДК 616-092.9; 616-092.11; 617.735;

Новые экспериментальные модели фоторецепторной дегенерации сетчатки для скрининга молекулярных фотохромных блокаторов ионных каналов

А. Ю. Ротов^{1,2}, Л. А. Астахова², В. С. Ситникова^{1,2}, А. А. Евдокимов³, В. М. Бойцов⁴, М. В. Дубина⁴, М. Н. Рязанцев^{5,6*}, М. Л. Фирсов²

¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

²Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

³Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 14

⁴Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет РАН, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8, корп. 3, лит. А

⁵Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, 198504, Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский просп., 26

⁶Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский просп., 49

*E-mail: mikhail.n.ryazantsev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.05.2017

Принята к печати 24.01.2018

РЕФЕРАТ Применение фотохромных блокаторов ионных каналов для восстановления зрительной функции дегенерированной сетчатки является одним из новых перспективных направлений оптофармакологии. На данный момент исследован ряд фотохромных лигандов на основе азобензола, их активность показана на клеточных линиях и на моделях с «нокаутными» мышами. Для дальнейшего развития этого направления необходимо изучение физиологического действия большого количества различных фотохромных блокаторов. Цель данной работы – предложить животную модель фоторецепторной дегенерации сетчатки, более простую для получения, чем нокаутные мыши, но при этом включающую основные эффекты, необходимые для тестирования физиологического действия молекулярных фотохромных соединений. Мы изучили две новые животные модели на основе амфибий и протестировали одно из наиболее исследованных в других физиологических моделях вещество – 2-[(4-{{(E)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил}фенил)амино]-N,N,N-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид (AAQ). Первый подход заключается в механическом удалении наружных сегментов фоторецепторов. Второй предполагает индукцию процесса дегенерации палочек и колбочек внутриглазным введением антибиотика туникамицина. Данные о действии AAQ на электроретинограмму согласуются с результатами работ, в которых было показано, что это соединение способно придавать дегенерированной сетчатке светочувствительность в УФ-области спектра. Таким образом, предложенные нами модели могут быть использованы для первичного скрининга потенциальных кандидатов на восстановление зрительной функции сетчатки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярные фотохромные блокаторы калиевых каналов, зрение, фоторецепторная дегенерация сетчатки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AAQ — 2-[(4-{{(E)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил}фенил)амино]-N,N,N-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид; ЭРГ – электроретинограмма.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время широко распространены нарушения зрения, связанные с дегенерацией фоторецепторного слоя сетчатки, такие, как пигментный ретинит и возрастная макулодистрофия [1, 2]. При этом палочки и колбочки погибают, в то время как другие типы нейронов – ганглиозные, амакриновые, биполярные и горизонтальные клетки – сохраняются (рис. 1А,Б). Из-за потери фоторецепторных клеток прекращается передача информации в мозг, т.е. утрачивается зрительная функция.

В настоящее время не существует методов, гарантирующих полное излечение от этих заболеваний. Тем не менее активно разрабатываются новые стратегии, направленные на восстановление зрения после полной дегенерации фоторецепторов. К настоящему времени известно несколько подходов к решению этой проблемы. Например, показано, что имплантируемые электронные протезы сетчатки частично восстанавливают зрительную функцию у пациентов с полным отсутствием зрения [4]. Трансплантация стволовых клеток в сетчатку приводила к восстановлению реакции на свет у слепых мышей [5], а трансплантация пигментного эпителия позволила улучшить зрение у пациентов с возрастной макулодистрофией [6]. Другой подход – оптогенетический – подразумевает встраивание в нейроны сетчатки светочувствительных белков методами генетической инженерии. Это могут быть бактериальные опсины, которые представляют собой активируемые светом ионные каналы, или гибридные белки, содержащие светочувствительные домены зрительных пигментов и С-концевые домены метаболотропных рецепторов, запускающие внутриклеточную сигнализацию. Оба

оптогенетических метода приводят к частичному восстановлению реакции на свет [7, 8].

Однако все эти методы характеризуются либо высокой инвазивностью, либо необратимостью негативных побочных эффектов. Недавно был предложен альтернативный подход к восстановлению зрительной функции сетчатки с фоторецепторной дегенерацией. Он предполагает введение в сетчатку фоточувствительных молекул, связывающихся с потенциал-зависимыми калиевыми каналами на мембране сохраненных клеток – ганглиозных, амакриновых, биполярных и горизонтальных. Однако последние не имеют прямого выхода на ганглиозные клетки, поэтому в дальнейшем не рассматриваются. Связанная молекула находится в *транс*-форме и блокирует ток ионов через канал до тех пор, пока не произойдет поглощение кванта света с определенной длиной волны. В результате происходит изомеризация фотохромного соединения в *цис*-форму, не блокирующую канал, что приводит к возникновению ионного тока, изменению мембранного потенциала и генерации фотоответа (рис. 2). Молекула изомеризуется обратно в стабильную *транс*-форму либо в темноте, либо под действием света с большей длиной волны [10]. Таким образом, клетки, активированные фотохромным блокатором, начинают отвечать на световую стимуляцию в некотором диапазоне длин волн, и появляется возможность восстановить афферентную сигнализацию от глаза к мозгу (рис. 1В).

Перспективность подобного подхода показана в электрофизиологических экспериментах на клетках линии НЕК293, экспрессирующих потенциал-зависимые калиевые каналы, а также на культуре

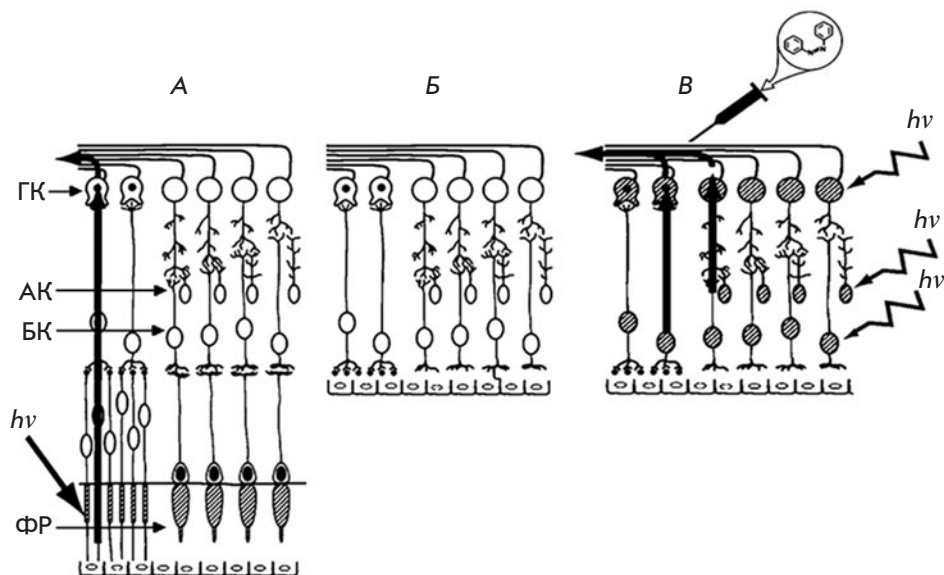


Рис. 1. Схематичное изображение сетчатки. А – здоровая сетчатка, Б – сетчатка с дегенерировавшими фоторецепторами, В – сетчатка с дегенерировавшими фоторецепторами после введения фоточувствительных соединений. ГК – ганглиозные клетки, АК – амакриновые клетки, БК – биполярные клетки, ФР – фоторецепторы, *hν* – падающий свет. Штриховкой обозначены светочувствительные клетки. Поскольку горизонтальные не имеют прямого выхода на ганглиозные, на схеме они не представлены. Схема адаптирована из работы [3] с изменениями

нейронов гиппокампа [11]. В обоих случаях клетки приобретали светочувствительность, которая в случае нейронов проявлялась в изменении частоты генерации спайков под действием света, изомеризующего молекулы фотохромного соединения. Эксперименты на слепых мышях линии rd1 с нокаутом гена *Pde6b* показали не только появление ответа на световую стимуляцию у выделенной и инкубированной с фотохромным соединением сетчатки, но и восстановление поведенческих реакций на свет у животных с внутривидовым введением препарата [12, 13].

Однако при дальнейшей работе в этом направлении возникает необходимость физиологического скрининга большого количества веществ с целью выявить наиболее эффективные. Поэтому требуется более простая в использовании животная модель фоторецепторной дегенерации сетчатки, нежели мыши с нокаутом. На основе амфибий мы создали две новые животные модели. Первый подход заключается в механическом удалении наружных сегментов фоторецепторов. Второй предполагает индукцию процесса дегенерации палочек и колбочек внутривидовым введением антибиотика туникамицина. Известно, что туникамицин нарушает процесс гликозилирования опсина и формирования мембранных дисков в наружных сегментах фоторецепторов, что приводит к их деградации в течение примерно 15–25 дней [14, 15]. Преимущество этой модели перед мышьиной заключается в простоте работы с сетчаткой холоднокровных животных по сравнению с теплокровными.

К настоящему времени разработано несколько моделей дегенерации фоторецепторов у холоднокровных, но все они выполнены на рыбах [16], в том числе с применением инъекций туникамицина [17]. Однако проведение прижизненного контроля процесса дегенерации сетчатки, необходимого для отбора животных, у которых исчезла светочувствительность, с использованием таких моделей представляется крайне проблематичным по сравнению с амфибиями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез азобензола, содержащего тетраэтиламмонийный фрагмент (AAQ, схема)

4-[(E)-(4-Нитрофенил)диазенил]анилин (1a). 4-Нитроанилин (16.9 г, 0.12 моль) растворяли в смеси воды (50 мл) и водной концентрированной соляной кислоты (50 мл) при нагревании на водяной бане. К полученному раствору при охлаждении льдом добавляли раствор нитрита натрия (8.4 г, 0.12 моль) в воде (31 мл). Образовавшийся гомогенный раствор перемешивали в течение 1 ч, а затем медленно добавляли раствор анилина (11.4 г, 0.12 моль) в смеси

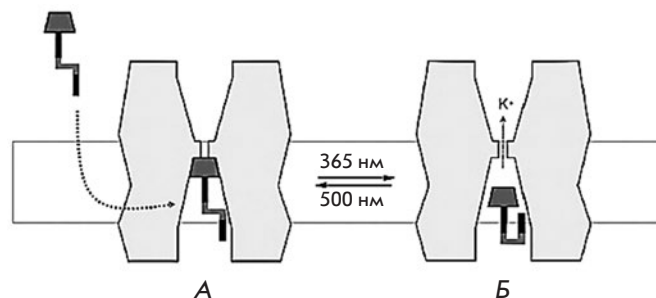


Рис. 2. Механизм действия молекулярных фотохромных соединений на K⁺-каналы. А – транс-форма фотохромного соединения, блокирующая ток ионов через канал, Б – цис-форма, не препятствующая движению ионов. Переход из одной конформации в другую происходит под действием света с определенной длиной волны. Схема адаптирована из работы [9] с изменениями

воды (122 мл) и водной концентрированной соляной кислоты (25 мл) при температуре 0–5°C. Смесь перемешивали при охлаждении в течение еще 2 ч, нейтрализовали с помощью водного раствора аммиака. Полученную смесь отфильтровывали и промывали водой и этанолом. Красно-коричневый порошок высушивали в вакууме. Получали (**1a**) с выходом 66%. $R_f = 0.74$ (гексан–этилацетат 1 : 1). ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4.41 (уш. с, 2H), 6.63 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 7.88 (д, $J = 8.1$ Гц, 2H), 8.08 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 8.35 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H).

4,4'-(E)-Диазено-1,2-дицилдианилин (16). Раствор амина (**1a**) (5.0 г, 18.5 ммоль) и нонагидрата сульфида натрия (9.8 г, 37 ммоль, 2 экв.) в этаноле (300 мл) кипятили в течение 3 ч. Растворитель отгоняли в вакууме. Образовавшееся коричневое масло перерастворяли в смеси воды (250 мл) и насыщенного водного раствора соли (15 мл), экстрагировали этилацетатом (3 × 100 мл), сушили над сульфатом магния, упаривали до примерно 50 мл и отфильтровывали через слой силикагеля (25 г). Получали (**16**) в виде красноватого порошка с выходом 80%. $R_f = 0.55$ (гексан–этилацетат 1 : 1). ¹H-ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆): δ 5.73 (с, 4H), 6.61 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H), 7.52 (д, $J = 8.7$ Гц, 4H). ¹³C-ЯМР (100 МГц, DMSO-*d*₆): δ 113.3, 124.2, 142.8, 151.4.

N-{4-[(E)-(4-Аминофенил)диазенил]фенил}акриламид (2a) и *N,N'-[(E)-дiazен-1,2-дицилбис(4,1-фенилен)]бисакриламид (2б)*. К интенсивно перемешиваемому раствору амина (**16**) (1.0 г, 4.7 ммоль) в хлористом метиле (200 мл) прикапывали раствор хлорангидрида акриловой кислоты (0.38 мл, 4.7 ммоль) в хлористом метиле (10 мл) при 0°C.

Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре в атмосфере азота. Растворитель отгоняли в вакууме. Продукты анализировали с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и разделяли на колонке с силикагелем (элюент гексан–этилацетат).

Соединение (**2a**): красно-оранжевый порошок (19%); ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 4.72 (с, 2H), 5.78 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.31 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.47 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.65 (д, $J = 8.7$ Гц, 2H), 7.79–7.94 (м, 6H), 10.34 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (100 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 114.6 (2C), 121.3 (2C), 124.2 (2C), 125.7, 127.9 (2C), 132.4, 141.3, 145.3, 149.9, 152.5, 164.5. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}$: 268.1319, найдено: 268.1324.

Соединение (**2b**): красно-коричневый порошок (42%); ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): 5.82 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 2H), 6.33 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 2H), 6.50 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 2H), 7.85–7.93 (м, 8H), 10.51 (с, 1H). HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$: 322.1424, найдено: 322.1431.

N-[4-((*E*)-{4-[(2-Хлорацетил)амино]фенил}дiazенил)-фенил]акриламид (**3**). К интенсивно перемешиваемому раствору амина (**2a**) (0.5 г, 1.8 ммоль) и DIPEA (диизопропилэтиламин, 0.9 мл, 3 экв.) в хлористом метиле (15 мл) добавляли раствор хлорангидрида хлоруксусной кислоты (0.17 мл, 1.2 экв.) в хлористом метиле (5 мл) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в течение еще 12 ч при комнатной температуре, разбавляли водой и экстрагировали хлористым метиленом (2 × 20 мл). Объединенные органические вытяжки промывали 5% водным раствором соляной кислоты (15 мл) и воды (15 мл), сушили над сульфатом магния. Полученный после отгонки растворителя коричневый порошок очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (элюент гексан–этилацетат). Получали (**3**) в виде красного порошка с выходом 53%. ^1H -ЯМР (400 МГц, $\text{DMSO}-d_6$): δ 4.32 (с, 2H), 5.83 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.32 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.50 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.81–7.90 (м, 8H), 10.48 (с, 1H), 10.64 (с, 1H). HRMS (ESI): m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ вычислено для $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{ClN}_4\text{O}_2$: 344.1035, найдено: 344.1031.

2-[(4-((*E*)-[4-акрилоиламинофенил]дiazенил)фенил)-амино]-*N,N,N*-триэтил-2-оксоэтанаммоний хлорид (**4**), AAQ. К раствору соединения (**3**) (0.3 г, 0.9 ммоль) в диметилформамиде (5 мл) добавляли триэтиламин (0.2 мл). Смесь перемешивали в течение 12 ч в атмосфере азота при 50°C. Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры, растворитель отгоняли в вакууме. Образовавшийся красный продукт растворяли в дистиллированной воде и отфиль-

тровывали нерастворившийся осадок. Растворитель отгоняли в вакууме с образованием чистого продукта (**4**), AAQ в виде красного порошка с выходом 45%. ^1H -ЯМР (400 МГц, D_2O): δ 1.12 (т, $J = 7$ Гц, 9H), 3.37 (м, 6H), 4.35 (с, 2H), 5.77 (дд, $J = 10$ и 2 Гц, 1H), 6.29 (дд, $J = 17$ и 2 Гц, 1H), 6.47 (дд, $J = 17$ и 10 Гц, 1H), 7.69–7.75 (м, 4H), 7.82–7.89 (м, 4H), 11.71 (с, 1H), 12.11 (с, 1H). ^{13}C -ЯМР (100 МГц, D_2O): 7.8 (3C), 53.3, 56.5 (3C), 120.5 (2C), 121.1 (2C), 123.2, 125.2 (2C), 128.8 (2C), 132.8, 141.8, 142.6, 148.5, 149.7, 160.4, 163.9. HRMS (ESI): m/z $[\text{M} - \text{Cl}]^+$ вычислено для $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_2$: 409.2472, найдено: 409.2469.

Модели дегенерации фоторецепторов у холоднокровных

В качестве экспериментальных животных использовали озерных лягушек (*Rana ridibunda*), отловленных в Астраханской области. Животных содержали в виварии института при температуре 20°C и цикле освещенности 12 : 12 ч, и кормили мучными червями.

Модель с механическим удалением фоторецепторов

В рамках первого подхода отработывали метод механического отделения фоторецепторного слоя от сетчатки. Выделенную из глазного бокала сетчатку наслаивали фоторецепторами на фильтровальную бумагу, а затем снимали с нее. Наружные сегменты фоторецепторов соединяются с внутренними тонкой, легко обламывающейся ресничкой, поэтому в результате описанных манипуляций они отрываются и остаются на бумаге. Таким образом, получается модель сетчатки, лишенной светочувствительных наружных сегментов фоторецепторов.

Полученный препарат тестировали электрофизиологическими методами, чтобы убедиться в отсутствии электроретинограммы (ЭРГ) в ответ на световую стимуляцию. Препарат помещали в камеру с раствором Рингера для амфибий, для регистрации трансретинальной ЭРГ от препарата сетчатки применяли пару одинаковых хлор-серебряных электродов (World Precision Instruments, Inc., США), контактирующих со средой по разные стороны сетчатки. Состав раствора Рингера для препаратов изолированной сетчатки был следующим: 90 мМ NaCl, 2.5 мМ KCl, 1.4 мМ MgCl_2 , 10 мМ глюкозы, 1.05 мМ CaCl_2 , 5 мМ NaHCO_3 , 5 мМ HEPES, 0.05 мМ EDTA, 50 мг/л бычьего сывороточного альбумина. Для стимуляции использовали белый (415–745 нм) и ультрафиолетовый (УФ, 365 нм) светодиоды. Интенсивность стимулов по обоим каналам контролировалась током через светодиоды и нейтральными светофильтрами. ЭРГ регистрировали с дискретизацией 5 мс на точку, с аналоговой фильтрацией в полосе 0–100 Гц вось-

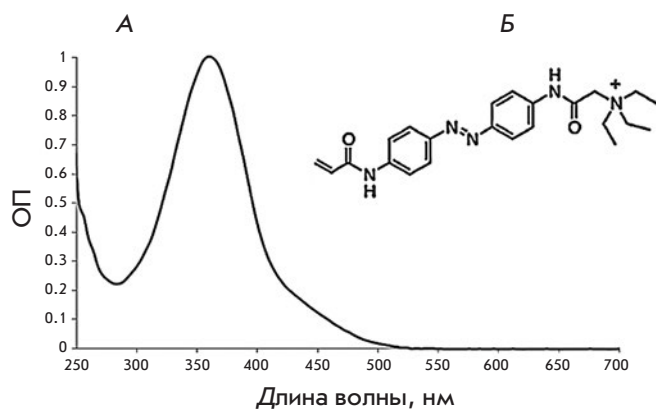


Рис 3. Спектр транс-формы ААQ в растворе Рингера для амфибий (А) и структурная формула ААQ (Б)

миполосным фильтром Бесселя. Управляющая программа была создана в лаборатории в среде Microsoft Visual Basic 96.

Модель сетчатки без фоторецепторов тестировали в эксперименте с фотохромным соединением на основе азобензола ААQ, чья эффективность известна из работы, выполненной на нокаутных мышах [12]. Для этого экспериментальную камеру заполняли 1 мМ раствором ААQ (в растворе Рингера), в котором инкубировали сетчатку в течение 30 мин. Далее раствор заменяли на чистый раствор Рингера и проводили запись ЭРГ. Известно, что ААQ меняет пространственную конформацию под действием света длиной волны 365 нм (рис. 3), поэтому его действие на дегенерировавшую сетчатку проверяли при помощи коротких вспышек и длительных засветок от УФ-светодиода. В качестве контроля использовали зеленый свет (520 нм, белый светодиод с соответствующим светофильтром).

Модель туникамицин-индуцированной фоторецепторной дегенерации

Лягушкам вводили раствор туникамицина (Sigma, из расчета 1 мкг антибиотика на 10 г массы лягушки) в DMSO в концентрации 0.5 мг/мл в один глаз; второй глаз служил контролем, в него вводили чистый растворитель в том же объеме. Через 2 ч после инъекции, а затем с интервалом в 7 дней регистрировали прижизненную ЭРГ. Перед инъекциями и записью ЭРГ лягушек анестезировали препаратом MS-222 (Sigma, водный раствор 1 мг/мл). Регистрацию с поверхности роговицы глаза анестезированного животного проводили в той же экспериментальной установке, что и для записей от препарата изолированной сетчатки. Для этого применяли серебряный проволочный кольцевой электрод, контактирующий с роговицей при помощи токопроводящего офталь-

мологического геля, с молочно-белым диффузором, распределяющим свет равномерно по площади зрачка. Электродом сравнения служил серебряный проволочный электрод, закладываемый животному в ротовую полость. Световую стимуляцию проводили с помощью коротких (10 мс) насыщающих вспышек белого светодиода. Таким образом прослеживали процесс дегенерации фоторецепторов. После того как у животных пропадал фотоответ, их декапитировали и получали препарат сетчатки, лишенной фоторецепторов. Параметры записи (дискретизация и полоса фильтрации) были такими же, как при регистрации ЭРГ от изолированной сетчатки с механически удаленными фоторецепторами.

Препарат сетчатки, выделенной из глаза, подвергнувшегося действию туникамицина и потерявшего светочувствительность, дополнительно проверяли на отсутствие ЭРГ, а затем тестировали с фотохромным соединением ААQ так же, как и в случае модели с механическим удалением фоторецепторов.

Морфологический контроль фоторецепторной дегенерации

После исчезновения фотоответов в глазу, в который вводили туникамицин, у трех лягушек после декапитации производили забор глазных бокалов для последующего гистологического исследования. Использовали такой же протокол фиксации препаратов, как в работе Силлмана и соавт. [18]. Глазные бокалы на 1.5 ч помещали в 1% раствор глutarового альдегида в 0.1 М фосфатном буфере. Затем препараты дополнительно фиксировали в 4% растворе параформальдегида в 0.1 М фосфатном буфере в течение 4 ч и хранили в течение нескольких недель в 1% растворе параформальдегида. Потом препараты подвергали отмывке в 0.1 М фосфатном буфере, дегидратации в этаноле и заливали в эпоксидную смолу LR White (Fluka). Срезы толщиной 1–3 мкм изготавливали с помощью ультрамикротомы LKB, окрашивали толуидиновым синим и проводили световую микроскопию с целью выявления слоя фоторецепторных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез азобензола, содержащего тетраэтиламмонийный фрагмент (ААQ)

Водорастворимый азобензол, содержащий тетраэтиламмонийный фрагмент, был синтезирован в несколько стадий из простых и легкодоступных соединений. Азогруппу вводили реакцией азосочетания соответствующей соли диазония с анилином (схема). Полученный 4-нитроазобензол (1а) может быть восстановлен до 4,4'-диаминоазобензола (1б) с помощью

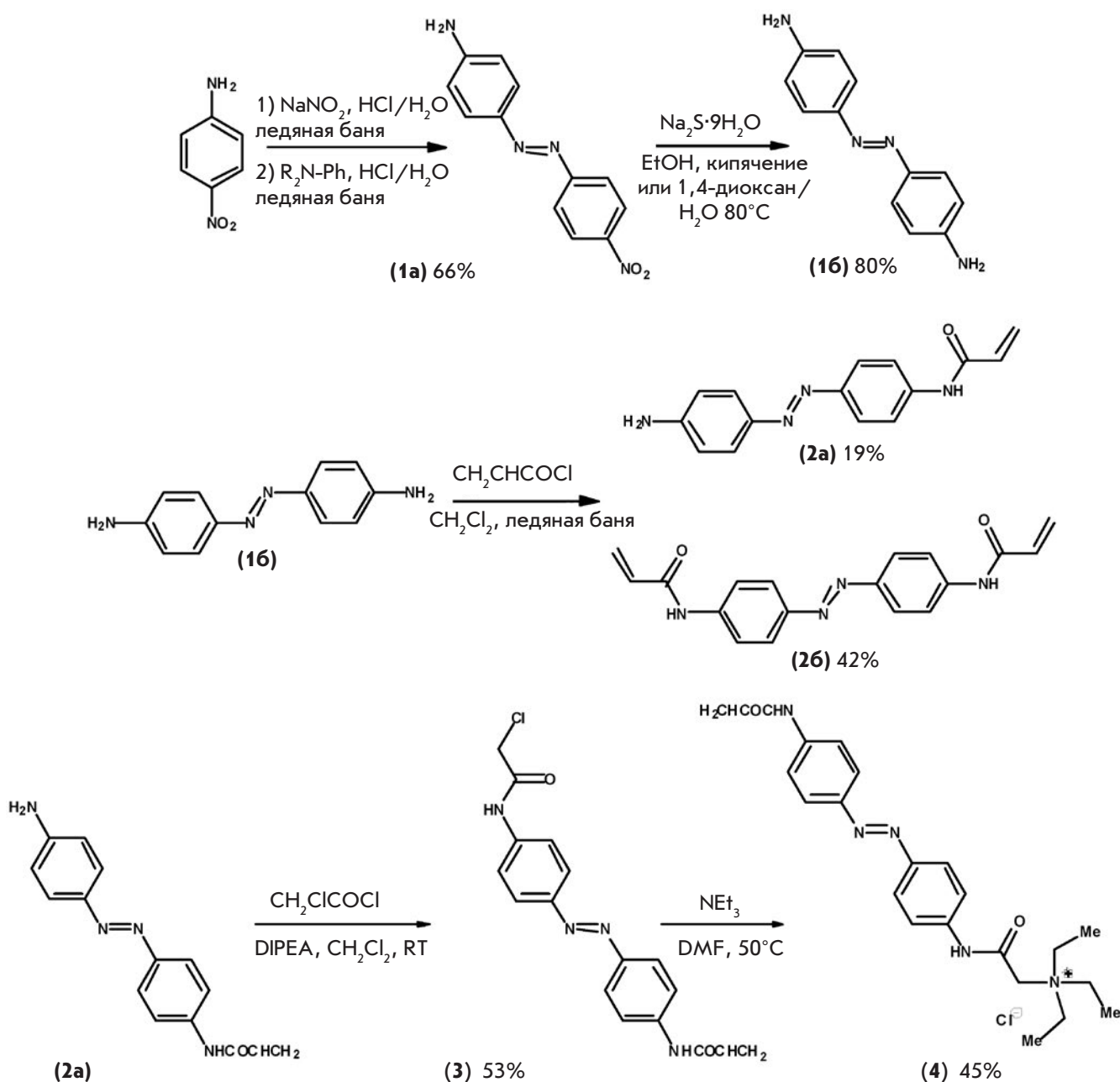


Схема. Синтез аминоазобензола, содержащего четвертичный аммонийный катион

сульфида натрия как в кипящем этаноле, так и в водном 1,4-диоксане (схема). Монозамещенный 4,4'-диаминоазобензол (2a) был получен в результате реакции азобензола (16) с хлорангидридом акриловой кислоты. В качестве побочного продукта в данной реакции образуется соответствующий диаддукт (26) (схема). Четвертичный аммонийный катион был введен в целевой продукт в две стадии (схема). На первой стадии в результате обработки аминоазобензола (2a) хлорангидридом хлоруксусной кислоты образу-

ется амид (3), взаимодействие которого с триэтиламино приводит к образованию целевого соединения (4) (AAQ) с умеренными выходами.

Модели дегенерации фоторецепторов у холоднокровных

Модель с механическим удалением фоторецепторов. Регистрация ЭРГ показала, что препарат интактной сетчатки содержит все основные компоненты

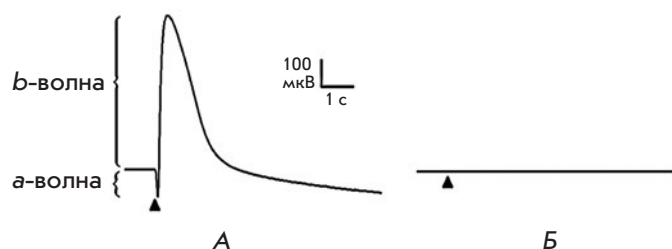


Рис. 4. ЭРГ препарата интактной сетчатки в ответ на световую стимуляцию (А) и ЭРГ препарата сетчатки после механического удаления фоторецепторов (Б). Стимуляция зеленым светом (520 нм), длительность вспышки 10 мс, интенсивность 2.9×10^6 фотонов/мкм²/с. Момент вспышки обозначен треугольником

ретинограммы: а-волну, характеризующую гиперполяризацию фоторецепторов, и b-волну, которая проявляется как результат работы мюллеровских и биполярных клеток (рис. 4А). После механического удаления фоторецепторного слоя наблюдается либо отсутствие ответа на стимуляцию светом как видимого диапазона, так и УФ, либо наличие слабых остаточных ответов амплитудой несколько мкВ (рис. 4). При этом у остаточного ответа сохраняется только b-волна, в то время как а-волна полностью исчеза-

ет (рис. 5А,В). Эти результаты говорят о том, что использованный подход позволяет получить рабочую модель дегенерировавшей сетчатки, которую можно использовать в дальнейших исследованиях.

Результаты проверки с фотохромным соединением ААQ. Стимуляция сетчатки зеленым светом, проведенная после инкубации в растворе ААQ, как и ожидалось, не привела к возникновению ответа (рис. 5Б). Реакции на короткие вспышки УФ-света не возникали, в то время как длительная стимуляция УФ приводит к возникновению ответа, направленного в ту же сторону, что и а-волна нормальной ЭРГ амплитудой от 10 до 100 мкВ (рис. 5Г). Ответ заключается в изменении потенциала, которое прекращается сразу после выключения засветки, после чего потенциал сохраняет стабильное значение. Возврата потенциала к исходному уровню либо не происходит, либо он слишком медленный. Амплитуда возникающего ответа зависит от интенсивности светового стимула: чем выше интенсивность УФ-стимула, тем больше изменение потенциала (рис. 6).

Модель туникамицин-индуцированной фоторецепторной дегенерации. Инъекции туникамицина приводили к прогрессирующему уменьшению амплитуды ответа на короткие вспышки света (рис. 7). На панели а видно, что амплитуда ЭРГ глаза, в ко-

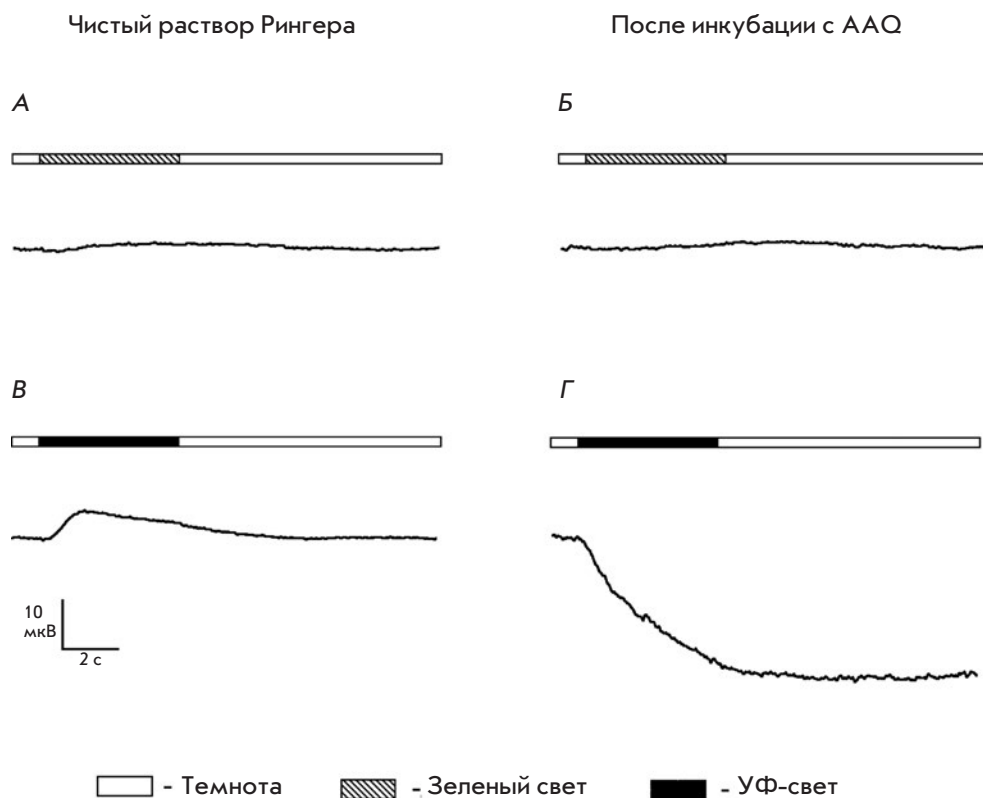


Рис. 5. Сравнение трансретиальной ЭРГ сетчатки с механически удаленными фоторецепторами, возникающей в ответ на зеленый и УФ-стимул в чистом растворе Рингера (А, В), и после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (Б, Г). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Длительность световой стимуляции 5 с. Интенсивность зеленого света (520 нм) – 2.9×10^8 фотонов/мкм²/с. Интенсивность УФ (365 нм) – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с

□ - Темнота ▨ - Зеленый свет ■ - УФ-свет

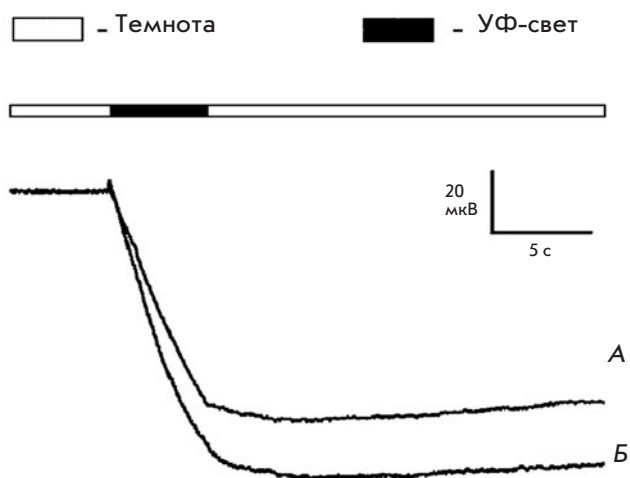


Рис. 6. Ответы сетчатки с механически удаленными фоторецепторами на длительную (5 с) УФ-засветку (365 нм) разной интенсивности после инкубации с ААQ. А – интенсивность 2.7×10^8 фотонов/ $\mu\text{м}^2/\text{с}$, Б – 6.5×10^8 фотонов/ $\mu\text{м}^2/\text{с}$. Сверху приведена схема световой стимуляции

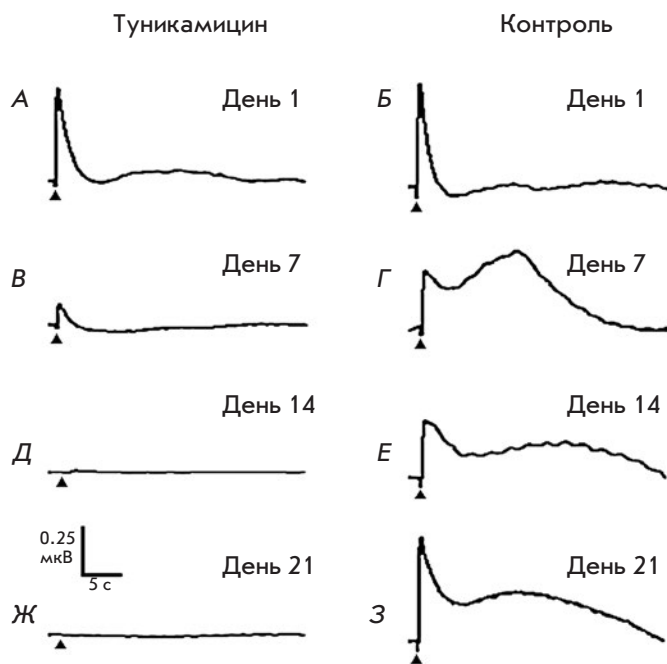


Рис. 7. ЭРГ, регистрируемая с роговицы анестезированной лягушки на разных сроках после инъекций. А, В, Д, Ж – от глаза, в который вводили туникамицин. Б, Г, Е, З – от глаза, в который вводили только растворитель (DMSO). Стимуляция белым светом (диапазон 415–745 нм), длительность вспышки 10 мс, интенсивность примерно 9 Вт/ $\mu\text{м}^2$ площади зрачка. Момент вспышки обозначен треугольником

торый был введен туникамицин, на насыщающую вспышку света постепенно снижалась, и на 14–21 день ответ исчезал полностью, что говорит о дегенерации фоторецепторного слоя и утрате светочувствительности сетчатки в целом. Контрольный глаз, в который вводили чистый растворитель (DMSO) (рис. 7Б), сохранял реакцию на световую стимуляцию на всех сроках после инъекции, что свидетельствует о том, что сама по себе инъекция не нарушает работу сетчатки.

Микроскопия срезов глазных бокалов подтвердила селективную дегенерацию фоторецепторных клеток сетчатки под действием туникамицина. На рис. 8А, где показан поперечный срез глазного бокала, выделенного из контрольного глаза лягушки (инъекция DMSO), хорошо видны все слои сетчатки. В сетчатке глаза, подвергнутого действию туникамицина, слой фоторецепторных клеток отсутствует (рис. 8Б), но биполярные, амакриновые и ганглиозные клетки сохраняются. Следовательно, такая модель дегенерации потенциально может использоваться для тестирования молекулярных фотохромных соединений.

Изолированная сетчатка из глаза, подвергнутого действию туникамицина, не отвечала на стимуляцию ни зеленым светом, ни УФ (рис. 9А,В), что подтверждает результаты записи прижизненной ЭРГ и наглядно показывает, что проведенные манипуляции привели к желаемому результату – получению модели фоторецепторной дегенерации.

Результаты проверки с фотохромным соединением ААQ. Инкубация в растворе ААQ приводит к тому, что длительная засветка УФ, как и в модели сетчатки с механически удаленными фоторецепторами, вызывает возникновение ответа, направленного в ту же сторону, что и а-волна нормальной ЭРГ амплитудой 10–30 мкВ (рис. 9Б,Г). Регистрируемый сигнал после выключения засветки сохраняет стабильное значение, т.е. характер ответа совпадает с ответом модели с механически удаленными фоторецепторами. Стимуляция зеленым светом не приводит к возникновению ответа.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ААQ восстанавливает светочувствительность модельного препарата в области ближнего УФ, предположительно за счет светозависимой регуляции ионных каналов молекулами фотохромного соединения, причем оба подхода к получению модели дегенеративной сетчатки дают сходные результаты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данного исследования стали две новые экспериментальные модели фоторецепторной дегенерации сетчатки, которые можно в дальнейшем ис-

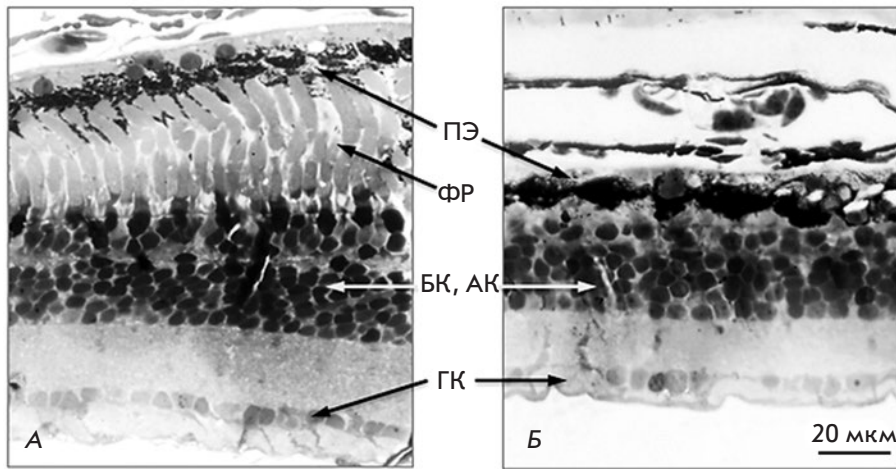


Рис. 8. Световая микроскопия препаратов сетчатки. А – сетчатка контрольного глаза, в который вводили DMSO. Б – сетчатка глаза, в который вводили туникамицин. ПЭ – пигментный эпителий, ГК – ганглиозные клетки, АК – амакриновые клетки, БК – биполярные клетки, ФР – фоторецепторы. В сетчатке, подвергнутой действию туникамицина, фоторецепторный слой отсутствует, однако сохранились другие типы клеток

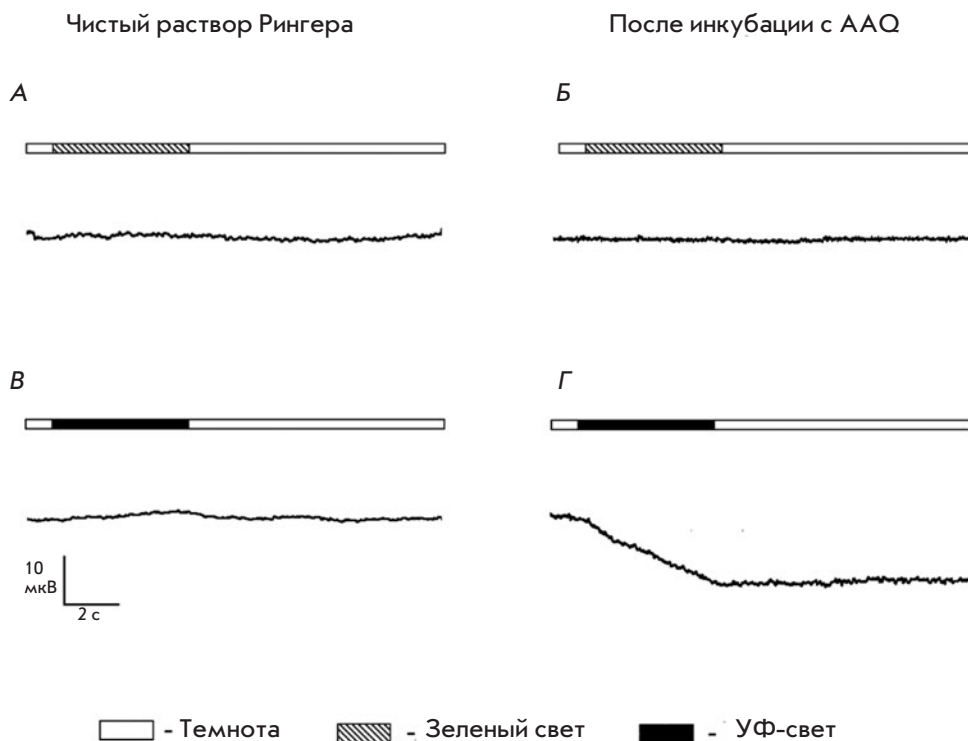


Рис. 9. Сравнение трансретинальной ЭРГ сетчатки, дегенерировавшей под действием туникамицина, возникающей в ответ на зеленую и УФ-засветки, в чистом растворе Рингера (А, В) и после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (Б, Г). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Длительность световой стимуляции 5 с. Интенсивность зеленого света (520 нм) – 2.9×10^8 фотонов/мкм²/с. Интенсивность УФ (365 нм) – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с

пользовать для первичного скрининга новых молекулярных фотохромных блокаторов калиевых каналов.

Полученные нами данные о действии ААQ на ЭРГ согласуются с результатами других авторов, которые показали, что это соединение способно придавать дегенерировавшей сетчатке светочувствительность в УФ-области спектра [12]. Продемонстрированный авторами эффект молекулярных фотохромных соединений выразался в том, что под действием длительной стимуляции УФ частота генерации спайков

ганглиозными клетками заметно возрастала (регистрация с помощью мультиэлектродной матрицы), а при выключении света или замены его на зеленый – возвращалась к исходному уровню. В настоящей работе мы показали, что при чередовании УФ-стимула и темноты, а также УФ и зеленого света наблюдается несколько иная картина: потенциал изменяется только во время УФ-засветки, а в темноте или при зеленом освещении уровень сигнала остается стабильным, но без возврата к исходному уровню (рис. 10).

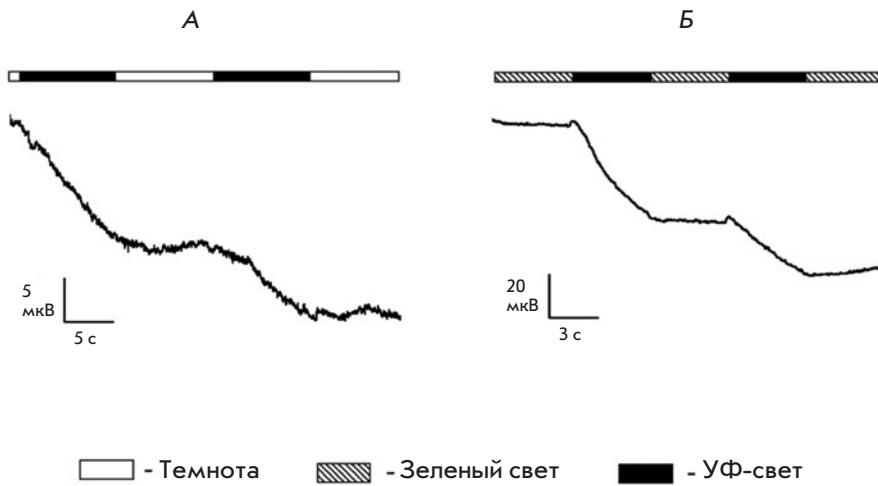


Рис. 10. Запись ЭРГ от сетчатки, дегенерировавшей под действием туникамицина, при чередовании УФ-засветки (365 нм) с периодами темноты после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (А) и запись ЭРГ от сетчатки с механически удаленными фоторецепторами при чередовании УФ (365 нм) засветок с зелеными (520 нм) после 30 мин инкубации в 1 мМ ААQ (Б). Для каждого графика приведена схема световой стимуляции. Интенсивность зеленого света – 2.9×10^8 фотонов/мкм²/с. Интенсивность УФ – 6.5×10^8 фотонов/мкм²/с

Наши данные также говорят о том, что ААQ не может рассматриваться как кандидат на применение в клинической практике для восстановления зрительной функции, не только ввиду своей неспособности к работе под действием света, видимого человеческим глазом, но также из-за сверхмедленной кинетики выключения возникающих фотоответов. Однако полученные на амфибиях модели фоторецепторной дегенерации могут быть использованы для тестирования новых соединений и выявления наиболее перспективных. Подход, предполагающий механическое удаление фоторецепторов, позволяет получить модельный препарат быстро, и его применение ускоряет процесс скрининга фотохромных соединений. В то же время туникамициновая дегенерация фоторецепторов происходит постепенно, и в сетчатке успевают произойти структурные перестройки, характерные для таких заболеваний, как пигментный ретинит и возрастная макулодистрофия [19]. Туникамициновая модель позволяет исследовать действие молекулярных фотохромных соединений в ремоделированной сетчатке.

В дальнейшем модель туникамициновой дегенерации можно будет апробировать на лабораторных крысах с целью получения модели, более прибли-

женной к человеку, и изучения эффекта действия соединений на сетчатке теплокровных. Попытки создать модель туникамициновой дегенерации фоторецепторов на крысах уже предпринимались и описаны [20], однако действие молекулярных фотохромных соединений в рамках такой модели не изучено. ●

Выражаем благодарность В.И. Говардовскому (ИЭФБ РАН) за консультации и помощь в проведении электрофизиологических экспериментов и микроскопии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-29-03872).

М. Н. Рязанцев и В.М. Бойцов благодарят за финансовую поддержку Фонд «Сколково» (Соглашение о предоставлении гранта российской образовательной и научной организации № 7 от 19.12.2017) и Сколковский институт науки и технологий (Генеральное соглашение о научно-исследовательской деятельности № 3663-MRA от 25.12.2017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hamel C. // Orphanet J. Rare Dis. 2006. V. 1 (1). P. 1–40.
- Guadagni V., Novelli E., Piano I., Gargini C., Strettoi E. // Prog. Retinal Eye Res. 2015. V. 48. P. 62–81.
- Drivas T.G., Bennett J. // Neuron. 2012. V. 75 (2). P. 185–187.
- Weiland J.D., Cho A.K., Humayun M.S. // Ophthalmology. 2011. V. 118 (11). P. 2227–2237.
- Lamba D.A., Gust J., Reh T.A. // Cell Stem Cell. 2009. V. 4 (1). P. 73–79.
- Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C.K., Ostrick R.M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., Lanza R. // Lancet. 2012. V. 379 (9817). P. 713–720.
- Sahel J.A., Roska B. // Annu. Rev. Neurosci. 2013. V. 36. P. 467–488.
- van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S. // PLoS Biol. 2015. V. 13 (5). e1002143.
- Mourot A., Kienzler M.A., Banghart M.R., Fehrentz T., Huber F.M., Stein M., Kramer R.H., Trauner D. // ACS Chem. Neurosci. 2011. V. 2 (9). P. 536–543.

10. Banghart M.R., Mourot A., Fortin D.L., Yao J.Z., Kramer R.H., Trauner D. // *Angewandte Chem. Internat. Ed.* 2009. V. 48 (48). P. 9097–9101.
11. Fortin D.L., Banghart M.R., Dunn T.W., Borges K., Wagenaar D.A., Gaudry Q., Karakossian M.H., Otis T.S., Kristan W.B., Trauner D., Kramer R.H. // *Nat. Meth.* 2008. V. 5 (4). P. 331–338.
12. Polosukhina A., Litt J., Tochitsky I., Nemargut J., Sychev Y., De Kouchkovsky I., Huang T., Borges K., Trauner D., van Gelder R.N., Kramer R.H. // *Neuron.* 2012. V. 75 (2). P. 271–282.
13. Tochitsky I., Polosukhina A., Degtyar V.E., Gallerani N., Smith C.M., Friedman A., van Gelder R.N., Trauner D., Kaufer D., Kramer R.H. // *Neuron.* 2014. V. 81 (4). P. 800–813.
14. Fliesler S.J., Basinger S.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82 (4). P. 1116–1120.
15. Fliesler S.J., Rapp L.M., Hollyfield J.G. // *Nature.* 1984. V. 311 (5986). P. 575–577.
16. Blanco-Sánchez B., Clément A., Phillips J.B., Westerfield M. // *Meth. Cell Biol.* 2017. V. 138. P. 415–467.
17. Negishi K., Sugawara K., Shinagawa S., Teranishi T., Kuo C.H., Takasaki Y. // *Developmental Brain Res.* 1991. V. 63 (1–2). P. 71–83.
18. Sillman A.J., Govardovskii V.I., Röhlich P., Southard J.A., Loew E.R. // *J. Comparative Physiol. A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiol.* 1997. V. 181 (2). P. 89–101.
19. Marc R., Pfeiffer R., Jones B. // *ACS Chem. Neurosci.* 2014. V. 5 (10). P. 895–901.
20. Shirai Y., Mori A., Nakahara T., Sakamoto K., Ishii K. // *Biol. Pharmaceut. Bull.* 2015. V. 38 (7). P. 1076–1080.

УДК 602.6:57.083

Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2e вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков

Л. А. Степанова^{1*}, Р. Ю. Котляров², М. А. Шуклина¹, Е. А. Блохина², М. В. Сергеева¹, М. В. Потапчук¹, А. А. Ковалева¹, Н. В. Равин², Л. М. Цыбалова¹

¹Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, 15/17

²Институт биоинженерии, Исследовательский центр биотехнологии РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

*E-mail: stepanova60@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2016

Принята к печати 23.01.2018

РЕФЕРАТ Эктодомен белка M2 и консервативные регионы второй субъединицы HA являются перспективными антигенами для создания вакцин с широким протективным потенциалом. На основе флагеллина, четырех копий эктодомена белка M2 вирусов гриппа А и консервативного фрагмента HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II, содержащего В-клеточные, CD4+ и CD8+ Т-клеточные эпитопы, сконструированы два гибридных рекомбинантных белка с различным порядком присоединения целевых антигенов к С-концу флагеллина. 3D-моделирование структуры двух гибридных белков показало, что внутренняя локализация четырех копий M2e приводила к частичной α -спирализации, нехарактерной для нативной конформации M2e на поверхности вириона. Концевое расположение M2e в большей степени обеспечивало сохранность нативной конформации M2e. Конформационные различия в структуре двух белков влияли на их иммуногенность. Выявлены различия в уровне продукции антител двумя гибридными белками. Белок с концевым положением M2e был более иммуногенным, чем белок с концевым положением участка HA2. Иммунизация гибридным белком с концевым расположением M2e полностью защищала животных от летального заражения. Показано, что порядок расположения целевых антигенов в рекомбинантном белке может влиять на третичную структуру рекомбинантного белка, а также на его иммуногенность и протективный эффект.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вакцина, грипп, HA2, M2e, рекомбинантный белок, флагеллин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ M2e – эктодомен белка M2 вируса гриппа; HA – гемагглютинин; HA2 – вторая субъединица гемагглютинина; Flg – флагеллин; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ИФА – иммуноферментный анализ; ОП – оптическая плотность; СГТ – среднегеометрический титр; ТЦИД50 – 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза вируса.

ВВЕДЕНИЕ

Создание вакцин нового поколения, способных обеспечить защиту от широкого спектра вирусов гриппа А, а также от тяжелых форм гриппа А в течение по крайней мере 5 лет, является глобальной задачей. В качестве целевых антигенов при конструировании таких вакцин рассматривают консервативные белки вируса гриппа (M2, HA2, M1, NP). В настоящее время на основе высококонсервативного эктодомена белка M2 (M2e) разработан ряд кандидатных вакцин, показана их иммуногенность и протективность у животных, безопасность и иммуногенность у человека

[1–7]. Вакцины на основе M2e не относятся к профилактическим, они не предотвращают развитие инфекции, однако снижают тяжесть заболевания, ограничивая репликацию вируса, и обеспечивают защиту от вирусов гриппа со сходной последовательностью M2e [8–11]. Защитное действие вакцин на основе M2e зависит от антител [8, 10, 12, 13]. Механизм действия анти-M2e-иммунитета обусловлен антителозависимой клеточной цитотоксичностью и антителозависимым клеточно-обусловленным фагоцитозом. Анти-M2e-антитела в отличие от анти-HA-антител не предотвращают вирусную инфекцию и не явля-

ются нейтрализующими, но могут лизировать инфицированные вирусом гриппа клетки и тем самым ограничивать репликацию вируса [9, 11, 14].

В последнее время пристальное внимание привлекает консервативная в пределах филогенетической группы вторая субъединица HA (HA2), которая отвечает за слияние вирусной и клеточной мембраны в эндосомах, обеспечивая таким образом попадание рибонуклеинового комплекса в цитоплазму [15]. Перекрестно реагирующие моноклональные антитела, которые взаимодействуют с эпитопами, локализованными в стеблевой части HA, могут нейтрализовать вирусы гриппа в пределах филогенетической группы [16–22]. Предприняты попытки поиска наиболее перспективных эпитопов HA2 вирусов гриппа A филогенетических групп I и II (аминокислотные остатки 38–59, 23–185, 1–172, 76–103, 35–107) и конструирования рекомбинантных белков на их основе [23–27]. Исследования на животных показали, что такие белки формируют как гуморальный, так и цитотоксический T-клеточный ответ, они эффективно защищают от заражения летальными дозами гомологичного и гетерологичного вирусов одной филогенетической группы.

Вакцина на основе консервативных участков нескольких вирусных белков, вызывающих как гуморальный, так и T-клеточный ответ, и нейтрализующих широкий спектр вирусных штаммов, была бы значительно более эффективной.

В качестве платформы для разработки рекомбинантных вакцин на основе слабо иммуногенных антигенов против вирусных и бактериальных патогенов рассматривается флагеллин [2, 28]. Адьювантный эффект флагеллина обусловлен его способностью связываться с TLR5 на CD11c+ антигенпредставляющих клетках, что объясняет усиление иммуногенности слитых с флагеллином антигенов и способности стимулировать CD4+ T-зависимый гуморальный ответ [28–31]. Способность флагеллина служить одновременно и платформой, и адьювантом при разработке вакцин показана на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [2, 6, 27, 32–34].

В данной работе изучена возможность получения рекомбинантного белка на основе консервативных участков двух вирусных белков (M2 и HA), слитых с C-концом полноразмерного флагеллина. Сконструированы два рекомбинантных белка с различным порядком присоединения к C-концу флагеллина M2e пептидов разных субтипов вирусов гриппа A и консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинина вирусов гриппа второй филогенетической группы. Рассмотрено влияние порядка присоединения целевых антигенов к флагеллину

на структуру, стабильность и иммуногенность рекомбинантных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выбор консервативного фрагмента HA2 вирусов гриппа филогенетической группы II

Аминокислотные последовательности HA2 получены из баз данных GenBank и GISAID. Для построения консенсусов последовательности выравнивали с использованием сервера MAFFT и алгоритмов FFT-NS-i, FFT-NS-2 (в зависимости от числа последовательностей) [35] и анализировали в программном пакете Unipro UGENE v.1.14.0 [36]. Выравнивание и анализ небольшого числа последовательностей проводили в программном пакете VectorNTI (Invitrogen, США). Поиск экспериментальных В- и CD4+ T-клеточных эпитопов, гомологичных участкам HA2, проводили в базе данных Immune Epitope Database [37]. Поиск вероятных T-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server [38] и параметров поиска, установленных по умолчанию. Изображение трехмерной структуры HA получали в программе UCSF Chimera v.1.9 [39] с использованием моделей 4JTV (4O5I (A/Victoria/06/2011(H3N2)), взятых из базы данных RCSB Protein Data Bank. Визуализацию трехмерной структуры белков выполняли в программе Chimera 1.5.3 [39]. Для гомологичного моделирования трехмерной структуры белка по аминокислотной последовательности использовали открытый веб-ресурс Phyre2 [40].

Конструирование экспрессионных векторов

Плазмиду pQE30 (Qiagen) использовали для конструирования векторов, обеспечивающих экспрессию белков с различным порядком присоединения целевых антигенов. Гибридный белок Flg-4M2e-HA2 содержал флагеллин из *Salmonella typhimurium* (Flg), к C-концу которого были последовательно присоединены четыре копии пептида M2e (две копии консенсусной последовательности M2e вирусов гриппа человека A (M2eh) и две M2e вируса гриппа птиц A/H5N1 (M2ek)) и консенсусный фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II. Во втором гибридном белке (Flg-HA2-4M2e) к флагеллину был сначала присоединен HA2-фрагмент, а затем четыре копии пептида M2e. Химерные гены конструировали с использованием стандартных методов геной инженерии. Ген флагеллина был получен ранее с помощью ПЦР на геномной ДНК *S. typhimurium* и клонирован. Нуклеотидные последовательности, кодирующие консенсусную последовательность HA2 (76–130) вирусов гриппа вто-

рой филогенетической группы и тандемные копии M2e синтезировали *in vitro*. Для экспрессии HA2 в клетках *Escherichia coli* проводили оптимизацию состава кодонов. Таким образом, были созданы векторы pQE30_Flg_HA2_4M2e и pQE30_Flg_4M2e_HA2, обеспечивающие получение соответствующих рекомбинантных белков.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

С целью получения штаммов, продуцирующих рекомбинантные белки, клетки *E. coli* штамма DLT1270 трансформировали плазмидами pQE30/Flg-HA2-4M2e и pQE30/Flg-4M2e-HA2. Штамм DLT1270, производное DH10B [41], содержит ген репрессора лактозного оперона *lacI*, интегрированный в хромосому. Штаммы-продуценты накапливали в среде LB с ампициллином до середины логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0.4-0.7$) при 37°C, затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0.1 mM и культивировали в течение еще 4 ч при 37°C. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез и вестерн-блот

Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли [42]. Пробы смешивали с буфером для нанесения, содержащим β-меркаптоэтанол, кипятили в течение 7 мин и наносили в градиентный 8–16% ПААГ. Электрофорез проводили в течение 1.5 ч при 10–12 mA. Гель фиксировали 10% уксусной кислотой и окрашивали Кумасси G-250 в течение 18 ч. Горизонтальный перенос белков из ПААГ на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad, США) осуществляли в ТВ-буфере (0.03 M глицин, 0.04 M Трис, 0.037% додецилсульфат Na, 20% этанол) с использованием системы Mini Trans-Blot cell (BioRad, США) в охлаждаемой камере при +4°C в течение 1.5 ч при постоянном токе 200 mA. Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин, Amresco, ЕС) в фосфатно-солевом буфере (ФБР) в течение ночи при комнатной температуре, полосы рекомбинантных белков определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными анти-M2e-антителами 14C2 (ab5416, Abcam, Великобритания). Мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с первичными антителами, разведенными в ФБР с 0.1% Твин 20 (ФБРТ) и 3% БСА, затем отмывали в ФБРТ. Белки выявляли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре вторичными антителами (антимышинные IgG козы, Abcam), мечеными пероксидазой хрена и последующей инкубацией в течение 5 мин

с субстратом ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Иммунизация мышей

Мыши Balb/c (самки массой 16–18 г) получены из питомника «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий РАМН. Животных содержали в виварии НИИ гриппа Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Мышей иммунизировали рекомбинантными белками Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e интраназально (после ингаляционной анестезии 2–3% изофлюрана, 30% O₂, 70% N₂O) трехкратно с интервалом 2 недели в дозе 6 мкг/0.1 мл. Контрольным мышам вводили интраназально 0.1 мл ФБР.

Получение сывороток и бронхоальвеолярных лаважей

Образцы крови и бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO₂-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре -20°C.

Для получения БАЛ труп животного фиксировали на операционном столике брюшком вверх. Кожу разрезали по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3–5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре -20°C.

Синтетические пептиды

Иммуногенность рекомбинантных белков оценивали с использованием следующих синтетических пептидов, синтезированных НПО «Верта»:

M2ek SLLTEVETPTRNEW**E**CRCSDSSD (M2e вируса гриппа A/Курган/05/05 (H5N1)),

M2eh SLLTEVETPIRNEW**G**CRCNDSSD (консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа A человека).

Отличающиеся аминокислотные остатки выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Иммуноферментный анализ

Уровень специфических IgG и IgA у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, определяли в ИФА в 96-луночных планшетах с высокой сорбци-

онной способностью (Greiner, Германия). На планшеты сорбировали M2e-пептиды (5 мкг/мл) или очищенный вирус А/Аичи/2/68 (H3N2) (2 мкг/мл) в ФБР (рН 7.2) в течение ночи при 4°C.

Планшеты блокировали ФБР с 5% ЭТС (300 мкл/лунка) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем планшеты отмывали 3 раза ФБР с Твин. В лунки планшетов добавляли по 100 мкл двукратных разведений сывороток или БАЛ в блокирующем буфере, инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Использовали поликлональные козы антимышинные IgG и IgA (Abcam), меченные пероксидазой хрена в разведении 1 : 20000. В качестве субстрата использовали ТМБ (BD Bioscience, США), инкубация 15 мин. Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера i-Mark (Bio-Rad) при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором оптическая плотность по крайней мере в 2 раза превышает среднее значение бланка.

Вирусы и заражение мышей

В работе использован штамм, полученный из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа НИИ гриппа Минздрава России – А/Аичи/2/68 (H3N2). Для заражения использовали вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), адаптированный к мышам. Этот штамм получен в НИИ гриппа серией пассажей (мышь/куриный эмбрион) родительского штамма дикого типа. Адаптированный штамм А/Аичи/2/68 (H3N2) сохранял антигенные свойства исходного штамма дикого типа, но приобрел способность летально инфицировать мышей. Аминокислотная последовательность поверхностных белков (M2, NA и HA) этого вируса была такой же, как у вируса гриппа дикого типа [6]. На 14-й день после последней иммунизации мышей Balb/c (по восемь мышей в опытных и контрольной группах) заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD50. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлюрана, 30% O₂, 70% N₂O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали ежедневно по динамике падения массы тела и выживаемости мышей после заражения. В качестве отрицательного контроля в эксперименте по летальному заражению использовали мышей, которым вводили ФБР.

Репродукция вирусов гриппа в легких

Мышей (по три особи в каждой группе) интраназально заражали вирусами гриппа А/Аичи/2/68

(H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD50 через 14 дней после третьей иммунизации. На 6-й день после заражения мышей подвергали эвтаназии (CO₂-камера для эвтаназии, Vet Tech Solutions) и асептически удаляли легкие. Легкие гомогенизировали в 2.7 мл ФБР (Tissue Lyser II homogenizer, Qiagen, США) для получения 10% (w/v) суспензии, центрифугировали в течение 15 мин при 400 g и 4°C для удаления клеточного дебриса и хранили при -20°C. Для определения титра вируса гриппа использовали культуру клеток MDCK в среде MEM, выращенных на 96-луночных панелях. Клетки заражали серийными десятикратными разведениями легочного гомогената (в квадрипликатах) от 10⁻¹ до 10⁻⁸ и инкубировали в термостате (36.0 ± 0.5°C) в течение 72 ч. По окончании срока инкубации культуральную жидкость переносили в лунки планшета для иммунологических реакций, после чего добавляли равный объем 1% куриных эритроцитов в физиологическом растворе. Уровень репродукции вируса в лунках панели оценивали по реакции гемагглютинации эритроцитов. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча. За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации, и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы вируса (lg ТЦИД₅₀).

Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили в программе GraphPad Prizm v6.0. Статистическую значимость различий титров антител оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Показатели выживаемости сравнивали с использованием критерия Мантела–Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ фрагмента HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II

Фрагмент HA2 (76–130) представляет собой большую α-спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы (рис. 1А). Консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа филогенетической группы II (подтипы H3 и H7) в участке HA2 (76–130) идентичны на 63.6% (рис. 1Б). С учетом замен аминокислотных остатков на близкие по свойствам гомология составляет 80%. Для вирусов гриппа филогенетической группы II В- и CD4⁺ Т-клеточные эпитопы сосредоточены в первой половине участка – аминокислоты

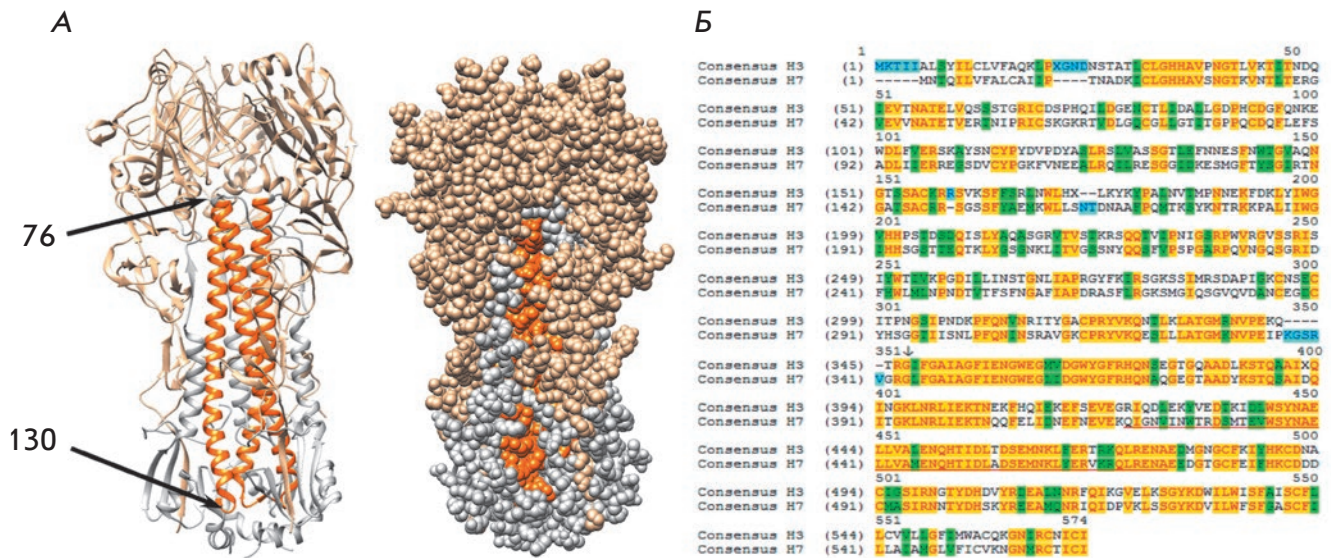


Рис. 1. А – 3D-структура (тример, модель 4JTV RCSB Protein Data Bank) молекулы гемагглютинаина (HA) вируса гриппа А/Н3N2 (филогенетическая группа II): бежевым выделена субъединица HA1, серым – субъединица HA2, оранжевым – фрагмент HA2 76–130. Б – выравнивание консенсусных последовательностей HA вирусов гриппа А/Н3N2 и А/Н7 (включая человеческие изоляты) филогенетической группы II. Начало субъединицы HA2 указано стрелкой, фрагмент HA2 76–130 подчеркнут красным, желтым цветом обозначено полное совпадение последовательностей, зеленым – замены на близкие по свойствам аминокислоты, без цвета – аминокислотные замены, голубым – инсерции

76–103 (рис. 2А). Кроме того, участок HA2 (76–130) вирусов гриппа второй филогенетической группы содержит потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы для различных аллелей HLA (рис. 2Б).

Дизайн рекомбинантных белков

В качестве консервативных пептидов, предназначенных для включения в состав рекомбинантных вакцин, были выбраны: «консенсусная» последовательность штаммов вируса гриппа А человека (M2eh), M2e вируса гриппа А/Курган/05/200 H5N1 (M2ek), фрагмент второй субъединицы HA (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II (рис. 3).

Были созданы химерные гены, кодирующие гибридные белки, включающие последовательность флагеллина бактерии *S. typhimurium*, к С-концу которого в различных сочетаниях были присоединены M2e-пептид разных подтипов вируса гриппа, а также консервативные фрагменты второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа второй филогенетической группы (рис. 3). Рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2e содержит последовательность флагеллина, к С-концу которой присоединен фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II, за которым следуют четыре копии M2e (M2h-M2k-M2h-M2k).

Белок Flg-4M2e-HA2 содержит последовательность флагеллина, к С-концу которой присоединены четыре копии M2e (M2h-M2k-M2h-M2k) и фрагмент второй субъединицы (76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II. В этих белках последовательности M2e отделены друг от друга и от HA2 глицин-богатыми линкерами. «Сборку» химерных генов из отдельных компонентов проводили непосредственно в экспрессионном векторе pQE30. Ген флагеллина без собственного стартового кодона клонировали в сайт BamHI вектора, что обеспечивало экспрессию флагеллина с присоединенным к нему кодируемым вектором N-концевым 6His-тагом, предназначенным для очистки рекомбинантных белков методом металл-аффинной хроматографии.

Химерные гены получали с использованием стандартных методов генной инженерии. Ген флагеллина был получен ранее с помощью ПЦР на геномной ДНК *S. typhimurium* и клонирован. Нуклеотидные последовательности, кодирующие HA2 и тандемные копии M2e, синтезировали *in vitro*. Таким образом, созданы векторы pQE30_Flg_HA2-4M2e и pQE30_Flg_4M2e-HA2, позволяющие получать соответствующие рекомбинантные белки.

Гомологичное моделирование трехмерной структуры рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-



Рис. 2. А – экспериментальные В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы, гомологичные фрагменту консенсусной последовательности HA2 (76–130) фрагмента более чем на 90%. Представлен результат поиска по базе данных IEDB, неомологичные аминокислоты выделены красным, зеленым цветом отмечен В-клеточный эпитоп. Б – потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы в составе фрагмента HA2 (76–130) для репрезентативного набора аллелей HLA, результат анализа с использованием NetCTLpan1.1 Server [38]

4M2e-HA2 показало сохранение α-спирализации в участке HA2 (76–130) независимо от места их присоединения к флагеллину (рис. 4). Можно предположить, что нативная структура этого фрагмента HA2 скорее всего сохранена, и гибридные белки способны стимулировать образование антител, в том числе к структурным эпитопам, характерным для нативного HA. Однако между двумя белками существуют некоторые различия. В случае концевое присоединения HA2 структура антигена более компактна. 3D-структура четырех копий M2e существенно различалась в двух моделях рекомбинантных белков. Внутренняя локализация четырех копий M2e приводила к появлению частичной α-спирализации (Flg-4M2e-HA2), не характерной для нативной конформации M2e на поверхности вириона или инфицированной вирусом гриппа клетке (рис. 4). Концевое расположение M2e (Flg-HA2-4M2e) в большей степени сохраняло нативную конформацию M2e, неструктурированную в белке M2. Подобные конформационные различия в структуре двух белков могут влиять на их иммуногенность.

Получение и очистка рекомбинантных белков

Нуклеотидные последовательности, кодирующие гибридные белки Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e, были клонированы в вектор pQE30 и экспрессированы в штамме *E. coli* DLT1270 (рис. 5А). Теоретически рассчитанная молекулярная масса белков составляла 73.9 кДа, что совпадало с величиной, определенной по их электрофоретической подвижности в ПААГ (рис. 5Б). Очищенные белки Flg-4M2e-HA2 и Flg-HA2-4M2e взаимодействовали в вестерн-блот с моноклональными анти-M2e-антителами 14C2 (рис. 5Б). Поскольку показано, что антитела 14C2 распознают

M2h – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека:
 SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
M2k – M2e A/Курган/05/2005 H5N1:
 SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD
HA2 – фрагмент HA2 (76–130) филогенетической группы II вирусов гриппа:
 RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTSEMKNLFEKTRRQLRENA

Flg-HA2-4M2e



Flg-4M2e-HA2

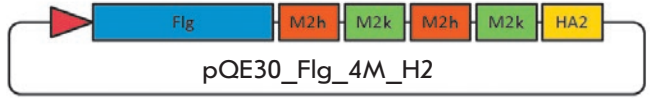


Рис. 3. Структура рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Синий блок – флагеллин *S. typhimurium*; оранжевый блок – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека; зеленый блок – M2e-пептид вируса гриппа А/Курган/5/05 RG (H5N1); желтый блок – фрагмент HA2 (76–130) вирусов гриппа филогенетической группы II

протективный эпитоп M2e [14, 43], полученные результаты подтверждают, что пептид M2e присутствует в обоих белках. Оба рекомбинантных белка были достаточно стабильными. Не выявлено признаков дегградации белков при их хранении в течение 2 месяцев при 4°C (рис. 5В).

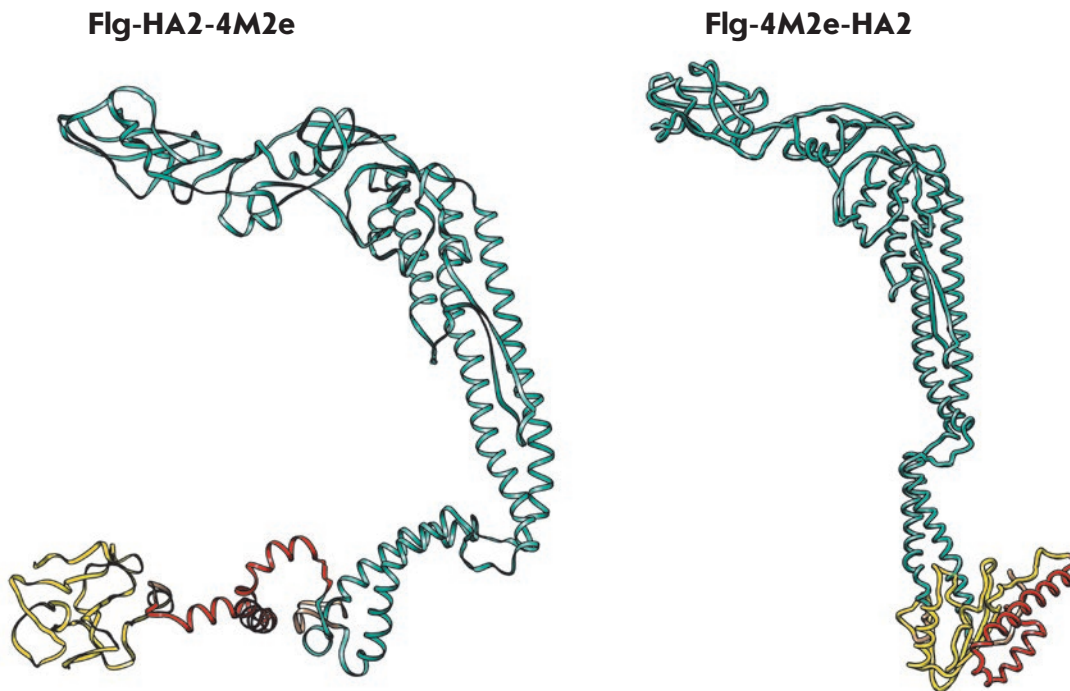


Рис. 4. Теоретическое моделирование 3D-структуры рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Желтым выделены M2e-пептиды, красным – фрагмент HA2 и голубым – флагеллин. Моделирование выполнено с помощью Phyre2 server, визуализация сделана с помощью UCSF Chimera

Сравнение иммуногенности рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2

Иммуногенность гибридных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2 оценивали на мышах Balb/c, иммунизированных 3 раза, интраназально. На 14-й день после третьей иммунизации в сыворотках и БАЛ пяти мышей каждой группы определяли присутствие анти-M2e- и анти-A/H3N2-антител в ИФА. Не выявлено различий в уровнях анти-M2eh- и анти-M2ek-IgG в сыворотках мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2 ($p > 0.05$) (рис. 6А). Но средний геометрический титр (СГТ) анти-M2e-IgG после иммунизации рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2e был в 4–6 раз выше, чем у мышей, иммунизированных Flg-4M2e-HA2. Уровень анти-HA2-IgG к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) также был значительно выше (рис. 6Б) у мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2e (различия между двумя белками были статистически значимыми, $p = 0.0317$).

Для изучения IgA- и IgG-специфического ответа на мукозальных поверхностях определяли титры M2eh- и M2ek-специфических IgA и IgG в БАЛ пяти мышей каждой группы через 14 дней после третьей иммунизации. Как показано на рис. 7, интраназальная иммунизация гибридным белком Flg-HA2-4M2e стимулировала более высокие уровни IgG- и IgA анти-M2e в БАЛ, чем белок Flg-4M2e-HA2 ($p < 0.05$). Эти результаты показывают, что гибридный белок с концевым положением M2e-пептидов (Flg-HA2-

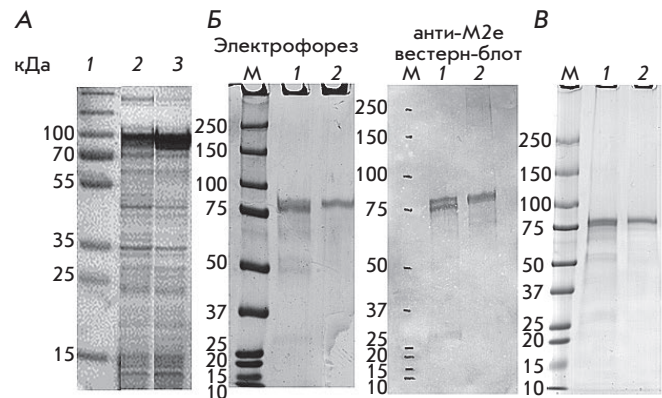


Рис. 5. А – экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*. На дорожке 1 представлены маркеры молекулярной массы в кДа (Fermentas, ЕС); 2 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_HA2_4M2e после индукции; 3 – лизат клеток, трансформированных плазмидой pQE30 Flg_4M2e_HA2 после индукции; Б – рекомбинантные белки Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2 после хроматографической очистки на Ni-сорбенте. Представлен результат электрофореза, а также вестерн-блот с использованием моноклональных анти-M2e-антител 14C2; В – рекомбинантные белки Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2 через 2 месяца хранения при 4°C. Представлены результаты электрофореза: М – маркер молекулярной массы, 1 – Flg-HA2-4M2e, 2 – Flg-4M2e-HA2

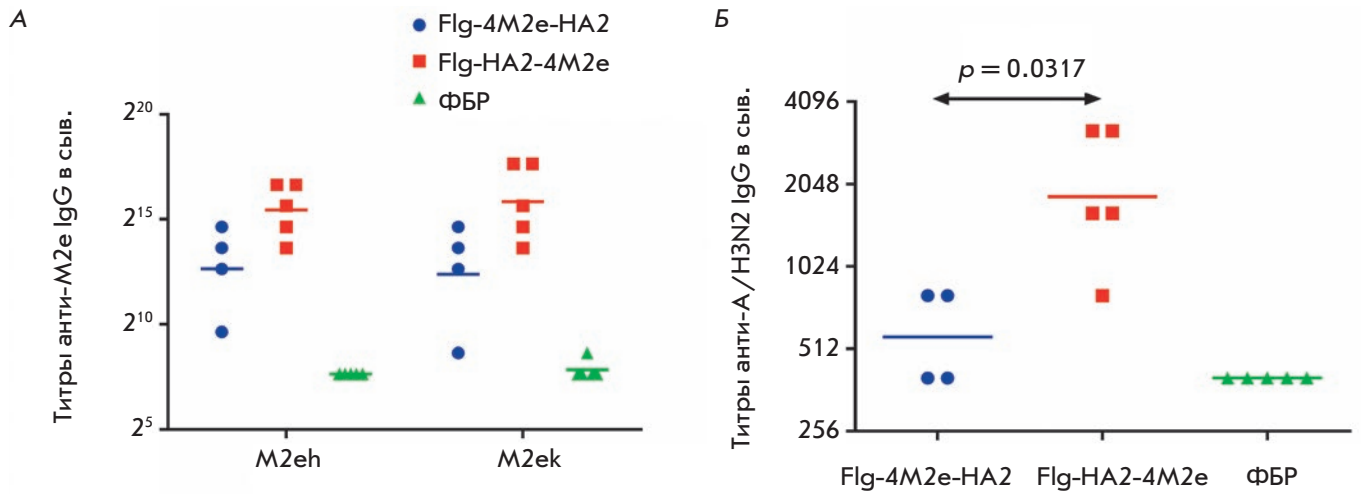


Рис. 6. Титры антител у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2. Титры сывороточных IgG к целевым антигенам: M2e пептидам (А) и к вирусу гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (Б)

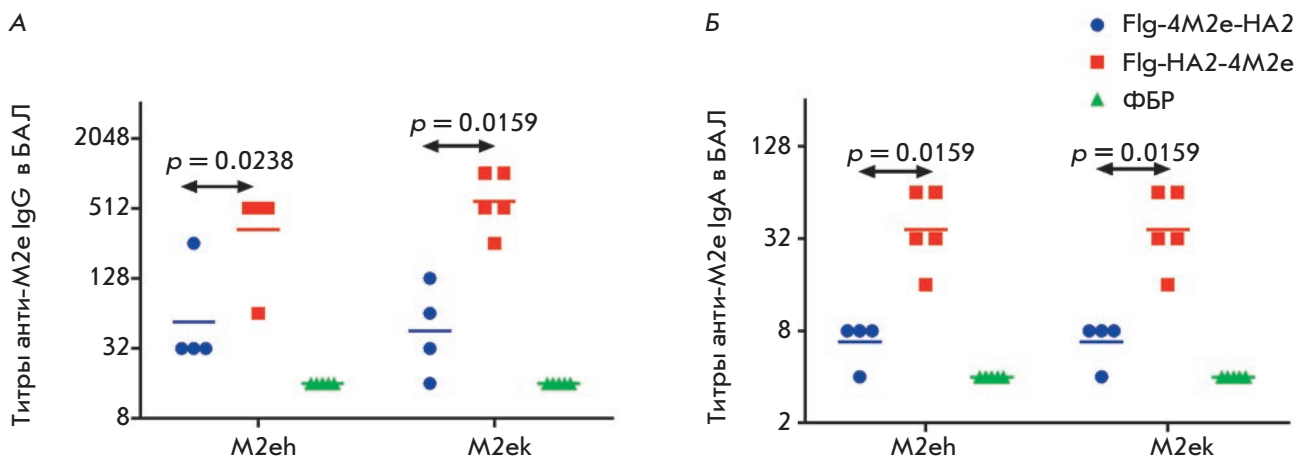


Рис. 7. Титры антител в БАЛ к пептидам M2e у мышей экспериментальных и контрольной групп через 2 недели после третьей иммунизации гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2: СГТ IgG (А) и СГТ IgA (Б)

4M2e) был более иммуногенным, чем белок с внутренней локализацией этих пептидов (Flg-4M2e-HA2).

Сравнение протективных свойств рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2

Для сравнения протективных свойств гибридных белков мышей (по восемь в каждой группе), иммунизированных гибридными белками Flg-HA2-4M2e и Flg-4M2e-HA2, заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD₅₀ через 14 дней после

третьей иммунизации. В качестве контроля в опыте по летальному заражению использовали мышей, которым интраназально вводили ФБР. В течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали падение массы тела (показатель тяжести гриппозной инфекции) и выживаемость. Из рис. 8А видно, что у мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2e, максимальная потеря массы тела составила 13% на 4-й день после заражения, а у мышей, иммунизированных гибридным белком Flg-4M2e-HA2, – 20% на 8-й день после заражения. Максимальная потеря массы тела у кон-

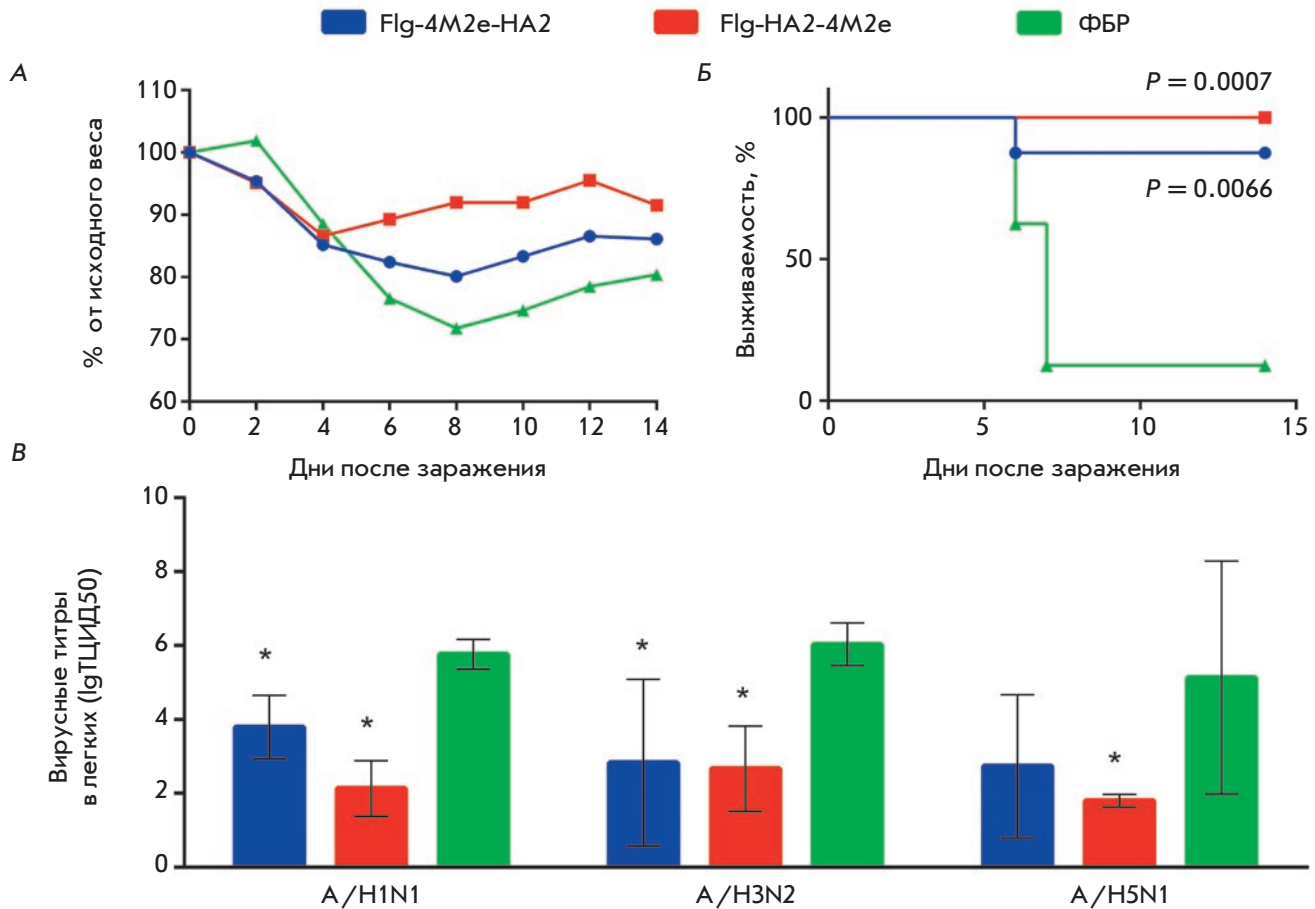


Рис. 8. Протективность рекомбинантных белков Flg-NA2-4M2e и Flg-4M2e-NA2. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей интраназально заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD₅₀. Динамику массы тела (А) и гибели мышей (Б) наблюдали ежедневно в течение 14 дней. Значение *p* высчитывали с помощью критерия Мантела–Кокса. В – репродукция вируса гриппа в легких мышей. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей интраназально заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD₅₀. Вирусные титры определяли на 6-й день после заражения. Результаты представлены в lg ТЦИД50. Нижний предел определения – 0.5 lg ТЦИД50. Статистическое отличие от контрольной группы определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. *Статистически значимое отличие от контрольной группы, *p* < 0.05

трольных животных, также отмеченная на 8-й день, составила 28%. Полученные данные свидетельствуют о более легком течении инфекции у мышей, получавших гибридный белок Flg-NA2-4M2e. Иммунизация гибридным белком Flg-NA2-4M2e обеспечивала полную защиту (*рис. 8Б*) от летального заражения (выживаемость 100%), тогда как выживаемость мышей, получавших Flg-4M2e-NA2, составила 87.5%, а контрольных животных – 12.5% (статистически значимое отличие опытных групп от контрольных, *p* = 0.0007 и *p* = 0.0066, критерий Montel-Cox).

Для определения титров вируса в легких через 2 недели после окончания протокола иммунизации

мышей опытных и контрольной групп (по три особи каждой группы) интраназально заражали вирусами гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Курган/05/05 (H5N1) в дозе 5LD₅₀. На 6-й день после заражения мышей скарифицировали для титрования остаточного количества вирусов гриппа в легких. Мы наблюдали значительное снижение вирусных титров в легких иммунизированных мышей по сравнению с контрольными (*рис. 8В*). Иммунизация мышей гибридным белком Flg-NA2-4M2e снижала титр вируса в легких на 3.7, 3.3 и 3.3 log₁₀ при заражении вирусами гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Курган/05/05

(H5N1) соответственно, что статистически значимо отличалось от значений в контроле ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни). Гибридный белок Flg-4M2eh-NA2 приводил к менее выраженному снижению репродукции вирусов в легких (на 2.0, 3.2 и 2.4 log₁₀ соответственно), однако отличия от контроля были выявлены ($p < 0.05$).

ВЫВОДЫ

Высококонсервативный эктодомен белка M2 и консервативные регионы второй субъединицы HA являются перспективными антигенами для создания вакцин с широким протективным потенциалом. Вакцинный белок, содержащий два или более консервативных таргетных антигена, стимулирующих формирование различных звеньев иммунного ответа (антител с различным механизмом действия, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов), позволит усилить эффективность таких препаратов. Гибридный белок на основе флагеллина и консервативных фрагментов двух белков вируса гриппа (M2e и HA2 76–130) сочетает адъювантную активность флагеллина, обусловленную его специфическим связыванием с TLR5, консервативность M2e среди вирусов гриппа А человека и птиц (формирование не нейтрализующих антител с механизмом действия, связанным с АЗКЦ) и консервативность участка стеблевой части молекулы гемагглютинаина, содержащей потенциальные В-клеточные (формирование нейтрализующих и не нейтрализующих антител), а также CD4+ и CD8+ Т-клеточные эпитопы.

Сконструированы два рекомбинантных белка с различным порядком присоединения к С-концу флагеллина M2e-пептидов разных подтипов вирусов гриппа А и консервативного фрагмента второй субъ-

единицы гемагглютинаина вирусов гриппа второй филогенетической группы. Показана возможность получения стабильного рекомбинантного белка с двумя таргетными антигенами (гетерологичного M2e и HA2 (76–30)), слитыми с флагеллином. Такой белок обладает иммуногенностью, стимулирует формирование антител как к M2e, так и антител, связывающихся с HA вируса гриппа. Рекомбинантный белок защищал мышей от летального заражения и значительно снижал вирусную нагрузку в легких. Показано, что порядок расположения таргетных антигенов в рекомбинантном белке может влиять на третичную структуру рекомбинантного белка, а также на его иммуногенность и протективный эффект. Выявлены различия в уровне продукции антител двумя гибридными белками, что свидетельствует о большей иммуногенности гибридного белка с концевым положением M2e, чем белка с концевым положением HA2. Протективный эффект двух белков также различался. Белок с концевым расположением M2e приводил к полной защите животных от летального заражения вирусом гриппа А/Н3N2 и быстрое восстановление их веса после небольшого снижения. Кроме того, высокую эффективность белка Flg-HA2-4M2e подтверждает также более выраженное снижение вирусной нагрузки в легких мышей по сравнению с белком Flg-4M2eh-NA2.

Дальнейшие исследования будут направлены на выяснение роли каждого из таргетных антигенов в составе слитого белка в формировании протективного иммунитета, длительности его сохранения и широты защитного действия. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 15-14-00043).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fan J., Liang X., Horton M.S., Perry H.C., Citron M.P., Heidecker G.J., Fu T.M., Joyce J., Przysiecki C.T., Keller P.M., et al. // *Vaccine*. 2004. V. 22. № 23–24. P. 2993–3003.
2. Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., et al. // *Vaccine*. 2008. V. 26. № 2. P. 201–214.
3. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 45. P. 6280–6283.
4. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. // *Expert Rev. Vaccines*. 2009. V. 8. № 4. P. 499–508.
5. Turley C.B., Rupp R.E., Johnson C., Taylor D.N., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. // *Vaccine*. 2011. V. 29. № 32. P. 5145–5152.
6. Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., Kasianenko M.A., Kuprianov V.V., Ravin N.V., Tsybalova L.M., et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. P. e0119520.
7. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Gorshkov A.N., Kasyanenko M.A., Ravin N.V., Kiselev O.I. // *Vaccine*. 2015. V. 33. № 29. P. 3398–3406.
8. Neiryck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. // *Nat. Med.* 1999. V. 5. № 10. P. 1157–1163.
9. Mozdanovska K., Maiese K., Furchner M., Gerhard W. // *Virology*. 1999. V. 254. № 1. P. 138–146.
10. Tompkins S.M., Zhao Z.C., Lo C.Y., Misplon J.A., Liu T., Ye Z., Hogan R.J., Wu Z., Benton K.A., Tumpey T.M., Epstein S.L. // *Emerg. Infect. Dis.* 2007. V. 13. № 3. P. 426–435.
11. Beerli R.R., Bauer M., Schmitz N., Buser R.B., Gwerder M., Muntwiler S., Renner W.A., Saudan P., Bachmann M.F. // *Virol. J.* 2009. V. 6. P. 224–235.
12. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. P. 5598–5605.
13. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. P. 1022–1031.

14. Treanor J.J., Tierney E.L., Zebedee S.L., Lamb R.A., Murphy B.R. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 1375–1377.
15. Gerhard W., Mozdzanowska K., Zharikova D. // *Emerg. Infect. Dis.* 2006. V. 12. № 14. P. 569–574.
16. Trosby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
17. Prabhu N., Prabakaran M., Ho H.T., Velumani S., Qiang J., Goutama M., Kwang J. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 6. P. 2553–2562.
18. Wang T.T., Tan G. S., Hai R., Pica N., Petersen E., Moran T.M., Peter Palese P. // *PLoS Pathogens.* 2010a. V. 6. № 2. P. e1000796.
19. Wei C.J., Boyington J.C., McTamney P.M., Kong W.P., Pearce M.B., Xu L., Andersen H., Rao S., Tumpey T.M., Yang Z.Y., et al. // *Science.* 2010. V. 329. № 5995. P. 1060–1064.
20. Corti D., Voss J., Gambelin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
21. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. № 1. P. 181–193.
22. Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
23. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., García-Sastre A., Moran T.M., Palese P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010b. V. 107. № 44. P. 18979–18984.
24. Bommakanti G., Citron M.P., Hepler R.W., Callahan C., Heidecker G.J., Najjar T.A., Lu X., Joyce J.G., Shiver J.W., Casimiro D.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 31. P. 13701–13706.
25. Schneemann A., Speir J.A., Tan G.S., Khayat R., Ekiert D.C., Matsuoka Y., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 21. P. 11686–11697.
26. Stanekova Z., Adkins I., Kosova M., Janulíková J., Sebo P., Vareckova E. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 1. P. 24–35.
27. Stepanova L.A., Sergeeva M.V., Shuklina M.A., Shaldzhyan A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Tsybalova L.M. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 2. P. 116–126.
28. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. // *Viral Immunol.* 2010. V. 23. P. 201–210.
29. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.G., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. // *Infect. Immun.* 2004. V. 72. P. 2810–2816.
30. Honko A.N., Sriranganathan N., Lees C.J., Mizel S.B. // *Infect. Immun.* 2006. V. 74. P. 1113–1120.
31. Bates J.T., Honko A.N., Graff A.H., Kock N., Mizel S.B. // *Mech. Ageing Dev.* 2008. V. 129. P. 271–281.
32. Song L., Zhang Y., Yun N.E., Poussard A.L., Smith J.N., Smith J.K., Borisevich V., Linde J.J., Zacks M.A., Li H., et al. // *Vaccine.* 2009. V. 27. № 42. P. 5875–5884.
33. Wang B.-Z., Xu R., Quan F.-S., Kang S.M., Wang L., Compans R.W. // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e13972.
34. Liu G., Tarbet B., Song L., Reiserova L., Weaver B., Chen Y., Li H., Hou F., Liu X., Parent J., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 6. P. e20928.
35. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 14. P. 3059–3066.
36. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 8. P. 1166–1167.
37. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. Database issue. P. D854–D862.
38. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // *Immunogenetics.* 2010. V. 62. № 6. P. 357–368.
39. Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. № 13. P. 1605–1612.
40. Kelley L.A., Sternberg M.J. // *Nat. Protoc.* 2009. V. 4. № 3. P. 363–371.
41. Grant S., Jessee J., Bloom F., Hanahan D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. № 12. P. 4645–4649.
42. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
43. Zharikova D., Mozdzanowska K., Feng J., Zhang M., Gerhard W. // *J. Virol.* 2005. V. 79. P. 6644–6654.

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.