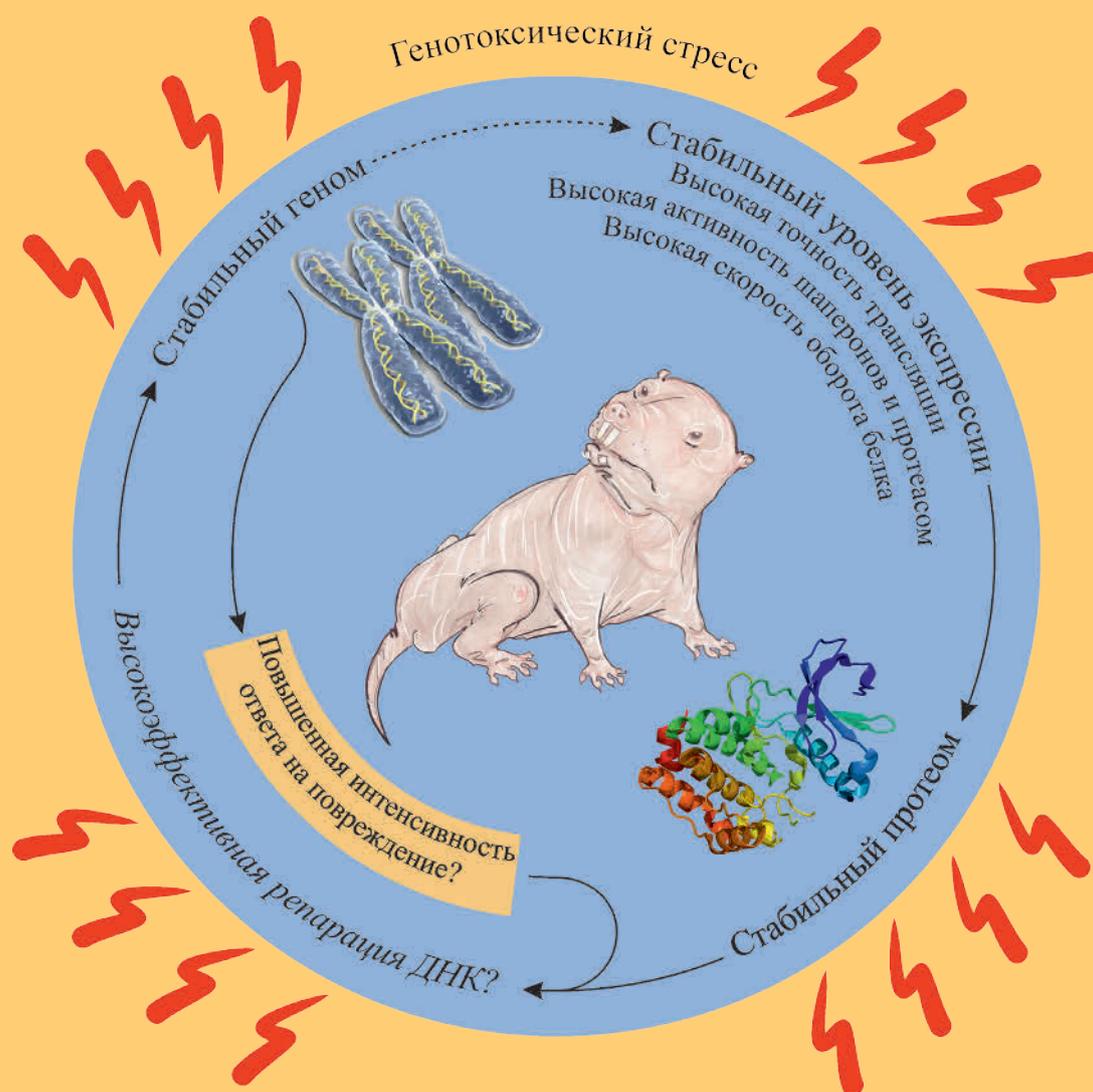


Acta Naturae

Поддержание стабильности генома у *Heterocephalus glaber*



MERCK

КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



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



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



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

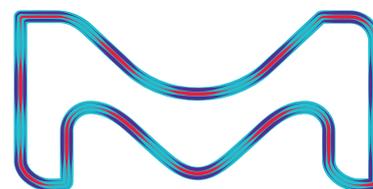
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

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

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

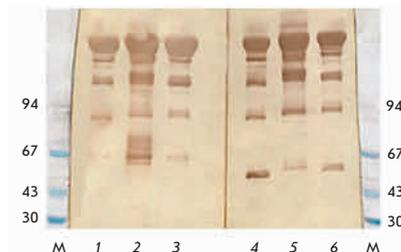


SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

Рекомбинантные антитела к гликопротеину вируса Эбола

А. А. Панина, И. Г. Дементьева, Т. К. Алиев, В. А. Топорова,
Д. С. Балабашин, М. Н. Боков, Л. П. Позднякова, О. Б. Шемчукова,
Д. А. Долгих, П. Г. Свешников, М. П. Кирпичников

В настоящее время не существует лицензированных препаратов для адресной профилактики и лечения геморрагической лихорадки Эбола. В представленной работе создана эукариотическая система экспрессии для получения трех полноразмерных химерных антител IgG1-каппа изотипа GPE118, GPE325 и GPE534 к рекомбинантному гликопротеину вируса Эбола (GP EBOV), ключевому фактору патогенности этого вируса.



Иммуноблоттинг рекомбинантных химерных антител

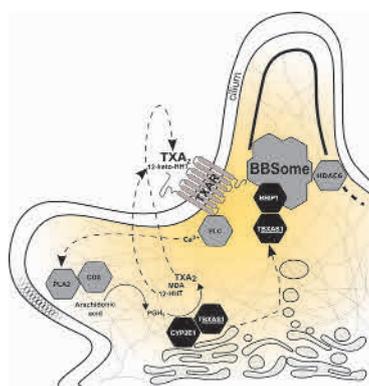


Схема биосинтеза
тромбоксана A_2

Прямой молекулярный фишинг новых белков-партнеров тромбоксансинтазы человека

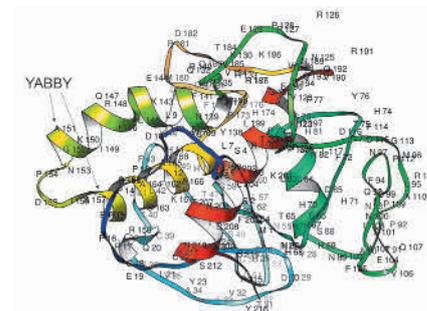
А. В. Свирид, П. В. Ершов, Е. О. Яблоков, Л. А. Калужский, Ю. В. Мезенцев,
А. В. Флоринская, Т. А. Сушко, Н. В. Струшкевич, А. А. Гилеп, С. А. Усанов,
А. Е. Медведев, А. С. Иванов

Цель работы – идентификация белков-партнеров тромбоксансинтазы (TBXAS1) с использованием комплексного подхода, основанного на применении технологии прямого молекулярного фишинга, LC-MS/MS-идентификации белков и валидации белок-белкового взаимодействия с помощью поверхностного плазмонного резонанса. Идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1, в том числе компоненты, регулирующие организацию цитоскелета, компоненты коагуляционного каскада крови и фермент метаболизма ксенобиотиков и эндогенных биорегуляторов.

YABBY3-ортологи дикорастущих видов томата: структура, полиморфизм и экспрессия

М. А. Филюшин, М. А. Слугина, А. В. Щенникова, Е. З. Кочиева

В 13 образцах культивируемых и дикорастущих видов томата идентифицированы гены, ортологичные YABBY3. Эти гены кодируют факторы транскрипции, которые играют одну из ключевых ролей в определении абаксиально-адаксиальной асимметрии всех наземных латеральных органов растения. Структура генов YABBY3 и кодируемых ими белков сходна с ранее охарактеризованными членами семейства YABBY. Филогенетический и экспрессионный анализ подтвердил, что идентифицированные гены относятся к подсемейству YABBY1/3 и, возможно, имеют консервативные функции в различных видах томата.



Трехмерная структура белка
YABBY3 *S. lycopersicum* cv. Heinz

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. Беспрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Шведас (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, 2017

Номер подписан в печать 27 декабря 2017 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

ФОРУМ

Г. А. Щелкунова, С. Н. Щелкунов
40 лет без оспы..... 4

ОБЗОРЫ

О. Ю. Буренина, Т. С. Орецкая, Е. А. Кубарева
Некодирующие РНК, регулирующие
транскрипцию в клетках эукариот..... 13

З. Ш. Кутлубаева, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин
Вклад рибосомного белка S1 в структуру
и функцию Q β -репликазы..... 27

И. О. Петрусева, А. Н. Евдокимов, О. И. Лаврик
Поддержание стабильности генома
y Heterocephalus glaber..... 32

С. С. Рябичко, А. Н. Ибрагимов, Л. А. Лебедева,
Е. Н. Козлов, Ю. В. Шидловский
Микроскопия сверхвысокого разрешения
в изучении структуры и функционирования
клеточного ядра..... 44

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- М. В. Архипенко, Н. А. Никитин, Е. К. Донченко,
О. В. Карпова, И. Г. Атабеков
**Трансляционная кросс-активация геномных
РНК потексвирусов в составе вирионов 54**
- И. В. Зелепукин, В. О. Шипунова, А. Б. Миркасымов,
П. И. Никитин, М. П. Никитин, С. М. Деев
**Синтез и характеристика гибридных наночастиц
 Fe_3O_4/SiO_2 для биомедицинских применений. . . 60**
- С. В. Калинин, М. В. Шепелев, П. Н. Вихрева,
И. В. Коробко
**Новый гибридный промотор ARE-hTERT
для генной терапии рака. 69**
- Н. Г. Кукава, Б. В. Титов, Г. Ж. Осьмак,
Н. А. Матвеева, О. Г. Кулакова, А. В. Фаворов,
Р. М. Шахнович, М. Я. Руда, О. О. Фаворова
**Мультилокусный анализ генетической
предрасположенности к инфаркту миокарда
у русских: репликационное исследование. 77**
- А. А. Панина, И. Г. Дементьева, Т. К. Алиев,
В. А. Топорова, Д. С. Балабашин, М. Н. Боков,
Л. П. Позднякова, О. Б. Шемчукова, Д. А. Долгих,
П. Г. Свешников, М. П. Кирпичников
**Рекомбинантные антитела к гликопротеину
вируса Эбола. 87**
- А. В. Свирид, П. В. Ершов, Е. О. Яблоков,
Л. А. Калужский, Ю. В. Мезенцев, А. В. Флоринская,
Т. А. Сушко, Н. В. Струшкевич, А. А. Гилеп,
С. А. Усанов, А. Е. Медведев, А. С. Иванов
**Прямой молекулярный фишинг новых белков-
партнеров тромбоксансинтазы человека 96**
- М. А. Филюшин, М. А. Слугина, А. В. Щенникова,
Е. З. Кочиева
**УАВВУЗ-ортологи дикорастущих видов томата:
структура, полиморфизм и экспрессия 106**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- А. Е. Гайдуков, О. П. Балезина
**СаMKII участвует в вызванном холином торможении
секреции ацетилхолина в моторных синапсах
мышы. 116**
- Правила для авторов 121**

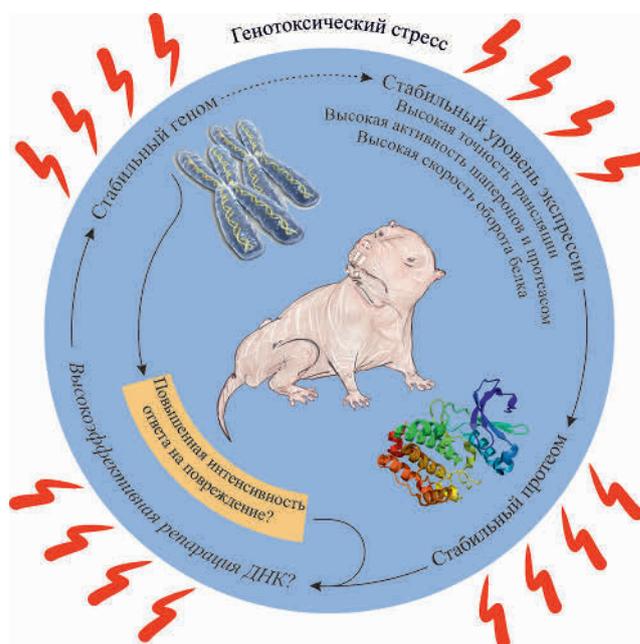


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Петрусевой и др.)

УДК 578.821.5:575.86

40 лет без оспы

Г. А. Щелкунова¹, С. Н. Щелкунов^{1,2*}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская обл.

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: snshchel@rambler.ru; snshchel@vector.nsc.ru

В октябре 1977 г. был зафиксирован последний случай заражения человека натуральной оспой в природе. К этому событию мировое сообщество шло почти 20 лет после принятия Всемирной организацией здравоохранения программы глобальной ликвидации этого особо опасного инфекционного заболевания. Вакцинация против оспы была отменена, и за прошедшие 40 лет человечество в своем большинстве утратило иммунитет не только к оспе, но и другим зоонозным ортопоксвирусным инфекциям. Это, в частности, привело к тому, что в последние годы на разных континентах все чаще стали регистрироваться вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей. Существует угроза возврата оспы в результате эволюционных преобразований зоонозных ортопоксвирусов. Для предотвращения распространения таких инфекций разрабатываются современные методы диагностики, профилактики и терапии оспы и ортопоксвирусных инфекций.

Оспа (старослав. оспа – от осыпать, сыпь), или оспа натуральная (лат. *Variola vera* – пестрый, пятнистый; франц. – *la petite variole*; англ. – *smallpox*), получила свое современное название в XVI веке, хотя это заболевание было известно с давних пор и унесло больше человеческих жизней, чем многие другие инфекции или многочисленные войны. Только в XX столетии за неполные 80 лет, когда осуществлялась массовая вакцинация и велась интенсивная противоэпидемическая борьба с натуральной оспой, от нее погибло не менее 300 млн человек [1].

В 1796 г. английским медиком Эдвардом Дженнером был предложен метод защиты людей от натуральной оспы прививанием им инфекционного материала от коров с оспоподобным заболеванием. Этот метод получил название вак-

цинация (от лат. *vacca* – корова). Данное событие произошло практически за 100 лет до открытия царства вирусов [1–3].

Введя в 1919 г. обязательное оспопрививание в России (а затем в СССР), огромной стране, в которой в различных географических условиях – от высокогорных районов и пустынь до северной тундры и глухих таежных областей, проживают десятки народностей, отличающихся по традициям, обрядам и верованиям, удалось к 1936 г. ликвидировать заболеваемость натуральной оспой [3].

В первой половине XX века это опасное инфекционное заболевание было ликвидировано во многих развитых странах. Однако в 50-х годах этого же столетия вспышки натуральной оспы ежегодно регистрировались в 50–80 странах. Кроме того, существование эндемичных очагов инфек-

ции в Азии, Африке и Южной Америке представляло потенциальную угрозу завоза оспы в страны, свободные от этого заболевания.

На основе анализа огромного научного и организационного опыта по ликвидации оспы у себя в стране В.М. Жданов от имени делегации СССР в 1958 г. на 9-й сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения (ВАЗ) выступил с предложением инициировать программу ликвидации оспы во всемирном масштабе, и 12 июня 1958 г. на 7-м пленарном заседании ВАЗ была принята резолюция, предусматривающая повсеместную ликвидацию оспы [1, 2].

После этого решения под эгидой Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) началась беспрецедентная международная программа глобальной ликвидации оспы. Советский Союз стал

не только инициатором программы ликвидации оспы, но и оказал широкую поддержку в последующие годы на всех этапах развития этой программы. Уже в 1958 г. Советское правительство передало ВОЗ 25 млн доз сухой оспенной вакцины, которая была направлена в разные страны. В 1960 г. в Московском научно-исследовательском институте вирусных препаратов (НИИ ВП) была организована лаборатория для крупномасштабного производства вакцины, отвечающей требованиям ВОЗ. Эта лаборатория стала также центром, где специалисты разных стран осваивали технику производства оспенной вакцины. В целом, за 20 лет осуществления международной программы ликвидации оспы свыше 1.5 млрд доз оспенной вакцины, произведенной в нашей стране, использовали для вакцинации населения в 45 странах, что сделало вклад СССР в программу глобальной ликвидации оспы одним из ведущих [2].

Важную роль в проведении работ по глобальной ликвидации оспы сыграла лаборатория профилактики оспы НИИ ВП, на базе которой был создан Международный справочный центр ВОЗ по оспе. Многочисленные отечественные специалисты проходили подготовку в этой лаборатории перед выездом в эндемичные по оспе страны, а также получали необходимые консультации при практической работе.

Объединенные усилия мирового сообщества по противозидемическому контролю и массовой противооспенной вакцинации в рамках принятой ВОЗ в 1966 г. «Интенсифицированной программы ликвидации оспы» привели к тому, что в октябре 1977 г. в Сомали был зафиксирован последний природный случай оспы. На основании заключения Глобальной комиссии по удосто-

верению ликвидации оспы 8 мая 1980 г. на 33-й сессии ВАЗ было торжественно провозглашено, что мир и все народы Земли одержали победу над натуральной оспой. Это первая и пока единственная победа мирового сообщества над особо опасным инфекционным заболеванием человека [1–3].

ГЕНОМНЫЙ ПРОЕКТ

Вслед за ликвидацией оспы с целью предотвращения ее случайного распространения из лабораторий, сохраняющих вирус натуральной оспы (ВНО), были предприняты мероприятия по сокращению числа таких лабораторий. Уже в 1981 г. осталось четыре (США, СССР, Южная Африка, Англия), а в 1984 г. – две лаборатории, получившие статус Сотрудничающих центров ВОЗ по оспе и родственным инфекциям: НИИ ВП (Москва, СССР) и Центр по контролю заболеваемости – CDC (Атланта, США) [1].

Существование даже двух строго контролируемых ВОЗ хранилищ жизнеспособных штаммов ВНО рассматривалось как источник возможной биологической опасности. Поэтому на четвертом заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям в Женеве в 1986 г. было принято решение о необходимости уничтожения коллекций штаммов ВНО и их геномных ДНК. Учитывая планируемое уничтожение в будущем коллекций ВНО, необходимо было осуществить надежную консервацию в биологически безопасной форме генетического материала разных изолятов ВНО, что представлялось чрезвычайно важным для будущих исследований. С целью сохранения информации об этом уникальном вирусе Комитет советников ВОЗ считал необходимым предварительно осуществить секвенирование генома ВНО [4].

В связи с этим в октябре 1990 г. заместителем министра здравоохранения СССР А.И. Кондрусевым и заместителем министра медицинской промышленности СССР Ю.Т. Калинин был утверждена «Национальная программа по консервации генетического материала отечественной коллекции штаммов вируса натуральной оспы». Научными руководителями данной программы были генеральный директор НПО «Вектор» Л.С. Сандахчиев и директор НИИ ВП О.Г. Анджапаридзе, ответственными исполнителями – С.Н. Щелкунов и С.С. Маренникова.

В декабре 1990 г. на 5-м заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям в Женеве были одобрены национальные программы исследований генома ВНО, предложенные Россией (НПО «Вектор», Кольцово, Новосибирская область и НИИ ВП, Москва) и США (CDC, Атланта, Джорджия и Институт геномных исследований, Гейтерсберг, Мэриленд). В мае 1991 г. комиссия ВОЗ инспектировала в НПО «Вектор» лабораторию, возглавляемую С.Н. Щелкуновым, и дала разрешение на работы по клонированию фрагментов ДНК ВНО и их секвенированию.

ВНО имеет видовое название *Variola virus* (VARV). Обычно выделяют два подвида: *V. major*, обуславливающий заболевание с уровнем летальности от 5 до 40%, и *V. minor*, приводящий к смертельному исходу менее чем в 2% случаев [1]. Данный вирус входит в состав рода *Orthopoxvirus* семейства *Poxviridae*. Этот род включает также зоонозные виды *Monkeypox virus* (MPXV, вирус оспы обезьян – ВОО), *Cowpox virus* (CPXV, вирус оспы коров – ВОК), *Vaccinia virus* (VACV, вирус осповакцины – ВОВ), *Buffalopox virus* (BPXV, вирус оспы буйволов – ВОБ; подвид

VACV) и *Camelpox virus* (CMLV, вирус оспы верблюдов – VOVb), способные инфицировать человека [4–12]. Ортопоксвирусы антигенно и иммунологически близки друг другу и обеспечивают перекрестную иммунную защиту при инфицировании человека и животных [1].

К середине 1992 г. российские ученые первыми завершили секвенирование генома высоковирулентного штамма ВНО *major*, выделенного в Индии в 1967 г. во время вспышки инфекции с уровнем летальности 31%, выполнили компьютерный анализ полученных данных [13–16] и сравнение с недавно опубликованной нуклеотидной последовательностью генома вируса осповакцины (ВОВ) [17, 18]. Результаты этого исследования впервые были представлены в виде доклада, которым открылась 9-я Международная конференция по поксвирусам и иридовирусам [19]. Год спустя американские исследователи завершили секвенирование и анализ полного генома другого высоковирулентного штамма ВНО *major* Bangladesh-1975, выделенного во время вспышки оспы с уровнем летальности 18.5% [20]. Это позво-

лило подробно сравнить геномы этих штаммов и выявить их высокий консерватизм [21, 22].

На 6-м заседании Специального комитета ВОЗ по ортопоксвирусным инфекциям (сентябрь 1994 г., Женева, Швейцария) было решено запасы ДНК вируса натуральной оспы хранить в двух международных репозиториях: в НПО «Вектор», получившем к тому времени статус Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), и в CDC (США).

В совместном исследовании сотрудники ГНЦ ВБ «Вектор» и CDC дополнительно выполнили секвенирование и анализ полного генома низковирулентного штамма ВНО *minor* Garcia-1966 [23] (таблица).

Учитывая потенциальную опасность работы с живым ВНО в г. Москве, на основании совместного приказа Минздравмедпрома, Миннауки, Госкомсанэпиднадзора России и РАМН в конце сентября 1994 г. состоялась передача коллекции штаммов ВНО из НИИ ВП в ГНЦ ВБ «Вектор».

После инспекционной проверки в 1995 г. комиссией ВОЗ лаборатории наивысшей физической защиты, предназначенной для ра-

боты с ВНО, ВОЗ официально зарегистрировала в июне 1997 г. создание на базе ГНЦ ВБ «Вектор» Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы. Право на хранение коллекции штаммов ВНО и геномной ДНК этого вируса на базе ГНЦ ВБ «Вектор» было признано резолюцией ВАЗ 49.10 и подтверждено последующими резолюциями ВАЗ 52.10, 55.15 и 60.1.

В 1999 г. был организован Консультативный комитет ВОЗ по исследованиям вируса натуральной оспы, который стал контролировать работы с ВНО и ежегодно проводить совещания всех специалистов, вовлеченных в изучение ВНО и разработку методов диагностики, профилактики и терапии оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

Для изучения эволюционных взаимосвязей разных видов ортопоксвирусов важно было сравнить их геномы. Ученые ГНЦ ВБ «Вектор» первыми расшифровали геномные ДНК вирусов оспы коров (ВОК) [24] и оспы обезьян (ВОО) [25, 26], выделенных от больных людей (табли-

Первые секвенированные геномы ортопоксвирусов

Вид	Штамм	Размер генома, п.н.	Число потенциальных генов	Организация, выполнившая секвенирование	Год секвенирования
Вирус осповакцины	Copenhagen	191636	198	Virogenetics, США	1990
Вирус натуральной оспы <i>major</i>	India-1967	185578	199	ГНЦ ВБ «Вектор», Россия	1992
Вирус натуральной оспы <i>major</i>	Bangladesh-1975	186103	196	CDC, США	1993
Вирус натуральной оспы <i>minor</i>	Garcia-1966	186986	206	ГНЦ ВБ «Вектор», Россия; CDC, США	1995
Вирус оспы коров	GRI-90	223666	212	ГНЦ ВБ «Вектор», Россия	1997
Вирус осповакцины	Ankara	177923	157	Biomedical Research Center, Австрия	1998
Вирус оспы обезьян	Zaire-96-I-16	196858	191	ГНЦ ВБ «Вектор», Россия	2001
Вирус оспы коров	Brighton Red	224499	218	Duke University Medical Center, США	2002
Вирус осповакцины	WR	194711	206	CDC, США	2003

ца). Анализ полных геномов ВНО, ВОО, ВОК, ВОВ и ВОВ6 позволил обнаружить, что ДНК ВОК не только самая протяженная среди изученных ортопоксвирусов, но и содержит все генетические элементы, характерные для других видов ортопоксвирусов [24, 27–31]. ВНО, ВОО и ВОВ могут рассматриваться как варианты ВОК со специфичными для каждого вида делециями, перестройками и точечными мутациями. Поэтому мы сделали вывод, что ВОК-подобный вирус был прародителем всех современных видов ортопоксвирусов, патогенных для человека [24, 26, 32].

Накопленные данные позволили впервые провести сравнительный анализ стратегии геномов всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, выполнить первые филогенетические исследования данной группы вирусов и выявить их эволюционные взаимосвязи. Однако в этих работах еще не было возможности установить временные параметры молекулярной эволюции ортопоксвирусов и, в частности, ВНО [26, 33–36].

Ситуация с датированием молекулярной эволюции ВНО существенно изменилась после того, как для обнаружения генетических различий между штаммами ВНО сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» и CDC (США) был разработан метод изучения полных геномов ВНО, включающий проведение длинной полимеразной цепной реакции (ДПЦР) перекрывающихся сегментов вирусной ДНК (размером 10 т.п.н. и более) с последующим гидролизом полученных ампликонов мелкоцепящими эндонуклеазами рестрикции, электрофорезом и компьютерным анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Этот относительно простой подход (ДПЦР-ПДРФ-анализ), приближающийся

по информативности к секвенированию ДНК (анализ положения более 300 участков гидролиза эндонуклеазами рестрикции на вирусной ДНК), позволил впервые выявить детальные различия между геномами 63 штаммов ВНО, выделенных в разных географических районах и в разные годы, из российской и американской коллекций. На основе филогенетического анализа данных полиморфизма длин рестрикционных фрагментов вирусных ДНК нами впервые было обнаружено, что западноафриканские и южноамериканские штаммы ВНО формируют отдельный подтип (кладу), имеющих существенные отличия в организации генома от всех других изученных географических вариантов ВНО [37]. При этом принципиальным было то, что внутри выявленного подтипа западноафриканские и южноамериканские штаммы ВНО образуют две четко различающиеся филогенетические подгруппы (субклады), что свидетельствует об их независимой эволюции на протяжении некоторого времени. Результаты этого анализа и архивные данные о неоднократных заносах ВНО из Западной Африки в Южную Америку в XVI–XVIII веках при перевозке рабов позволили нам впервые количественно оценить скорость эволюции поксвирусов [38].

Секвенирование полных геномов большого набора штаммов ВНО, выделенных в разные годы и в различных географических регионах [39], а также протяженных сегментов генома дополнительных штаммов ВНО [40], позволило уточнить датирование ключевых событий в эволюции ВНО [41, 42].

ВОЗМОЖНЫЙ ВОЗВРАТ ОСПЫ

Учитывая, что вакцинация против оспы вызывала в ряде случаев тяжелые побочные реакции, ВОЗ рекомендовала после 1980 г.

прекратить ее во всех странах. Итогом этого решения стала утрата человечеством иммунитета не только против оспы, но и против других зоонозных ортопоксвирусных инфекций. Участвовавшие в последние годы случаи инфицирования людей зоонозными ортопоксвирусами заставляют с новой силой вернуться к рассмотрению вопроса о возможном возврате оспы в результате естественной эволюции этих вирусов [32, 43].

Важным свойством ВНО является его способность инфицировать только человека и отсутствие природного резервуара (чувствительное животное) данного вируса. При этом инфицирование человека ВНО может в большом числе случаев (до 40% и более) приводить к смертельному исходу [1–4].

ВОО вызывает у человека заболевание, по клиническим признакам напоминающее оспу, и в ряде случаев (до 10 %) завершается летальным исходом. Основное отличие оспы обезьян у человека от натуральной оспы – низкая эффективность передачи ВОО от человека к человеку, что до сих пор предотвращало переход локальных вспышек данного заболевания в эпидемии [44]. Однако исследования последних лет указывают на увеличивающуюся эффективность распространения ВОО в человеческой популяции [45, 46], что должно вызвать настоятельную необходимость медицинских служб Центральной и Западной Африки, а также ВОЗ.

В условиях длительного отсутствия вакцинации населения и значительно более частого инфицирования людей ВОО может приобрести способность к высокой частоте передачи от человека к человеку, характерные для ВНО. Если это произойдет, то человечество встанет перед гораздо более сложной проблемой, чем искоренение натуральной оспы. В первую очередь, это обу-

словлено тем, что ВОО, в отличие ВНО, имеет природный резервуар в виде многочисленных африканских грызунов [32].

Другие виды зоонозных ортопоксвирусов обычно вызывают редкие инфекции человека (небольшие вспышки), завершающиеся в большинстве случаев доброкачественно [6, 9, 12]. Однако известно, что инфицирование ВОК людей с иммунодефицитными состояниями может приводить к развитию генерализованной инфекции, напоминающей оспу и завершающейся летальным исходом [47, 48].

Как уже указывалось, сравнительный анализ организации геномов ВНО и зоонозных ортопоксвирусов, патогенных для человека, показал, что ВОК имеет наибольший по размеру геном и содержит все гены, характерные для других видов ортопоксвирусов. У других ортопоксвирусов часть генов нарушена или делетирована, они имеют видоспецифичные отличия между собой по набору сохранившихся генов. Эти данные поддерживают концепцию редукативной эволюции ортопоксвирусов, согласно которой утрата генов играет важную роль в эволюционной адаптации вируса-предшественника к определенному хозяину и в возникновении новых вирусных видов [49, 50]. Самый патогенный для человека ВНО имеет наименьший геном из всех ортопоксвирусов. Это указывает на потенциальную возможность возникновения ВНО-подобного вируса из современных зоонозных ортопоксвирусов с более протяженным геномом в результате естественной эволюции [32, 42].

На основе анализа доступных архивных данных об эпидемиях оспы, об истории древних цивилизаций и новейших данных об эволюционных взаимосвязях ортопоксвирусов сформулирована гипотеза о том, что оспа могла воз-

никать неоднократно в результате эволюционных изменений зоонозного вируса-прародителя и исчезать вследствие недостаточной численности населения разрозненных древних цивилизаций [43]. Лишь исторически последняя пандемия оспы продолжалась длительное время и была ликвидирована в XX веке при объединении усилий медиков и ученых многих стран под эгидой ВОЗ.

Таким образом, принципиальных запретов на возможность повторного появления в будущем оспы или схожего заболевания человека в процессе естественной эволюции существующих в настоящее время зоонозных ортопоксвирусов нет. Поэтому необходимо разрабатывать и широко внедрять современные методы эффективной и быстрой видоспецифичной диагностики всех видов ортопоксвирусов, патогенных для человека, включая ВНО. Также важно разрабатывать новые безопасные методы профилактики и терапии ортопоксвирусных инфекций человека.

ВИДОСПЕЦИФИЧНАЯ ДНК-ДИАГНОСТИКА ОРТОПОКСВИРУСОВ

Ортопоксвирусные инфекции имеют характерные внешние проявления – кожные поражения, однако опыт показывает, что клиническая диагностика этих заболеваний зачастую оказывается ошибочной [3, 4].

Разработка метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) привела к созданию современных методов детекции и идентификации следовых количеств микроорганизмов в анализируемых образцах с высокой специфичностью и за короткое время [51]. При этом, что очень важно, не требуется осуществлять манипуляции с живыми особо опасными инфекционными агентами, к которым относятся ВНО и ВОО.

В случае ортопоксвирусов, патогенных для человека, наибольший интерес представляют тест-системы, обеспечивающие возможность родоспецифичной идентификации ДНК анализируемого вируса с одновременной ее видоспецифичной дифференциацией. Сотрудники ГНЦ ВВ «Вектор» первыми разработали такие методы на основе классической мультиплексной ПЦР [52, 53], а также мультиплексной ПЦР в режиме реального времени [54–58].

На ПЦР основан и анализ на олигонуклеотидных микрочипах, в котором полученные ДНК-ампликоны идентифицируют гибридизацией со специфичными олигонуклеотидами, фиксированными на подложке в определенном порядке. Препараты ДНК, предназначенные для гибридизации на микрочипе, флуоресцентно метят. После гибридизации и отмывки микрочип анализируют с помощью лазерного сканера и данные флуоресценции каждой ячейки микроматрицы подвергают компьютерной обработке, используя специальное программное обеспечение. Этот метод, так же как классическая ПЦР, позволяет обнаружить следовые количества исследуемого материала в образце. Одно из важных преимуществ олигонуклеотидных микрочипов – возможность анализировать одновременно множество генетических локусов, что значительно повышает надежность метода [4].

Для видоспецифичной детекции ортопоксвирусов разработаны различные варианты диагностических олигонуклеотидных микрочипов [59–62].

Бурное развитие технологий секвенирования позволяет в короткие сроки получать информацию о полной нуклеотидной последовательности генома объекта исследования. Все чаще при выявлении необычных ортопокс-

вирусных инфекций проводят полногеномное секвенирование выделенных вирусных изолятов [63, 64]. Эти исследования свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования лабораторной диагностики ортопоксвирусных инфекций и эпидемиологического надзора. Циркулирующие в природе патогенные для человека зоонозные ортопоксвирусы требуют детального изучения и мониторинга возникновения новых видов, потенциально способных на фоне прекращения плановой вакцинации населения против оспы привести к возникновению высокопатогенных для человека вариантов ортопоксвирусов.

СОВРЕМЕННЫЕ ПРОТИВООСПЕННЫЕ ВАКЦИНЫ

Живая противооспенная вакцина первого поколения представляла собой препарат ВОВ, полученный размножением вируса на коже телят или других животных. В современных условиях вакцинные штаммы ВОВ продуцируют на культурах клеток млекопитающих, и такие препараты относят к противооспенным вакцинам второго поколения [65]. Несмотря на то что производство вакцин на культуре клеток происходит в соответствии с современными стандартами, противооспенные вакцины второго поколения, как и вакцины первого поколения, могут вызывать серьезные побочные реакции и поэтому имеют ограниченное применение [66].

Аттенуированные противооспенные вакцины третьего поколения получают в процессе множественных пассажей определенного штамма ВОВ в культуре клеток гетерологичного хозяина. Например, самая изученная противооспенная вакцина третьего поколения MVA получена в результате большого числа пассажей штамма Ankara ВОВ на культуре куриных фибро-

бластов. В геноме штамма MVA возникли множественные мутации и протяженные делеции, отличающие его от генома исходного штамма ВОВ. MVA не способен реплицироваться в большинстве клеток млекопитающих, включая клетки человека [67].

К настоящему времени вакцина на основе штамма MVA (Imvanex/Imvamune) прошла многочисленные клинические испытания, включая пациентов с атопическим дерматитом и ВИЧ-инфицированных [68–70]. Показано, что эта вакцина индуцирует профиль антител, аналогичный профилю, индуцируемому классической вакциной первого поколения, и защищает различных лабораторных животных от зоонозных ортопоксвирусов [71–73]. Imvanex/Imvamune лицензирована в странах Европы, Канаде и США. Прежде всего эта вакцина предназначена для первичной вакцинации пациентов с противопоказаниями к противооспенным вакцинам первого и второго поколений.

Противооспенная вакцина третьего поколения LC16m8, лицензированная в Японии, получена на основе ВОВ штамма Lister путем множественных пассажей на первичной культуре клеток почки кролика при пониженной температуре (30°C). Клинические исследования показали значительное снижение побочных эффектов в сравнении с традиционной вакциной на основе штамма Lister. Аттенуация вакцинного штамма объясняется, главным образом, мутацией (делеция одного нуклеотида) в гене B5R, который кодирует белок внеклеточного вириона [74, 75]. Протективная эффективность LC16m8 в экспериментах на животных моделях сравнима с эффективностью родительского штамма Lister [76, 77].

Новый подход к получению аттенуированных противо-

оспенных вакцин четвертого поколения состоит во введении методами генетической инженерии направленных делеций/инсерций, нарушающих гены, контролирующие защитные реакции организма против вирусной инфекции, круг чувствительных хозяев вируса и др. Наиболее подробно изученный вариант такого ВОВ представляет собой штамм NYVAC, в геноме которого делетирован блок из 12 генов и дополнительно нарушено шесть индивидуальных генов. Штамм NYVAC индуцирует у человека значительно более низкий противооспенный иммунитет, чем классическая вакцина на основе штамма Lister или Dryvax, включая невозможность индуцировать A27-специфичные антитела, необходимые для эффективной нейтрализации одной из инфекционных форм ВОВ – внутриклеточного зрелого вируса [78, 79].

В России последовательным введением направленных делеций/вставок в пять индивидуальных генов штамма LIVP получен высокоаттенуированный вариант ВОВ [80]. Дополнительное введение в геном этого вируса направленной делеции по гену A35R позволило получить высокоиммуногенный аттенуированный штамм VACdelta6 [81], который проходит в настоящее время доклинические исследования в качестве вероятной противооспенной вакцины четвертого поколения. Эта вакцина может использоваться и в комбинации с противооспенной ДНК-вакциной [82].

ПРОТИВООСПЕННЫЕ ХИМИОПРЕПАРАТЫ

Важное значение для лечения ортопоксвирусных инфекций человека могут представлять химиотерапевтические препараты, поиск которых в последние 20 лет увенчался относительным успехом. Поскольку адекватная животная модель натуральной оспы отсут-

ствуется, тестирование потенциальных противооспенных средств приходится выполнять на суррогатных животных моделях [83]. Первоначальный скрининг ингибиторов размножения ортопоксвирусов проводили на культурах клеток, затем соединения, показавшие *in vitro* высокую противовирусную активность, изучали на животных моделях, прежде всего таких, как интраназальное или аэрозольное инфицирование мышей ВОК или обезьян ВОО [84, 85]. В последние годы активно использовали также кроликов, инфицированных вирусом оспы кроликов, и луговых собак или степных сурков, инфицированных вирусом оспы обезьян [86–88]. При этом ни одна из суррогатных животных моделей ортопоксвирусной инфекции не соответствует точно оспенной инфекции у человека. Поэтому предполагаемые противооспенные препараты изучают параллельно на разных животных моделях.

Первым интенсивно изучаемым в качестве антиортопоксвирусного соединения стал нуклеотидный аналог цидофовир (Cidofovir, производимый под названием Vistide), разрешенный для клинического применения при цитомегаловирусном ретините и являющийся ингибитором вирусной ДНК-полимеразы [83]. На разных суррогатных животных моделях цидофовир зарекомендовал себя как эффективный терапевтический препарат против ортопоксвирусных инфекций. Однако его существенным недостатком была плохая водорастворимость и необходимость внутривенного введения. Поэтому был синтезирован липидный конъюгат цидофовира, который получил название СМХ001 (Brincidofovir) [86, 89]. Этот препарат широкого спектра антивирусного действия можно применять в таблетированной форме и он также обладает вы-

раженной антиортопоксвирусной активностью.

Наибольший интерес в качестве противооспенного препарата представляет соединение ST-246, блокирующее последнюю стадию сборки внутриклеточных покрытых оболочкой вирионов и предотвращающее выход вируса из инфицированной клетки [83, 90]. ST-246 был идентифицирован в результате скрининга на противовирусную активность библиотеки препаратов, состоящей из более 350 тысяч уникальных химических соединений. ST-246 (Tecovirimat) показал низкую токсичность и высокую противовирусную эффективность на мышах, инфицированных вирусами экстремелии (оспы мышей), ВОВ и ВОК, кроликов – вирусом оспы кроликов, луговых собак – ВОО, обезьян – ВОО и ВНО [90–92]. В настоящее время ST-246 проходит клинические испытания. НИОХ-14 – аналог ST-246, также показал высокую активность на различных животных моделях ортопоксвирусных инфекций [93].

Поиск новых химиотерапевтических антиортопоксвирусных препаратов с другими молекулярными мишенями продолжается [90, 94].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ организации геномов ортопоксвирусов, патогенных для человека, и закономерности их эволюции указывают на принципиальную возможность повторного возникновения оспы или схожего заболевания человека в будущем, обусловленного естественной эволюцией существующих зоонозных ортопоксвирусов. Прекращение противооспенной вакцинации и утрата человеческого иммунитета не только против оспы, но и других ортопоксвирусных инфекций создают условия для распространения зоонозных

ортопоксвирусов среди людей, а это может способствовать селекции высокопатогенных для человека и эпидемически опасных вирусных вариантов. Однако современная ситуация не выглядит фатальной и радикально отличается от событий в далеком прошлом, когда человек не принимал участия в контроле инфекций. В настоящее время большинство вспышек ортопоксвирусных инфекций домашних животных и человека регистрируются и изучаются, а в процессе программы глобальной ликвидации оспы под эгидой ВОЗ отработана международная система сбора клинических образцов и идентификации инфекционных агентов, разработаны противоэпидемические мероприятия и методы массовой вакцинации людей [1].

В последние годы усилия ВОЗ направлены на разработку современных методов экспресс-идентификации ВНО, создание безопасных противооспенных вакцин новых поколений и химиопрепаратов, направленных против ВНО и других ортопоксвирусов [94].

Изученные вакцины и химиопрепараты не имеют выраженной видоспецифичности в отношении ортопоксвирусов, патогенных для человека. Поэтому они могут быть применены при вспышках, обусловленных любым видом ортопоксвирусов. Диагностические методы, учитывая сказанное выше, необходимо ориентировать на быструю идентификацию не только ВНО, но и ВОО, ВОК, ВОВ и ВОВб [32]. Принимая во внимание возросшее в последние годы число вспышек ортопоксвирусных инфекций животных и людей и их потенциальную опасность, важно обеспечить постоянный мониторинг этих инфекций во всех частях света, что позволит предотвратить развитие небольших вспышек в распространенные эпидемии и тем

самым уменьшит риск возникновения высокопатогенного для человека ортопоксвируса.

Феноменальные успехи синтетической биологии позволили осуществить синтез *de novo* пол-

ного генома вируса оспы лошадей и получить живой вирус [95]. Это указывает на возможность воссоздания в лаборатории любого ортопоксвируса, включая ВНО. Поэтому разработка и повсемест-

ное внедрение в практику здравоохранения современных методов диагностики, профилактики и терапии ортопоксвирусных инфекций представляют жизненно важную задачу. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. Smallpox and Its Eradication. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
- Ладный И.Д. Ликвидация оспы и предупреждение ее возврата. М.: Медицина, 1985. 224 с.
- Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: КМК Scientific Press Ltd., 1998. 386 с.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Moyer R.W. Orthopoxviruses Pathogenic for Humans. New York: Springer, 2005. 425 p.
- Di Giulio D.B., Eckburg P.B. // Lancet Infect. Dis. 2004. V. 4. P. 15–25.
- Essbauer S., Pfeffer M., Meyer H. // Vet. Microbiol. 2010. V. 140. P. 229–236.
- Bhanuprakash V., Venkatesan G., Balamurugan V., Hosamani M., Yogisharadhya R., Gandhale P., Reddy K.V., Damle A.S., Kher H.N., Chandl B.S., et al. // Zoonoses Publ. Hlth. 2010. V. 57. P. e149–155.
- Popova A.Y., Maksyutov R.A., Taranov O.S., Tregubchak T.V., Zaikovskaya A.V., Sergeev A.A., Vlashchenko I.V., Bodnev S.A., Ternovoi V.A., Alexandrova N.S., et al. // Epidemiol. Infect. 2017. V. 145. P. 755–759.
- Singh R.K., Balamurugan V., Bhanuprakash V., Venkatesan G., Hosamani M. // Indian J. Virol. 2012. V. 23. P. 1–11.
- Abraham J.S., Campos R.K., Trindade G.S., Guimaraes da Fonseca F., Ferreira P.C., Kroon E.G. // Emerg. Infect. Dis. 2015. V. 21. P. 695–698.
- Bera B.C., Shanmugasundaram K., Barua S., Venkatesan G., Virmani N., Riyesh T., Gulati B.R., Bhanuprakash V., Vaid R.K., Kakker N.K., et al. // Vet. Microbiol. 2011. V. 152. P. 29–38.
- Balamurugan V., Venkatesan G., Bhanuprakash V., Singh R.K. // Indian J. Virol. 2013. V. 24. P. 295–305.
- Щелкунов С.Н., Маренникова С.С., Тотменин А.В., Блинов В.М., Чижиков В.Е., Гуторов В.В., Сафронов П.Ф., Поздняков С.Г., Шелухина Э.М., Гашников П.В. и др. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 321. С. 402–406.
- Щелкунов С.Н., Блинов В.М., Тотменин А.В., Маренникова С.С., Кольхалов А.А., Фролов И.В., Чижиков В.Е., Гуторов В.В., Гашников П.В., Беланов Е.Ф. и др. // Молекуляр. биология. 1992. Т. 26. С. 1099–1115.
- Щелкунов С.Н., Маренникова С.С., Блинов В.М., Ресенчук С.М., Тотменин А.В., Чижиков В.Е., Гуторов В.В., Сафронов П.Ф., Курманов Р.К., Сандахчиев Л.С. // Докл. РАН. 1993. Т. 328. С. 629–632.
- Shchelkunov S.N., Resenchuk S.M., Totmenin A.V., Blinov V.M., Marennikova S.S., Sandakhchiev L.S. // FEBS Lett. 1993. V. 327. P. 321–324.
- Goebel S.J., Johnson G.P., Perkus M.E., Davis S.W., Winslow J.P., Paoletti E. // Virology. 1990. V. 179. P. 247–266, 517–563.
- Shchelkunov S.N. // Virus Genes. 1995. V. 10. P. 53–71.
- Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Blinov V.M., Totmenin A.V., Chizhikov V.E., Netesov S.V., Andzhaparidze O.G., Sandakhchiev L.S. // In: Poxviruses and Iridoviruses. Abstr. of the 9th International Conference. Les Diablerets. Switzerland, 1992. P. 31.
- Massung R.F., Liu L.I., Qi J., Knight J.C., Yuran T.E., Kerlavage A.R., Parsons J.M., Venter J.C., Esposito J.J. // Virology. 1994. V. 201. P. 215–240.
- Shchelkunov S.N., Massung R.F., Esposito J.J. // Virus Res. 1995. V. 36. P. 107–118.
- Massung R.F., Loparev V.N., Knight J.C., Totmenin A.V., Chizhikov V.E., Parsons J.M., Safronov P.F., Gutorov V.V., Shchelkunov S.N., Esposito J.J. // Virology. 1996. V. 221. P. 291–300.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Loparev V.N., Safronov P.F., Gutorov V.V., Chizhikov V.E., Knight J.C., Parsons J.M., Massung R.F., Esposito J.J. // Virology. 2000. V. 266. P. 361–386.
- Shchelkunov S.N., Safronov P.F., Totmenin A.V., Petrov N.A., Ryazankina O.I., Gutorov V.V., Kotwal G.J. // Virology. 1998. V. 243. P. 432–460.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Babkin I.V., Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Gutorov V.V., Uvarova E.A., Mikheev M.V., Sisler J.R., et al. // FEBS Lett. 2001. V. 509. P. 66–70.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V., Safronov P.F., Mikheev M.V., Gutorov V.V., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Babkin I.V., Uvarova E.A., Sandakhchiev L.S., et al. // Virology. 2002. V. 297. P. 172–194.
- Shchelkunov S.N., Totmenin A.V. // Virus Genes. 1995. V. 9. P. 231–245.
- Uvarova E.A., Shchelkunov S.N. // Virus Res. 2001. V. 81. P. 39–45.
- Shchelkunov S., Totmenin A., Kolosova I. // Virus Genes. 2002. V. 24. P. 157–162.
- Shchelkunov S.N. // Virus Genes. 2010. V. 41. P. 309–318.
- Shchelkunov S.N. // Adv. Virol. 2012. V. 2012. Article ID 524743.
- Shchelkunov S.N. // PLoS Pathog. 2013. V. 9. P. e1003756.
- Upton C., Slack S., Hunter A.L., Ehlers A., Roper R.L. // J. Virol. 2003. V. 77. P. 7590–7600.
- McLysaght A., Baldi P.F., Gaut B.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 15655–15660.
- Gubser C., Hue S., Kellam P., Smith G.L. // J. Gen. Virol. 2004. V. 85. P. 105–117.
- Xing K., Deng R., Wang J., Feng J., Huang M., Wang X. // Intervirology. 2006. V. 49. P. 207–214.
- Бабкина И.Н., Бабкин И.В., Ли Ю., Ропп С., Клайн Р., Дэмон И., Эспозито Дж., Сандахчиев Л.С., Щелкунов С.Н. // Докл. РАН. 2004. Т. 398. С. 818–822.
- Babkin I.V., Shchelkunov S.N. // Mol. Biol. 2006. V. 40. P. 16–19.
- Esposito J.J., Sammons S.A., Frace A.M., Osborne J.D., Olsen-Rasmussen M., Zhang M., Govil D., Damon I.K., Kline R., Laker M., et al. // Science. 2006. V. 313. P. 807–812.
- Бабкин И.В., Непомнящих Т.С., Максютов Р.А., Гуторов В.В., Бабкина И.Н., Щелкунов С.Н. // Молекуляр. биология. 2008. Т. 42. С. 612–624.
- Babkin I.V., Shchelkunov S.N. // Russ. J. Genet. 2008. V. 44. P. 895–908.
- Shchelkunov S.N. // Arch. Virol. 2009. V. 154. P. 1865–1871.
- Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29S. P. D49–53.

44. Breman J.G. // *Emerg. Infect.* 2000. V. 4. P. 45–67.
45. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 16262–16267.
46. Reynolds M.G., Carroll D.S., Karem K.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2012. V. 2. P. 335–343.
47. Czerny C.P., Eis-Hubinger A.M., Mayr A., Schneeweis K.E., Pfeiff B. // *J. Vet. Med.* 1991. V. 1338. P. 421–431.
48. Fassbender P., Zange S., Ibrahim S., Zoeller G., Herbstreit F., Meyer H. // *Emerg. Infect. Dis.* 2016. V. 22. P. 553–555.
49. Hendrickson R.C., Wang C., Hatcher E.L., Lefkowitz E.J. // *Viruses.* 2010. V. 2. P. 1933–1967.
50. Coulson D., Upton C. // *Virus Genes.* 2011. V. 42. P. 171–177.
51. Mullis K.B., Faloona F. // *Meth. Enzymol.* 1987. V. 155. P. 335–350.
52. Гаврилова Е.В., Бабкин И.В., Шелкунов С.Н. // *Молекуляр. генетика, микробиол. вирусол.* 2003. № 1. С. 45–52.
53. Shchelkunov S.N., Gavrilova E.V., Babkin I.V. // *Mol. Cell. Probes.* 2005. V. 19. P. 1–8.
54. Olson V.A., Laue T., Laker M.T., Babkin I.V., Drosten C., Shchelkunov S.N., Niedrig M., Damon I.K., Meyer H. // *J. Clin. Microbiol.* 2004. V. 42. P. 1940–1946.
55. Костина Е.В., Гаврилова Е.В., Рябинин В.А., Шелкунов С.Н., Синяков А.Н. // *Вопр. вирусол.* 2009. Т. 54. С. 28–33.
56. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. // *J. Virol. Meth.* 2011. V. 175. P. 163–169.
57. Щербаков Д.Н., Гаврилова Е.В., Максютов Р.А., Шелкунов С.Н. // *Клинич. лаборатор. диагностика.* 2011. № 12. С. 39–42.
58. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Shchelkunov S.N. // *J. Virol. Methods.* 2016. V. 236. P. 215–220.
59. Lapa S., Mikheev M., Shchelkunov S., Mikhailovich V., Sobolev A., Blinov V., Babkin I., Guskov A., Sokunova E., Zasedatelev A., et al. // *J. Clin. Microbiol.* 2002. V. 40. P. 753–757.
60. Михеев М.В., Лапа С.А., Шелкунов С.Н., Чикова А.К., Михайлович В.М., Соболев А.Ю., Бабкин И.В., Грядунов Д.А., Булавкина М.А., Гуськов А.А. и др. // *Вопр. вирусол.* 2003. Т. 48. С. 4–9.
61. Laassri M., Chizhikov V., Mikheev M., Shchelkunov S., Chumakov K. // *J. Virol. Methods.* 2003. V. 112. P. 67–78.
62. Ryabinin V.A., Shundrin L.A., Kostina E.B., Laassri M., Chizhikov V., Shchelkunov S.N., Chumakov K., Sinyakov A.N. // *J. Med. Virol.* 2006. V. 78. P. 1325–1340.
63. Mavian C., Lopez-Bueno A., Alcamí A. // *Genome Announc.* 2014. V. 2. P. e01086–13.
64. Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., Navdarashvili A., Zakhashvili K., Kokh-reidze M., Endeladze M., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2015. V. 372. P. 1223–1230.
65. Sanchez-Sampedro L., Perdiguero B., Mejias-Perez E., Garcia-Arriaza J., Di Pilato M., Esteban M. // *Viruses.* 2015. V. 7. P. 1726–1803.
66. Frey S.E., Newman F.K., Kennedy J.S., Ennis F., Abate G., Hoft D.F., Monath T.P. // *Vaccine.* 2009. V. 10. P. 1637–1644.
67. Meyer H., Sutter G., Mayr A. // *J. Gen. Virol.* 1991. V. 72. P. 1031–1038.
68. Sonnenburg F., Perona P., Darsow U., Ring J., von Krempelhuber A., Vollmar J., Roesch S., Baedeker N., Kollaritsch H., Chaplin P. // *Vaccine.* 2014. V. 32. P. 5696–5702.
69. Zitzmann-Roth E.M., von Sonnenburg F., de la Motte S., Arndtz-Wiedemann N., von Krempelhuber A., Uebler N., Vollmar J., Virgin G., Chaplin P. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0122653.
70. Greenberg R.N., Hay C.M., Stapleton J.T., Marbury T.C., Wagner E., Kreitmair E., Roesch S., von Krempelhuber A., Young P., Nichols R., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. e0157335.
71. Earl P.L., Americo J.L., Wyatt L.S., Eller L.A., Whitbeck J.C., Cohen G.H., Eisenberg R.J., Hartmann C.J., Jackson D.L., Kulesh D.A., et al. // *Nature.* 2004. V. 428. P. 182–185.
72. Jones D.I., McGee C.E., Sample C.J., Sempowski G.D., Pickup D.J., Staats H.F. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2016. V. 23. P. 648–651.
73. Volz A., Sutter G. // *Adv. Virus Res.* 2017. V. 97. P. 187–243.
74. Kidokoro M., Tashiro M., Shida H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 4152–4157.
75. Eto A., Saito T., Yokote H., Kurane I., Kanatani Y. // *Vaccine.* 2015. V. 33. P. 6106–6111.
76. Empig C., Kenner J.R., Perret-Gentil M., Youree B.E., Bell E., Chen A., Gurwith M., Higgins K., Lock M., Rice A.D., et al. // *Vaccine.* 2006. V. 24. P. 3686–3694.
77. Yokote H., Shinmura Y., Kanehara T., Maruno S., Kuranaga M., Matsui H., Hashizume S. // *Vaccine.* 2015. V. 33. P. 6112–6119.
78. Tartaglia J., Perkus M.E., Taylor J., Norton E.K., Audonnet J.C., Cox W.I., Davis S.W., van der Hoeven J., Meignier B., Riviere M., et al. // *Virology.* 1992. V. 188. P. 217–232.
79. Midgley C.M., Putz M.M., Weber J.N., Smith G.L. // *J. Gen. Virol.* 2008. V. 89. P. 2992–2997.
80. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. P. 113–121.
81. Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2016. V. 466. P. 35–38.
82. Maksyutov R.A., Yakubitskiy S.N., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. P. 88–93.
83. Smee D.F. // *Antivir. Chem. Chemother.* 2008. V. 19. P. 115–124.
84. Bray M., Martinez M., Smee D.F., Kefauer D., Thompson E., Huggins J.W. // *J. Infect. Dis.* 2000. V. 181. P. 10–19.
85. Zaucha G.M., Jahrling P.B., Geisbert T.W., Swearingen J.R., Hensley L. // *Lab. Invest.* 2001. V. 81. P. 1581–1600.
86. Rice A.D., Adams M.M., Wallace G., Burrage A.M., Lindsey S.F., Smith A.J., Swetnam D., Manning B.R., Gray S.A., Lambert B., et al. // *Viruses.* 2011. V. 3. P. 47–62.
87. Sbrana E., Jordan R., Hruba D.E., Mateo R.I., Xiao S.Y., Siirin M., Newman P.C., Da Rosa A.P., Tesh R.B. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007. V. 76. P. 768–773.
88. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Pyankov O.V., Bodnev S.A., Galahova D.O., Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Glotova T.I., et al. // *Transbound. Emerg. Dis.* 2017. V. 64. P. 226–236.
89. Parker S., Crump R., Foster S., Hartzler H., Hembrador E., Lanier E.R., Painter G., Schriewer J., Trost L.C., Buller R.M. // *Antiviral Res.* 2014. V. 111. P. 42–52.
90. Smee D.F. // *Future Virol.* 2013. V. 8. P. 891–901.
91. Mucker E.M., Goff A.J., Shamblin J.D., Grosenbach D.W., Damon I.K., Mehal J.M., Holman R.C., Carroll D., Gallardo N., Olson V.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. P. 6246–6253.
92. Berhanu A., Prigge J.T., Silvera P.M., Honeychurch K.M., Hruba D.E., Grosenbach D.W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015. V. 59. P. 4296–4300.
93. Mazurkov O.Y., Kabanov A.S., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Skarnovich M.O., Bormotov N.I., Skarnovich M.A., Ovchinnikova A.S., Titova K.A., Galahova D.O., et al. // *J. Gen. Virol.* 2016. V. 97. P. 1229–1239.
94. Scientific Review of Variola Virus Research, 1999–2010. Geneva: World Health Organization, 2010. 128 p.
95. WHO Advisory Committee on Variola Virus Research: Report of the Eighteenth Meeting. Geneva: World Health Organization, 2017. 58 p.

УДК 577.218

Некодирующие РНК, регулирующие транскрипцию в клетках эукариот

О. Ю. Буренина^{1,2*}, Т. С. Орецкая^{2,3}, Е. А. Кубарева³

¹Сколковский институт науки и технологий, 143026, Сколково, ул. Нобеля, 3

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: alunit@inbox.ru

Поступила в редакцию 02.11.2016

Принята к печати 30.08.2017

РЕФЕРАТ В клетках эукариот обнаружено множество относительно небольших (длиной до 1000 нуклеотидных остатков) молекул РНК, выполняющих различные регуляторные функции, в том числе при ремоделировании хроматина и пролиферации. Эти РНК не подвергаются трансляции, т.е. являются некодирующими (нкРНК). В обзоре описаны нкРНК эукариот, участвующие в регуляции транскрипции главным образом посредством взаимодействия с РНК-полимеразой II (РНКП II) и/или с ее основными факторами транскрипции белковой природы. Обобщены сведения о регуляторных функциях SRA РНК, 7SK и TAR РНК, U1 мяРНК, GAS5 РНК и DHFR РНК. Особое внимание уделено свойствам B1 и B2 РНК мыши и Alu РНК человека, способных связываться с активным центром РНКП II. Обнаружение бактериальных аналогов малых нкРНК эукариот, вовлеченных в регуляцию транскрипции, а именно 6S РНК, позволяет предположить общность их эволюционного происхождения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА некодирующие РНК, РНК-полимераза, регуляция транскрипции.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ нкРНК – некодирующие РНК; н.о. – нуклеотидный остаток (при числе); ПИК – преинициаторный комплекс; РНКП – РНК-полимераза; РНП – рибонуклеопротеин; мяРНК – малые ядерные РНК; SINE – от англ. «short interspersed elements», короткие диспергированные повторы.

ВВЕДЕНИЕ

По данным транскриптомного анализа лишь 1.5% от общего числа РНК в клетках эукариот кодируют белки, в то время как остальные транскрипты являются некодирующими (нкРНК). «Репертуар» генов, кодирующих белки, оставался, по-видимому, относительно статичным в ходе эволюции, а число генов нкРНК возрастало при переходе к более сложным организмам. Постоянно экспрессирующиеся в клетке рибосомные, транспортные, малые ядерные и малые ядрышковые нкРНК условно классифицируют как нкРНК домашнего хозяйства – по аналогии с названием наиболее важных для клетки генов [1]. Однако большинство нкРНК выполняют регуляторные функции и участвуют в не менее значимых и часто разнонаправленных молекулярных процессах, таких, как импринтинг и деметилирование ДНК, активация и репрессия транскрипции генов, а также ремоделирование хроматина, интерференция РНК и альтернативный сплайсинг [2–4]. Уровень синтеза многих нкРНК изменяется в различных стрессовых условиях, при онкологических и неврологических заболеваниях [5, 6]. Огромную роль нкРНК играют

в дифференцировке клеток [7]. Учитывая, что это лишь малая часть известных на сегодняшний день свойств и функций нкРНК, можно предположить, что их вклад в поддержание нормального функционирования клетки не менее значителен, чем вклад белковых факторов.

нкРНК принято разделять на короткие (~20–30 н.о.), к которым относят микроРНК (miR), малые интерферирующие (siРНК), а также РНК, взаимодействующие с белками PIWI (P-element induced wimpy testis, piРНК) [8]; малые нкРНК длиной до 200 н.о. и длинные нкРНК (>200 н.о.). Среди малых нкРНК широкую известность получили РНК, ассоциированные с промотором (раРНК), хотя в этом классе встречаются представители разной длины [9]. Термин длинные некодирующие РНК (lncРНК) чаще применяют к транскриптам длиной несколько тысяч нуклеотидов, относящихся к длинным межгенным нкРНК (lincРНК) и энхансерным РНК (eРНК) [10]. Тем не менее, встречаются и чрезвычайно протяженные нкРНК, состоящие из нескольких сотен тысяч нуклеотидов – очень длинные межгенные нкРНК (very long intergenic ncРНК, vlincРНК) и макроРНК [11].

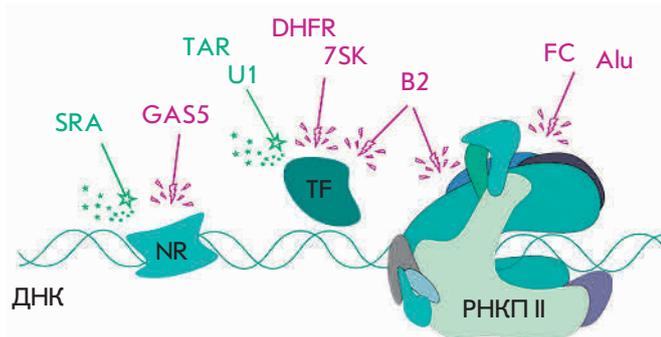


Рис. 1. Известные нкРНК, активирующие (зеленые) или ингибирующие (сиреневые) транскрипцию, взаимодействуя с РНКП II и/или основными транскрипционными факторами (TF), или другими регуляторными белками, включая ядерные рецепторы (NR)

Принимая во внимание многообразие классов и функций нкРНК, неудивительно, что многие из них участвуют в регуляции транскрипции в клетках эукариот. Это происходит, в первую очередь, за счет различных эпигенетических механизмов, в частности, ремоделирования хроматина (эта область функционирования нкРНК относится к наиболее изученным) [12, 13]. Среди таких нкРНК наиболее известны: XIST РНК (X-inactive specific transcript), roX РНК, HOTAIR (Hox transcript antisense intergenic RNA); энхансерные РНК NRIP1, GREB1 и KLK; NEAT1 РНК (nuclear enriched abundant transcript 1), ответственная за формирование параспеклов в ядрах опухолевых клеток. В регуляции котранскрипционного сплайсинга участвуют MALAT1 РНК (metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1) и H19 РНК, служащие также терапевтическими мишенями при различных, в том числе онкологических, заболеваниях [14]. Кроме того, существуют нкРНК, взаимодействующие с РНК-полимеразой II (РНКП II) или транскрипционными факторами в составе преинициаторного (ПИК) или элонгационного комплексов. К последним относятся 7SK мяРНК и TAR РНК, регулирующие активность фактора элонгации транскрипции Р-TEFb; малая ядерная РНК U1 (U1 мяРНК), взаимодействующая с инициаторным фактором TFIIF; SRA РНК, активирующая рецепторы стероидов, и некоторые другие (рис. 1). Эти нкРНК вовлечены в сложные многостадийные механизмы регуляции и взаимодействуют, как правило, с целым каскадом белков, косвенно воздействуя на процесс транскрипции. Кодированные мобильными генетическими элементами (SINE) B1 и B2 РНК мыши и Alu РНК человека, напротив, способны связывать саму РНКП II [15]. К настоящему времени их комплексы с ферментом не закристаллизованы. Единственная

нкРНК, структура комплекса которой с РНКП II решена методом рентгеноструктурного анализа (РСА), – синтетический аптамер FC РНК, состоящий из двух коротких шпилек [16]. Поскольку во вторичной структуре почти всех перечисленных регуляторных нкРНК содержатся короткие шпилечные элементы, которые и взаимодействуют с активным центром РНКП II, их часто рассматривают как аптамеры к ферменту [17].

Согласно общепринятой классификации TAR РНК, B1 РНК, B2 РНК и U1 мяРНК следует относить к малым нкРНК, тогда как Alu РНК, 7SK РНК, DHFR РНК, SRA РНК и GAS5 РНК являются длинными нкРНК (lncРНК). Конкретные свойства и функции каждой из этих нкРНК подробно рассмотрены в настоящем обзоре. Структурные особенности взаимодействия FC РНК с РНКП II подробно описаны в работе [16].

РЕГУЛЯТОРНЫЕ РНК, КОДИРУЕМЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ЭЛЕМЕНТАМИ СЕМЕЙСТВА SINE

SINE (short interspersed elements) – это ретротранспозоны длиной от 80 до 500 п.н., хаотично расположенные в геноме высших эукариот. Нуклеотидные последовательности SINE, обладающие 65–90% сходством, образуют семейства, и число гомологичных SINE может варьировать от 10^3 до 10^6 копий на клетку [18]. Исторически SINE рассматривали как «генетический мусор», используемый для установления филогенетических связей и изучения видообразования млекопитающих, пока не обнаружили, что транскрипция SINE-«генов» активируется в клетках в ответ на тепловой шок [19]. Предполагают, что это обусловлено повышением доступности SINE для транскрипции в процессе ремоделирования хроматина, а также активацией фактора транскрипции TFIIC, связывающего промоторные области SINE. Как оказалось, SINE вовлечены в процессы регуляции экспрессии генов, локализации мРНК и могут служить энхансерами или мобильными промоторами РНКП II [20]. На данный момент известно, что SINE не кодируют белки и транскрибируются РНКП III, образуя соответствующие SINE РНК. Неожиданным стало открытие способности некоторых SINE РНК связывать РНКП II и ингибировать транскрипцию. Основные результаты получены для B1 и B2 РНК мыши и Alu РНК человека [14, 21]. Повышение уровня экспрессии этих нкРНК в клетках происходит при воздействии УФ- и γ -излучения, вирусных инфекциях, обработке этанолом, антибиотиками и противоопухолевыми препаратами [14]. Эти данные, несомненно, указывают на важную функциональную роль B1, B2 и Alu РНК в жизнедеятельности клетки.

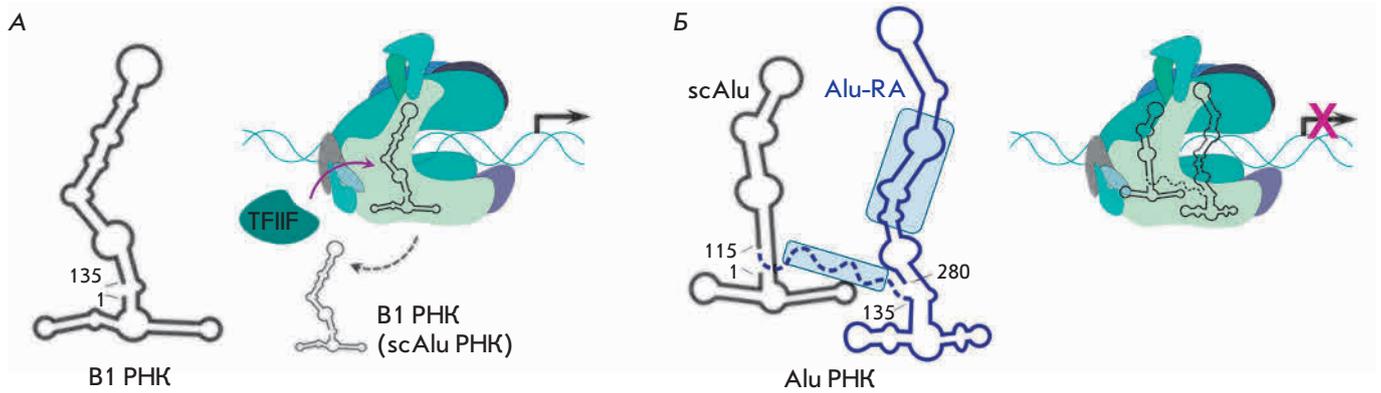


Рис. 2. Схема функционирования V1 РНК мыши (А) и Alu РНК человека (Б). Слева представлены схематические изображения вторичных структур нкРНК. Структурные элементы, обуславливающие ингибирующий эффект Alu РНК, выделены голубыми рамками; функциональный домен (Alu-RA РНК) – синим цветом. А-богатый линкер изображен прерывистой линией. Справа представлены условные схемы взаимодействия РНКП II с V1, scAlu и Alu РНК. Процесс транскрипции обозначен черной стрелкой. V1 и scAlu РНК вытесняются фактором TFIIIF из комплекса с РНКП II и не способны ингибировать транскрипцию, в отличие от Alu РНК

Alu РНК человека и V1 РНК мыши

Свое название SINE-элемент Alu получил благодаря присутствию в нем участков, узнаваемых эндонуклеазой рестрикции из *Arthrobacter luteus* (R.AluI). В геноме человека содержится более 1 млн копий Alu, кодирующих Alu РНК, что составляет около 10.6% ядерной ДНК. В геноме мышей SINE, кодирующие V1 РНК, встречаются реже – не более 550000 на клетку. Обе эти РНК относятся к семейству ретропов малой цитоплазматической 7SL РНК [22] и имеют схожую вторичную структуру (рис. 2). Полноразмерная Alu РНК длиной ~280 н.о. представляет собой тандемный повтор двух V1-подобных элементов, соединенных 20-звенным А-богатым линкером. В ходе процессинга Alu РНК образуется scAlu РНК длиной 118 н.о., которая локализуется в цитоплазме и является полным аналогом V1 РНК мыши (рис. 2) [23]. Alu РНК имеет необычное строение, ее структурированные части были названы «левой» (идентичной scAlu РНК) и «правой рукой» (Alu-RA (right arm), 135–280 н.о. Alu РНК). Каждый домен Alu РНК может связывать одну молекулу РНКП II, но только взаимодействие Alu-RA (или полноразмерной Alu РНК) с ферментом приводит к ингибированию транскрипции. V1 РНК мыши, несмотря на высокое сродство к РНКП II, не способна влиять на транскрипцию (рис. 2А), хотя химерная РНК, состоящая из V1 РНК и Alu-RA, обладает всеми свойствами полноразмерной Alu РНК [24, 25].

Помимо двух РНКП-связывающих доменов, расположенных в «левой» и «правой руке», Alu РНК имеет два домена, обеспечивающих ингибирование транскрипции и локализованных в центральной об-

ласти «правой руки» и в районе А-богатого линкера (рис. 2Б). V1 РНК и scAlu РНК соответственно имеют только РНКП-связывающий домен. По данным криоэлектронной микроскопии как Alu, так и V1 РНК взаимодействуют с доменом «зажим» РНКП II вблизи активного центра фермента [26]. Каким же образом происходит транскрипция в случае нефункциональных V1 РНК и scAlu РНК? Показано, что за «освобождение» РНКП II от ассоциированных с ней V1 РНК и scAlu РНК отвечает фактор транскрипции TFIIIF, вызывающий диссоциацию этих нкРНК из ПИК, в то время как Alu РНК остается связанной с полимеразой (рис. 2). При этом контактов между самим TFIIIF и V1 или scAlu РНК не обнаружено [27]. Вероятно, конформационные изменения в РНКП, вызываемые присоединением TFIIIF, приводят к нарушению РНК-белковых контактов. Поскольку в условиях *in vivo* TFIIIF обычно ассоциирован с РНКП II еще до сборки ПИК на промоторе, вероятно, «бесполезное» связывание нкРНК, не регулирующих транскрипционную активность РНКП, просто не происходит.

Точный механизм взаимодействия Alu РНК с ПИК до конца не выяснен. В условиях *in vitro* ингибирование наблюдалось только при добавлении Alu РНК до инициации транскрипции с промотора, хотя эффективность синтеза abortивных транскриптов в присутствии Alu РНК падала в ~10 раз. При этом методом «торможения» в геле показано, что Alu РНК комигрирует вместе с ДНК в составе ПИК РНКП II [23]. Таким образом, ингибирование транскрипции осуществляется не за счет конкуренции с ДНК, а в результате изменения активности фермента вследствие образования специфических нкРНК-

белковых контактов. Тем не менее, Alu РНК не может остановить активную транскрипцию и выполняет свои функции до стадии инициации.

В2 РНК мыши

В2 РНК транскрибируется РНКП III в присутствии факторов TFIIIV и TFIIIC с соответствующих В2 SINE (относящихся к семейству ретропов тРНК^{Ala}), количество которых оценивается в $\sim 10^5$ копий на клетку [28]. Эта РНК выделяется вместе с РНКП II при иммуносоождении ядерных экстрактов клеток, подвергнутых тепловому шоку [29], и способна ингибировать транскрипцию *in vitro* [25]. Нокаун В2 РНК в клетках мыши приводит к повышению уровня экспрессии актина и гексокиназы II, тогда как в условиях теплового шока их гены репрессированы [24]. Увеличение количества В2 РНК зафиксировано при клеточном ответе на различные факторы стресса, а также в эмбриональных и опухолевых клетках [30]. Таким образом, важная роль этой нкРНК как ингибитора транскрипции не вызывает сомнений. К сожалению, количество данных о характере функционирования В2 РНК *in vivo* весьма незначительно, однако механизм действия этой нкРНК изучен достаточно детально.

Клетки мыши содержат не менее четырех вариантов В2-транскриптов различной длины: ~ 150 , ~ 180 , ~ 240 и ~ 500 н.о. Два наиболее протяженных варианта полиаденилированы и весьма стабильны ($\tau_{1/2} = 60$ мин), тогда как время деградации транскрипта 180 н.о. составляет всего 3–4 мин. Самый короткий 150-звенный вариант В2 РНК более устойчив и характеризуется значением $\tau_{1/2}$ около 20 мин [31]. В 2004 г. была определена вторичная структура именно транскрипта длиной ~ 180 н.о. [25], в которой условно выделяют три части (рис. 3А): (1) протяженный двухцепочечный участок (1–72 н.о.), в центре которого находится расплетенный фрагмент; (2) слабо структурированный участок (73–153 н.о.), содержащий три небольшие шпильки; (3) короткая 3'-концевая неструктурированная AU-богатая область (154–178 н.о.), консервативная у всех SINE.

Методом футпринтинга установлено, что РНКП II связывает наименее структурированную половину молекулы (73–155 н.о.), а 5'-концевая шпилька не обязательна ни для связывания В2 РНК с РНКП II, ни для репрессии транскрипции. Анализ различных делеционных мутантов В2 РНК позволил определить участок длиной 51 н.о. (81–131 н.о.), который непосредственно взаимодействует с РНКП II и ингибирует транскрипцию *in vitro* с такой же эффективностью, как и полноразмерная В2 РНК [31]. Причем наиболее важную роль в ингибировании транскрипции играет неструктурированная область В2 РНК (99–115 н.о.),

фланкированная двумя шпильками. Удаление любой из них приводит к потере ингибирующей способности полностью функционального делеционного производного В2 РНК (81–131 н.о.). В то же время отсутствие этих шпилек в полноразмерной В2 РНК не сказывалось на ее свойствах. При этом все перечисленные делеционные мутанты В2 РНК специфически связывали РНКП при сборке ПИК на промоторе [31, 32]. Таким образом, для репрессии транскрипции необходимо правильное позиционирование одноцепочечного участка (99–115 н.о.) В2 РНК в комплексе с РНКП II, которое, по-видимому, может осуществлять любая из имеющихся шпилечных структур.

Сходство структурной организации В2 РНК и Alu РНК указывает на то, что помимо активного центра (блокирование которого приводит к глобальному ингибированию синтеза мРНК) РНКП II содержит дополнительный докинг-центр, высокоспецифичный к нкРНК. Как и в случае Alu РНК, в условиях *in vitro* образуется тройной комплекс РНКП II с В2 РНК и промотором одновременно [25]. Таким образом, В2 РНК может также связываться с РНКП после образования ее стабильного комплекса с промотором и ингибировать транскрипцию уже на стадии инициации. При этом невозможным становится не только синтез полноразмерных мРНК, но и абортных транскриптов. В результате экспериментов по кросслинкингу и футпринтингу ПИК, связанного с В2 РНК, установлено, что эта нкРНК мешает правильной координации промотора в активном центре полимеразы, тем самым переводя ПИК в инертную форму. По сути, В2 РНК меняет конформацию «закрытого» комплекса РНКП и препятствует его переходу в «открытый» и, тем более, в инициаторный комплексы. В то же время все ассоциированные с ПИК факторы, в частности ТВР и TFIIIV, остаются связанными с промотором и удерживают комплекс на ДНК [25].

Напомним, что в клетках мыши экспрессируется также В1 РНК, связывающая РНКП II, но не способная ингибировать транскрипцию. В1 РНК имеет сравнимое с В2 РНК сродство к полимеразе и способна вытеснять В2 РНК из ПИК. Следовательно, В1 РНК должна препятствовать функционированию В2 РНК. Однако в экспериментах *in vitro* было показано, что В2 РНК может ингибировать транскрипцию даже в том случае, когда ПИК предварительно был связан с В1 РНК [27]. Как осуществляется конкуренция между этими двумя нкРНК *in vivo* не установлено. Поскольку нефункциональный аналог существует и у Alu РНК человека, можно предположить, что эти неактивные нкРНК – В1 и scAlu РНК, в определенных условиях могут заменять соответственно В2 и Alu РНК и вновь стимулировать транскрипцию.

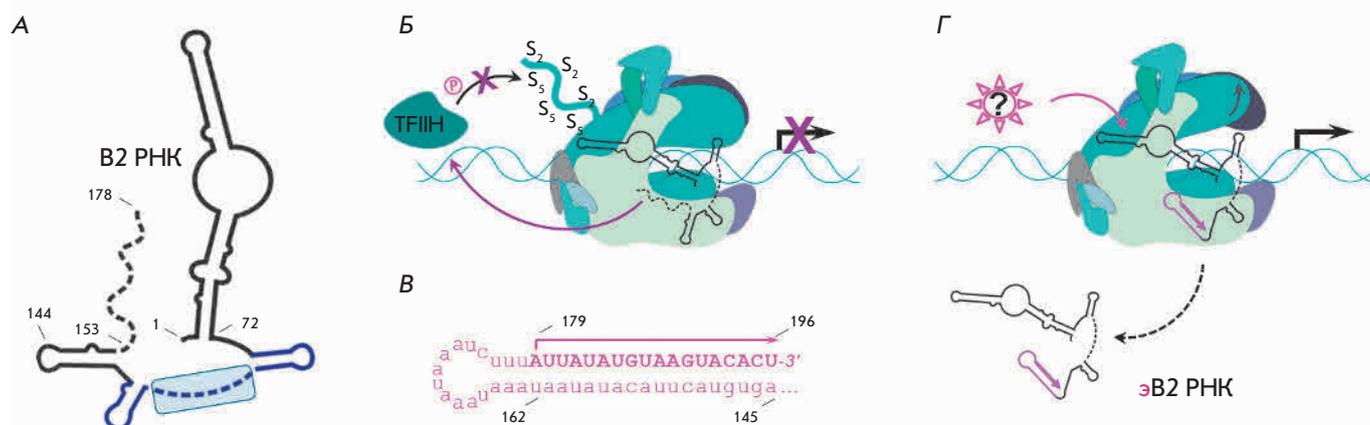


Рис. 3. Схема функционирования B2 РНК мыши. А – схематичное изображение вторичной структуры B2 РНК мыши. Неструктурированные части молекулы обозначены пунктирной линией, функциональная часть – синим цветом, ингибирующий домен выделен голубой рамкой. Б – «выключающая» киназную активность TFIIF, B2 РНК предотвращает инициацию транскрипции. Остатки Ser2 и Ser5 CTD Rpb1 обозначены как «S₂» и «S₃», фосфорилирование – «Р» в круге. В – нуклеотидная последовательность 3'-концевого участка (145–178 н.о.) B2 РНК, удлиняющегося на 18 н.о. [34]. Г – в результате элонгации 3'-конца B2 РНК (эB2 РНК) образуется новая шпилька (выделена розовым цветом), приводящая к конформационным изменениям РНКП II (показаны серой стрелкой) и диссоциации РНК. Процесс транскрипции с ДНК-матрицы обозначен черной стрелкой, транскрипция на матрице B2 РНК – розовой

Интересно, что помимо непосредственного «физического» блокирования активного центра РНКП II, B2 РНК специфически ингибирует киназную активность фактора транскрипции TFIIF (рис. 3Б). В состав TFIIF входит циклинзависимая киназа 7 (CDK7), в обычных условиях фосфорилирующая остатки серина в составе гептапептидных повторов YSPTSPS (главным образом Ser5) С-концевого домена (CTD) большой субъединицы (Rpb1) РНКП II. Модификация Ser2 и Ser5 CTD Rpb1 чрезвычайно важна для транскрипции. Она происходит на различных стадиях транскрипции: в инициаторном комплексе домен не фосфорилирован и, наоборот, гиперфосфорилирован при элонгации транскрипции [33]. Таким образом, B2 РНК не только создает конформационные затруднения самой РНКП II, но и делает невозможным переход в стадию элонгации, влияя на функционирование фактора транскрипции. Хотя TFIIF не является основной мишенью B2 РНК, и его репрессия обусловлена скорее всего взаимодействием B2 РНК с ПИК, этот случай уникален для подобных нкРНК.

Еще более удивительным свойством B2 РНК оказалась ее способность к собственной элонгации в комплексе с РНКП II [34]. При этом фермент использует 3'-конец молекулы B2 РНК в качестве матрицы для транскрипции и синтезирует *de novo* 18 «дополнительных» нуклеотидных остатков, образу-

ющих протяженную стабильную шпильку (рис. 3В,Г). Элонгация B2 РНК приводит к диссоциации молекулы из ПИК и, по-видимому, обеспечивает обратимость ингибирования. Высвободившаяся удлиненная B2 РНК подвергается деградации. Анализ данных компьютерного моделирования свидетельствует о том, что удлинение цепи B2 РНК (как и любой другой РНК, находящейся в активном центре полимеразы) должно приводить к частичному открытию домена «зажим» РНКП II и, как следствие, к ослаблению связывания лиганда с ферментом. По сути, образующийся новый структурный элемент элонгированной B2 РНК «выталкивает» молекулу из ПИК. Отметим, что элонгация B2 РНК пока изучена в условиях *in vitro* только при обработке комплекса B2 РНК с РНКП II клеточным экстрактом [34]. Полагают, что РНК-зависимая транскрипция РНКП II инициируется белковым фактором, природа которого неизвестна.

Поскольку большинство РНК-полимераз являются ДНК-зависимыми (за исключением РНКП ретровирусов), удлинение B2 РНК представляет своего рода исключение из правила, так как фермент меняет свою субстратную специфичность. На сегодняшний день известно лишь несколько подобных примеров, также связанных с функционированием нкРНК. Например, данный механизм используется вирусом гепатита δ, а также виридами растений для репликации соб-

ственных геномов. Не имея своей РНК-полимеразы, эти патогенные кольцевые нкРНК используют РНКП клеток хозяев, перепрограммируя их на синтез РНК с РНК-матрицы [35]. Более ярким примером может быть прокариотическая 6S РНК, которая, как и В2 РНК, ингибирует транскрипцию за счет взаимодействий с РНКП. В определенных условиях бактериальная РНКП может синтезировать на матрице 6S РНК короткие транскрипты длиной до 30 н.о. (пРНК). При этом фермент диссоциирует из комплекса с 6S РНК и возобновляет транскрипцию с промоторов генов [36]. Таким образом, несмотря на колоссальные различия в процессах транскрипции у про- и эукариот, между функционированием 6S РНК бактерий и В2 РНК мыши можно отметить несомненное сходство.

НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК, РЕГУЛИРУЮЩИЕ АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ

U1 мяРНК

U1 мяРНК – одна из пяти основных мяРНК, формирующих ядро сплайсосомы. U1 мяРНК человека имеет длину 164 н.о. и ассоциирована с белками U1-А, U1-С и U1-70к, а также с восемью белками семейства Sm, образующими вместе комплекс U1 мяРНП (~245 кДа). Основная функция U1 мяРНП – узнавание премРНК на первой (иницирующей) стадии сборки сплайсосомы, осуществляемое благодаря комплементарным взаимодействиям 5'-концевого участка U1 мяРНП с сайтом сплайсинга интронов [37]. Тем не менее, помимо своей основной роли, U1 мяРНК способна взаимодействовать с циклином Н (CycH) в составе ТFIIN, что, в свою очередь, приводит к повышению киназной активности другой субъединицы этого фактора – CDK7 (рис. 4А). В условиях транскрипции *in vitro* было показано, что присутствие в реакционной смеси U1 мяРНК повышает скорость образования первой фосфодиэфирной связи, а эффективность инициации транскрипции увеличивается более чем в 10 раз. Кроме того, U1 мяРНК стимулирует abortивную инициацию, а также реинициацию транскрипции с промотора, предшествующего 5'-концевому сайту сплайсинга [38]. Помимо ТFIIN, U1 мяРНК может взаимодействовать с другим фактором транскрипции – TAF15, ассоциированным с TFIID в составе ПИК и предположительно участвующим в стадии элонгации [39]. Так или иначе, U1 мяРНК активирует процесс транскрипции, в отличие от других описанных выше регуляторных нкРНК.

DHFR нкРНК

Ген *DHFR* кодирует дигидрофолатредуктазу – один из основных ферментов метаболизма фолатов. Около

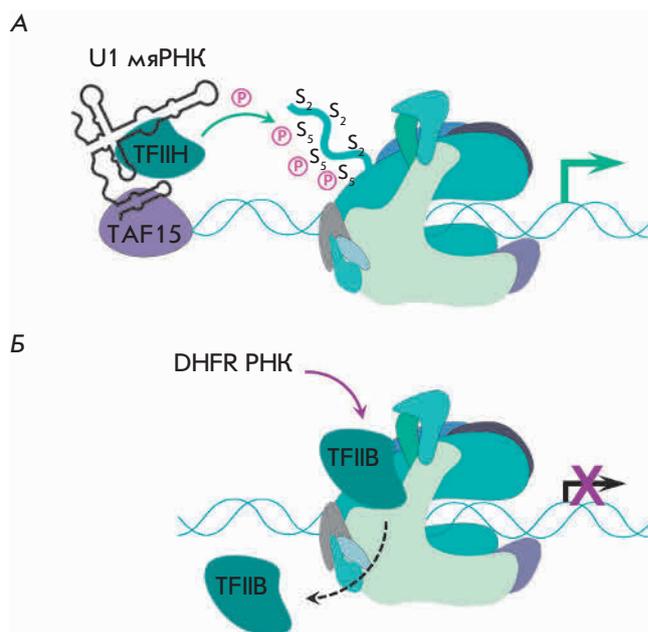


Рис. 4. Схема функционирования U1 мяРНК (А) и DHFR нкРНК (Б). Вторичная структура U1 мяРНК адаптирована из [37], для DHFR нкРНК структурные данные отсутствуют. Стимулируя ТFIIN-зависимое фосфорилирование CTD Rpb1 РНКП II, U1 мяРНК активирует процесс транскрипции (условно показан зеленой стрелкой). DHFR нкРНК ингибирует транскрипцию, вытесняя транскрипционный фактор TFIIB из ПИК

99% мРНК *DHFR* транскрибируются с основного промотора и содержат шесть экзонов. В условиях сыровоточного голодания и замедления роста клеток «включается» альтернативный промотор, расположенный на расстоянии ~450 н.о. от основной точки инициации транскрипции. В результате преждевременной терминирования транскрипции во втором интроне образуется короткий продукт экспрессии с минорного промотора – DHFR нкРНК, длина которой варьирует от 800 до 2–3 т.н.о. [40]. Функциональной частью молекулы считается участок длиной ~400 н.о., комплементарный промоторной области собственного гена и содержащий протяженные поли(dG)-последовательности, благодаря которым DHFR нкРНК образует с промотором пурин-пурин-пиримидиновый триплекс, имеющий Н-форму и препятствующий сборке ПИК [41]. Таким образом, DHFR нкРНК относится к классу нкРНК, ассоциированных с промотором [9]. Кроме того, она способна взаимодействовать с транскрипционным фактором TFIIB в составе ПИК, что приводит к его диссоциации [42]. Поскольку связывание TFIIB с промотором является ключевой стадией сборки ПИК, а DHFR нкРНК полностью предотвращает этот процесс, наступает ингибирование транскрипции. Какой

именно участок DHFR нкРНК отвечает за взаимодействие с TFIIВ, неизвестно, как, впрочем, и детали процессинга самой DHFR нкРНК.

7SK и TAR РНК

7SK РНК человека и TAR РНК ВИЧ являются, вероятно, самыми известными эукариотическими нкРНК, участвующими в регуляции элонгации транскрипции. Обе нкРНК выступают в роли платформ для сборки белковых ассоциатов, модулирующих активность элонгационного комплекса РНКП II, а также взаимодействуют с фактором Р-TEFb [43–45].

Р-TEFb – ключевой транскрипционный фактор, который стимулирует переход РНКП II, приостановленной на промоторе (так называемые паузы транскрипции, необходимые для 5'-кэпирования растущей цепи мРНК), в стадию активной элонгации. Р-TEFb состоит из циклинзависимой киназы 9 (CDK9) и циклина Т1 или его аналогов СусТ2а и СусТ2b (далее СусТ). Его основная функция состоит в фосфорилировании Ser2 CTD Rpb1 РНКП II, а также репрессоров транскрипции NELF и DSIF [46] (рис. 5А). Привлечение Р-TEFb к полимеразе осуществляется благодаря различным ДНК-связывающим белкам, в первую очередь Brd4, а также классическим транскрипционным факторам, таким, как NF-κB, HSF, p53, c-Myc и др. После преодоления паузы Р-TEFb связывает ряд других белков, образующих суперэлонгационный комплекс (SEC) РНКП II [47].

В отсутствие Р-TEFb РНКП II способна синтезировать только короткие 5'-концевые последовательности пре-мРНК, т.е. этот фактор необходим для синтеза большинства клеточных мРНК. Взаимодействуя с Р-TEFb, 7SK мяРНК ингибирует его активность, что является важным регуляторным механизмом экспрессии генов в клетках эукариот. С другой стороны, высвобождение Р-TEFb из комплекса с 7SK мяРНК может служить сигналом для роста и пролиферации клеток [48]. TAR РНК ВИЧ, наоборот, активирует Р-TEFb, что способствует инициации транскрипции с 5'-концевого вирусного промотора (5'-LTR) [45]. В данном обзоре описаны лишь основные особенности этих нкРНК и принципы их функционирования.

7SK мяРНК имеет длину 332 н.о. и состоит из четырех основных длинных шпильчатых структур, соединенных неструктурированными участками, и дополнительных малых шпилек. Хотя геном человека содержит сотни псевдогенов 7SK мяРНК, эта РНК (~2×10⁵ копий на клетку) транскрибируется РНКП III с единственного истинного гена, расположенного в шестой хромосоме. Нуклеотидная последовательность этого гена высококонсервативна у позвоночных [49]. В процессе посттранскрипционной модифи-

кации нуклеазы отщепляют от 7SK РНК 3'-концевые 1–3 н.о., а затем происходит аденилирование, приводящее к существованию в клетке трех различных вариантов 7SK мяРНК длиной 330, 331 и 332 н.о., из которых наиболее устойчив 331-звенный. Помимо этого, 7SK мяРНК кэпируется с 5'-конца: метилтрансфераза MePCE метилирует 5'-концевой остаток гуанозина по γ-фосфатной группе. Такой процесс не характерен для транскриптов, синтезированных РНКП III, и к настоящему времени описан только для U6 и 7SK мяРНК [50].

Примерно 90% 7SK мяРНК в клетке остаются связанными с MePCE и вместе с белком LARP7 образуют так называемое ядро рибонуклеопротеинового комплекса 7SK мяРНК (рис. 5Б). MePCE и LARP7 также образуют контакты друг с другом, дополнительно обеспечивая стабильность мяРНК; в таком виде 7SK РНК надежно защищена от деградации. Далее с комплексом связывается белок HEXIM в форме димера, состоящего из взаимозаменяемых паралога HEXIM1 и/или HEXIM2. Аргинин-богатый РНК-связывающий домен (ARM) HEXIM связывает 5'-концевую шпильку 7SK мяРНК, при этом конформация белка изменяется, и он может взаимодействовать с СусТ Р-TEFb. Дополнительно С-концевой домен LARP7 связывает CDK9, обеспечивая прочную структуру всего комплекса. По-видимому, 7SK РНК также участвует в образовании контактов с Р-TEFb. В итоге фактор теряет киназную активность, что не позволяет ему обеспечивать элонгацию транскрипции [48, 51, 52].

Однако не весь Р-TEFb оказывается связанным с 7SK мяРНК. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что в клеточном ядре свободная и связанная формы Р-TEFb находятся в постоянно поддерживаемом равновесии, контролируемом с помощью различных сигнальных механизмов. Например, ряд гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP) и РНК-хеликаза А (RHA), связываясь с ядром 7SK мяРНК, блокируют доступ Р-TEFb (рис. 5Б). Еще один механизм связан с временной инактивацией Р-TEFb, поскольку только активированная форма белка (с фосфорилированным остатком Т186 в так называемой Т-петле CDK9) может взаимодействовать с 7SK мяРНК. За этот процесс отвечают серин-треониновые фосфатазы, включая PPM1G, которую привлекает NF-κB. Ряд белков может также ацетилировать СусТ, фосфорилировать HEXIM, деметилировать 7SK мяРНК с 5'-конца или осуществлять протеолиз MePCE, что приводит к дестабилизации комплекса и диссоциации Р-TEFb. После высвобождения из 7SK мяРНК фактор вновь модифицируется [52]. Отметим, что значительная часть Р-TEFb в комплексе с 7SK мяРНК ассоции-

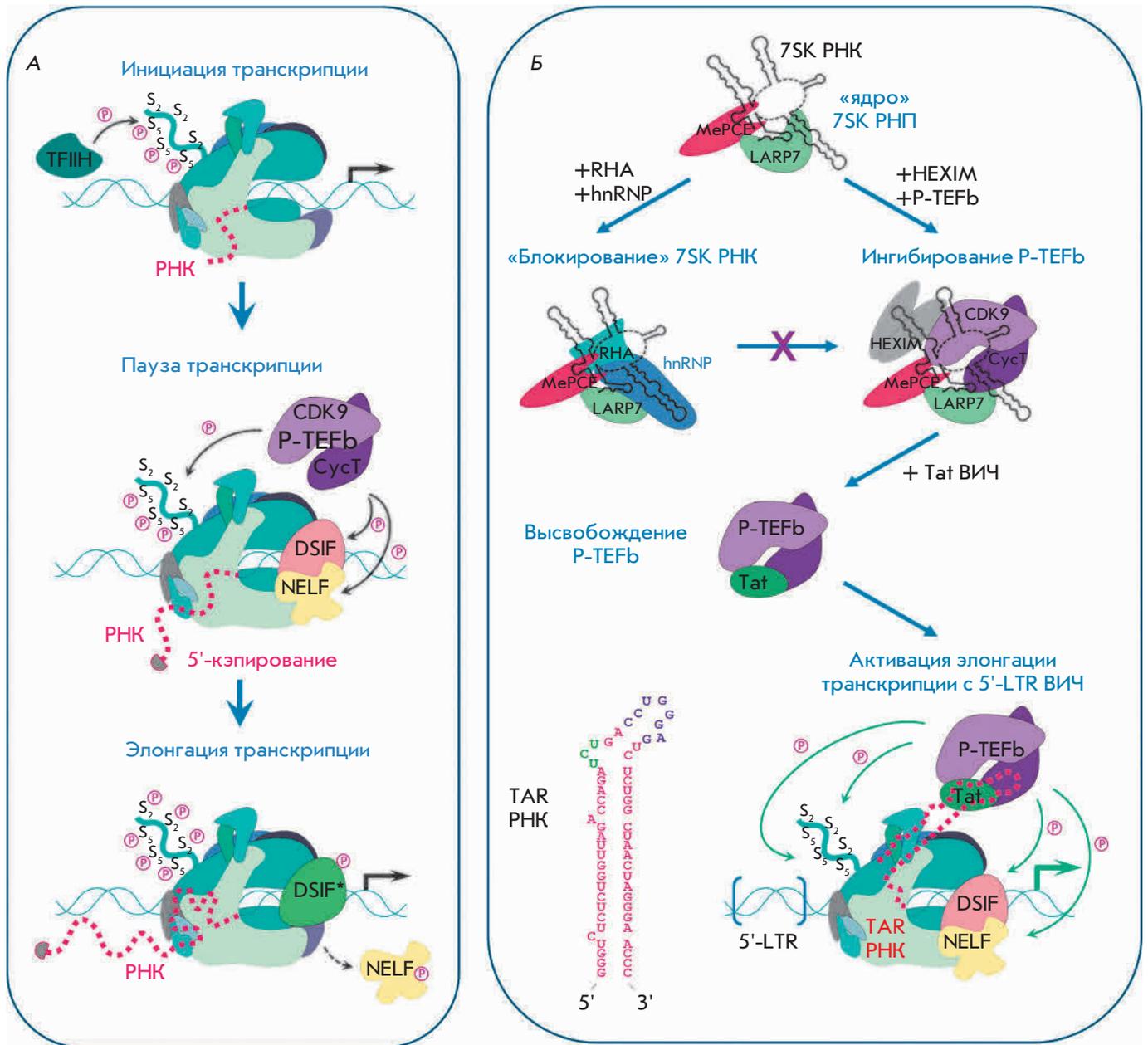


Рис. 5. Регуляция транскрипции с участием 7SK РНК человека и TAR РНК ВИЧ. А – схема основных стадий транскрипции, осуществляемой РНКП II [46]. Для инициации транскрипции TFIIH фосфорилирует остатки Ser5 CTD Rpb1 РНКП. Синтезировав короткий участок мРНК, РНКП останавливается, и с ней связываются негативные элонгационные факторы NELF и DSIF: наступает транскрипционная пауза. После кэпирования 5'-конца растущей цепи РНК процесс транскрипции возобновляется: ДНК-связывающие белки привлекают фактор P-TEFb, фосфорилирующий CTD Rpb1 РНКП и факторы NELF и DSIF. Последний превращается в активатор транскрипции (DSIF*, обозначен зеленым цветом), а модифицированная форма NELF диссоциирует из комплекса, позволяя РНКП перейти в стадию элонгации. Б – схема сборки альтернативных белковых комплексов на 7SK РНК. Связывание RHA и hnRNP с «ядром» 7SK РНК предотвращает ингибирование P-TEFb. Белок ВИЧ Tat способен вытеснять P-TEFb из 7SK РНК и привлекать его к РНКП, «приостановленной» вблизи стартовой точки транскрипции. TAR РНК, взаимодействуя с Tat и CysT, активирует киназную активность P-TEFb, и фактор гиперфосфорилирует CTD Rpb1 РНКП и NELF/DSIF, что приводит к элонгации вирусного транскрипта

рована с хроматином (например, посредством белка Brd4, взаимодействующего с ацилированными гистонами H3 и H4), и описанные механизмы часто осуществляются котранскрипционно. Brd4 также может связывать Р-TEFb в комплексе с 7SK мяРНК и инициировать изменение конформации СуcТ и диссоциацию CDK9 [53].

Более известен механизм диссоциации Р-TEFb из комплекса с 7SK мяРНК в клетках, зараженных ВИЧ, в котором принимает участие TAR РНК (рис. 5Б). TAR РНК – это 5'-концевой структурный элемент (шпилька) растущей цепи вирусной РНК, синтезирующейся с 5'-LTR. В отсутствие дополнительной активации РНКП II не способна синтезировать с 5'-LTR транскрипты длиной более 60–80 н.о., и TAR РНК, состоящая из 59 н.о., является минимальным фрагментом, после которого наступает пауза транскрипции. Для стимуляции элонгации TAR РНК связывается с вирусным белком Tat, который привлекает к 5'-LTR различные транскрипционные факторы, включая Р-TEFb [54]. Данное взаимодействие обусловлено специфическими контактами между аргинин-богатым РНК-связывающим доменом (ARM) Tat и тринуклеотидной боковой петлей 5'-UCU-3' в TAR РНК. При этом апикулярная петля TAR РНК и фланкирующий ее участок взаимодействуют с СуcТ (рис. 5Б). Эта область молекулы имитирует 5'-концевую шпильку 7SK мяРНК, что позволяет TAR РНК также связывать ARM HEXIM и в отсутствие Tat не допускать активацию Р-TEFb. Кроме того, Tat непосредственно взаимодействует с СуcТ и CDK9, образуя стабильный комплекс, кристаллическая структура которого была решена в 2010 г. [55]. Связывая так называемую Т-петлю CDK9, Tat меняет субстратную специфичность киназы, которая начинает фосфорилировать не только Ser2 в CTD Rpb1, но и остатки Ser5 [56]. Это позволяет ВИЧ активировать элонгацию транскрипции даже без привлечения TFIIH (рис. 5Б). Формирование тройного комплекса Tat-TAR-Р-TEFb регулируется набором ферментов, осуществляющих ацетилирование, фосфорилирование, метилирование и убиквитинирование Tat [54].

Очевидно, что между комплексом Tat-TAR РНК и 7SK мяРНК должна существовать конкуренция за связывание с Р-TEFb. Как оказалось, Tat может вытеснять фактор элонгации из его комплекса с 7SK мяРНК благодаря непосредственному взаимодействию Tat с СуcТ и изменению конформации Р-TEFb [57, 58]. Похожий механизм описан для РНК-связывающих белков SRSF1 и SRSF2, вовлеченных в процессы сплайсинга и метаболизма РНК в клетках млекопитающих и, как правило, ассоциированных с промоторными областями активно транскрибируемых генов. Оба белка способны связывать 5'-кон-

цевую шпильку 7SK мяРНК, образуя альтернативный 7SK мяРНК. Если растущая цепь РНК содержит последовательность ESE (exonic-splicing enhancer), SRSF1 и SRSF2 связываются с ней, высвобождая активный Р-TEFb в непосредственной близости от РНКП II и стимулируя элонгацию транскрипции нужного гена [59].

НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИЕ С ДРУГИМИ ТРАНСКРИПЦИОННЫМИ ФАКТОРАМИ

SRA РНК

SRA РНК (steroid receptor activator) человека – длинная нкРНК, участвующая в активации эстрогеновых (ER), прогестероновых (PR), глюкокортикоидных (GR) и других ядерных рецепторов. Так же, как и 7SK мяРНК, SRA РНК выступает в роли платформы для связывания (в том числе и конкурентного) различных факторов транскрипции, важнейшие из которых – CTCF, SLIRP и SHARP, а также РНК-хеликазы р68 и р72 [60, 61]. Кроме того, SRA РНК модулирует активность транскрипционного фактора MyoD, играющего ключевую роль в дифференцировке мышечных клеток [62]. SRA РНК присутствует во всех тканях человека, хотя более высокий ее уровень наблюдается в тканях печени, сердца и в скелетных мышцах [63]. Экспрессия SRA РНК повышена при поликистозе яичников и раке молочной железы у женщин, что обуславливает растущий интерес к этой РНК как к одной из терапевтических мишеней [61].

Ген *sra1*, кодирующий SRA РНК, высококонсервативен в геноме мыши, крысы и человека. Он имеет длину около 6500 н.о. и состоит из пяти экзонов. В клетках человека обнаружено не менее 20 различных изоформ SRA РНК длиной от 700 до 1500 н.о. Большинство транскриптов содержат кор-элемент длиной 687 н.о., соответствующий экзонам 2–5, и отличаются 5'- и 3'-концевыми участками [64]. В 2012 г. методами химического и ферментативного пробинга была установлена вторичная структура 873-звенного варианта SRA РНК, состоящая из 25 шпилек (H1–H25) различной длины и формы, условно разделяемых на четыре домена D1–D4 и 12 главных структурных элементов STR1–STR12 (рис. 6А) [65]. Анализ делеционных производных позволил выявить шесть наиболее важных STR, ответственных за связывание с теми или иными белками. При этом удаление любого STR приводило к полной или частичной потере молекулой ее функциональных свойств, т.е. все основные взаимодействия осуществляются именно благодаря мультиплетной структуре SRA РНК [66].

Тем не менее, наиболее важным для взаимодействия с ядерными рецепторами является до-

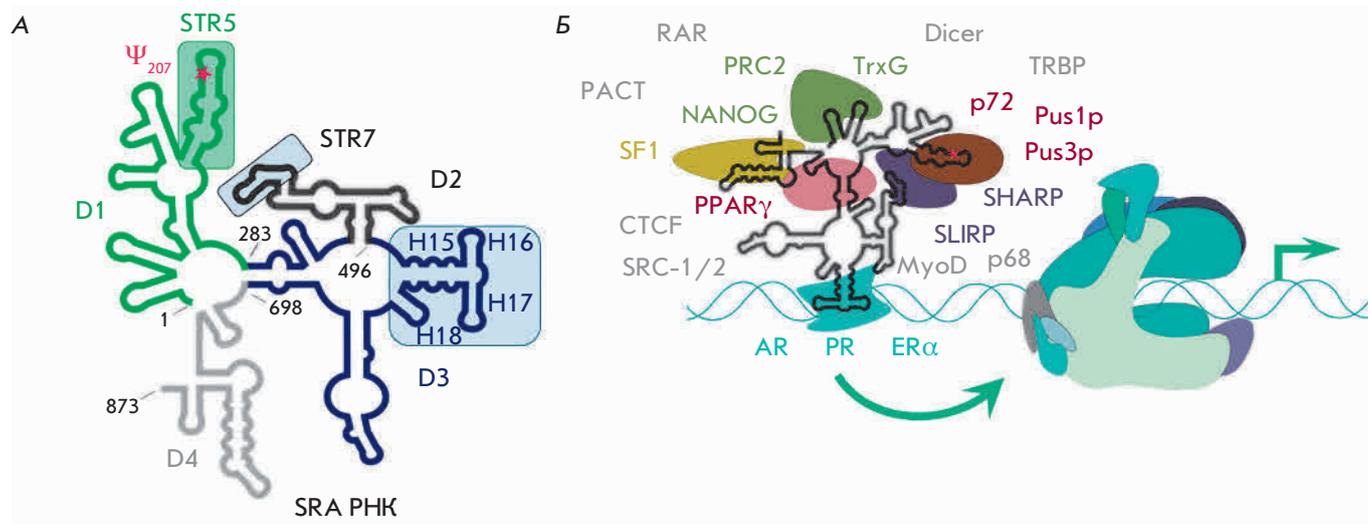


Рис. 6. Схематичное изображение вторичной структуры SRA PHK человека (А) и ее известных на данный момент белков-партнеров (Б) согласно Лиу и соавт. [61]. Домены SRA PHK выделены цветом: D1 – зеленым, D2 – черным, D3 – синим, D4 – серым. Остаток U207, подвергающийся псевдоуридилированию, отмечен звездочкой. На панели А главные структурные элементы SRA PHK, образующие контакты с белками, выделены рамками. На панели Б условно изображены (и подписаны соответствующими цветами) белки, образующие контакты с SRA PHK. Ядерные рецепторы (AR – андрогенный, PR – прогестероновый, ER α – эстрогеновый α) выделены голубым. Серым шрифтом обозначены остальные белки, связывающиеся с SRA PHK

мен D3 (494–699 н.о.). Входящий в его состав элемент H15–H18 (505–575 н.о.) высококонсервативен у позвоночных. Интересно, что индивидуальная экспрессия этого элемента приводит, наоборот, к ингибированию транскрипции ER α -зависимых генов [67]. Переключение функции SRA PHK с активации на репрессию ядерных рецепторов также наблюдалось при замене чрезвычайно важного остатка U207 в STR5 на аденозин. U207 является сайтом псевдоуридилирования, осуществляемого псевдоуридинсинтазами Pus1p и Pus3p – коактиваторами ядерных рецепторов. Например, непосредственное взаимодействие SRA PHK с Pus1p в клетках мышцы активирует транскрипцию генов, зависимых от рецепторов ретиноевой кислоты (mRARc) [68]. Синтетический олигонуклеотид, идентичный STR5, способен конкурировать с полноразмерной SRA PHK и блокировать Pus1p, предотвращая модификацию этой нкPHK, что приводит к ингибированию транскрипции AR- и ER α -зависимых генов [69].

STR7 SRA PHK взаимодействует с PHK-узнающими мотивами (RRM) факторов SHARP и SLIRP, инициируя тем самым как активацию, так и ингибирование транскрипции различных генов. Еще один партнер SRA PHK – рецептор PPAR γ , регулирующий экспрессию генов, вовлеченных в контроль адипогенеза и чувствительности к инсулину [60].

Так или иначе, SRA PHK это один из важнейших звеньев контроля активности ядерных рецепторов, участвующий в различных регуляторных механизмах, в которые вовлечены целые каскады белков (рис. 6Б).

Как и для других нкPHK в клетке существуют механизмы подавления активности SRA PHK, главным образом с участием белка SRAP, закодированного в 39% SRA PHK-транскриптов, что представляет собой пример своеобразной саморегуляции. Фактически SRA PHK является кодирующей PHK, хотя основную функцию все же выполняет некодирующий вариант транскрипта гена *sra1*. На данный момент не до конца ясно, способен ли SRAP непосредственно связывать SRA PHK и препятствовать ее взаимодействию с другими белками, или этот процесс осуществляется через факторы транскрипции, ассоциированные с SRA PHK или ядерными рецепторами [70]. Тем не менее, соотношение между количеством транслируемого и нетранслируемого продуктов транскрипции гена *sra1* является одним из ключевых моментов регуляции транскрипции в клетке. Например, при дифференцировке миоцитов равновесие сильно смещается в сторону некодирующей SRA PHK, и она может беспрепятственно взаимодействовать с активаторами транскрипции, привлекая их на MyoD-зависимый промотор и активируя транскрипцию соответствующих генов [71].

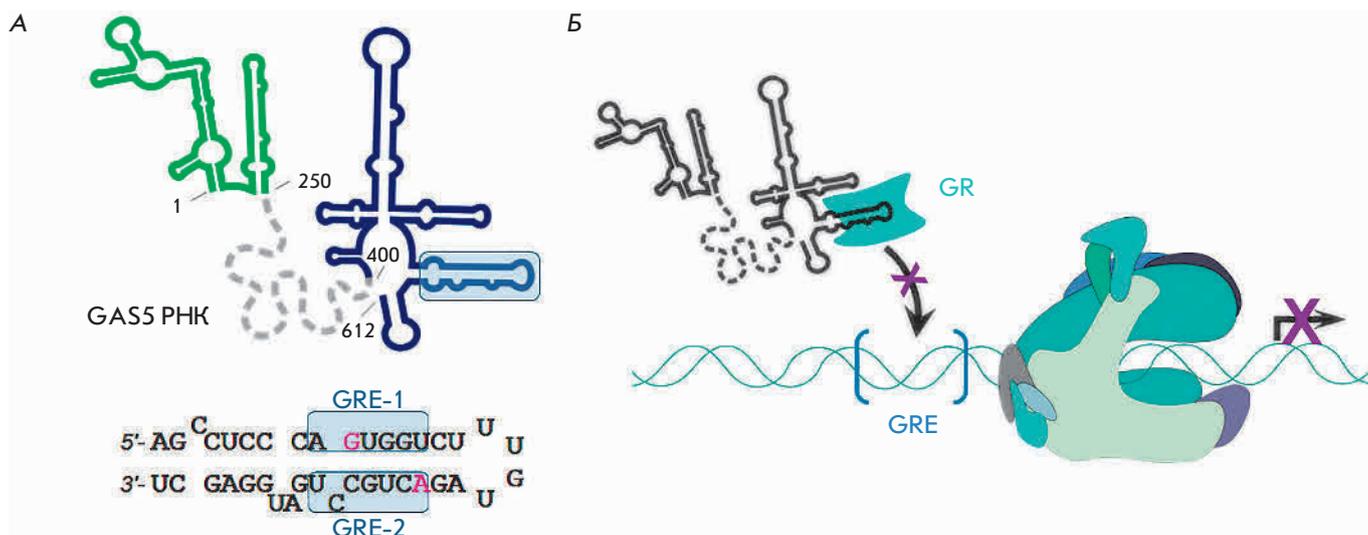


Рис. 7. Схема ингибирования транскрипции глюкокортикоидзависимых генов в присутствии GAS5 РНК. А — предсказанная вторичная структура GAS5 РНК (вверху) и нуклеотидная последовательность функциональной области (шпильки), содержащей участки GRE-1 и GRE-2, имитирующие промотор (внизу). Остатки G540 и C554 выделены розовым. Зеленым цветом выделен фрагмент GAS5 РНК, взаимодействующий с белком NS3 HCV; серым – домен, ответственный за взаимодействия с miR (его вторичная структура не описана). Оба домена, по-видимому, не участвуют в регуляции транскрипции. Б – GAS5 РНК ингибирует транскрипцию, связывая ядерные рецепторы и предотвращая их взаимодействие с GRE-содержащими промоторами

GAS5 РНК

Еще одна длинная нкРНК, контролирующая транскрипцию через регуляцию ядерных рецепторов – GAS5 РНК (growth arrest-specific 5). В обычных условиях GAS5 РНК быстро подвергается деградации. Однако в условиях сывороточного голодания в остановленных на определенной стадии роста (арестованных) клетках или при обработке ингибиторами трансляции наблюдается индукция ее экспрессии и повышение стабильности, с чем и связано название этой нкРНК [72]. Основная функция GAS5 РНК – ингибирование глюкокортикоидного рецептора GR – фактора транскрипции, ответственного за активацию глюкокортикоидзависимых генов. GR является ДНК-связывающим белком, который узнает нуклеотидные последовательности GRE (glucocorticoid responsive element) в промоторных областях контролируемых генов. Функциональный участок GAS5 РНК имитирует GRE и, связываясь с GR, блокирует его доступ к промоторам, тем самым предотвращая активацию их транскрипции (рис. 7). GAS5 РНК может взаимодействовать не только с GR, но и с другими ядерными рецепторами, связывающимися GRE, в частности с рецепторами андрогенов, прогестерона и др. [73]. Последние исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, однозначно указывают на важную роль GAS5 РНК в инициации апоптоза различных видов опухолевых клеток и в ингибировании пролиферации

и метастазирования, а также в регуляции иммунного ответа при различных воспалительных, бактериальных и вирусных заболеваниях [74, 75].

GAS5 РНК человека кодируется геном *gas5*, который содержит 12 экзонов, перемежающихся с 10 интронами, кодирующими малые ядрышковые РНК. После транскрипции, осуществляемой РНКП II, пре-мРНК гена *gas5* подвергается полиаденилированию и альтернативному сплайсингу, что приводит к появлению различных изоформ GAS5 РНК, основными из которых являются GAS5a (612 н.о.) и GAS5b (651 н.о.) РНК, содержащие экзоны 7a или 7b соответственно. Более длинные варианты GAS5 РНК (~1200–1800 н.о.) встречаются реже и содержат одну или несколько последовательностей, кодирующих малые ядрышковые РНК [72, 76]. В нормальных условиях GAS5 РНК локализуется в цитоплазме, оставаясь ассоциированной с рибосомой. Но при задержке роста клеток она транслоцируется в ядро, где и взаимодействует с рецептором GR [76].

Вторичная структура GAS5 РНК представлена набором шпилек, а функциональный участок, идентифицированный путем делеционного анализа, расположен в 3'-концевой части молекулы (400–598 н.о., рис. 7A), которая встречается по всех изоформах GAS5 РНК. Основные контакты образуются между GR и стеблем шпильки GRE-1/GRE-2 (539–544 и 553–559 н.о.), имитирующей конформацию палин-

дромной GRE-последовательности ДНК d(5'-AGAA-CANNNTGTTCT-3'/3'-TCTTGTNNNACAAGA-5', где N = A, T, C, G). Остатки G540 и C554 в GAS5 РНК консервативны среди консенсусных GRE-последовательностей человека и взаимодействуют соответственно с K442 и R447 в ДНК-связывающем домене белка GR. Замена C554U в GAS5 РНК при сохранении стабильности двойной спирали приводила к потере способности этой РНК ингибировать GR-зависимую транскрипцию с промотора MMTV (mouse mammary tumor virus) *in vivo* [76]. Таким образом, GAS5 РНК конкурирует с GRE-содержащими промоторами за связывание с GR по аналогии с бактериальной 6S РНК, также имитирующей промотор и ингибирующей РНКП [36]. Было показано, что трансфекция опухолевых клеточных линий олигонуклеотидами, идентичными участку 538–560 н.о. GAS5 РНК, приводит к эффективной индукции апоптоза и снижению выживаемости клеток [77], что, возможно, позволит в будущем использовать их в терапевтических целях.

Количество GAS5 РНК в клетке регулируется с помощью системы NMD (nonsense-mediated RNA decay), осуществляющей деградацию «бессмысленных» последовательностей мРНК, и сигнального пути, зависящего от киназы mTOR (mammalian target of rapamycin). Предполагается, что в условиях активного клеточного роста может происходить mTOR-зависимая трансляция короткой открытой рамки считывания (ORF), локализованной в GAS5 РНК (напомним, что нкРНК в этих условиях ассоциирована с рибосомой). Однако большое число стоп-кодонов в ORF и малая длина потенциально синтезируемого пептида приводят к активации NMD и деградации GAS5 РНК. В случае клеточного ареста и низкой концентрации комплекса mTOR GAS5 РНК не транслируется, и ее уровень возрастает [73].

Помимо своей основной функции GAS5 РНК связывает онкогенные miR-21, miR-222 и miR-103, выступая тем самым в роли миРНК-губки и предотвращая их влияние на экспрессию генов [74, 78]. Более того, в последних исследованиях обнаружено, что 5'-концевой участок GAS5 РНК (1–250 н.о.) способен связывать белок NS3 вируса гепатита С (HCV) и ингибировать его функцию, подавляя тем самым репликацию HCV [79]. Очевидно, мультифункциональность GAS5 РНК обусловлена различными доменами молекулы, каждый из которых отвечает за взаимодействие с определенной мишенью (рис. 7).

ДРУГИЕ РНК, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ

В настоящее время известны десятки различных нкРНК, модулирующих активность транскрипцион-

ных факторов. Большинство из них «работают» лишь в определенных (стрессовых) условиях и зачастую тканеспецифичны [13, 17]. Например, NRSE РНК (neuron-restrictive silencer element) экспрессируется в стволовых клетках и связывается с транскрипционным репрессором NRSF/REST, ответственным за молчание нейронспецифичных генов. Механизм этого РНК-белкового взаимодействия аналогичен механизму GAS5 РНК: NRSE РНК представляет собой короткую (~20 п.о.) двухцепочечную РНК, имитирующую структуру промотора. Связанный с NRSE РНК фактор NRSF/REST превращается в активатор транскрипции и «включает» экспрессию нейронспецифичных генов [80]. TSU РНК (trophoblast STAT utron) – 5'-нетранслируемый конец мРНК гена, кодирующего фактор транскрипции STAT1, связывает собственный белок, имитируя STAT-связывающий промотор, и ингибирует тем самым экспрессию генов главного комплекса гистосовместимости [81]. Длинная некодирующая РНК HSR1 (~600 н.о.) активирует HSF1 – основной фактор транскрипции теплового шока, который инициирует работу элонгационного комплекса РНКП II, остановленного на промоторах стрессовых генов [82]. Другие нкРНК влияют на активность факторов транскрипции, изменяя их клеточную локализацию, например, NRON РНК и lncРНК-p21 [83].

Отдельного внимания заслуживают кольцевые РНК (circРНК, или ciРНК) – продукты альтернативного сплайсинга, в результате которого происходит замыкание 5'- и 3'-концов молекулы. По последним данным более 100 кольцевых РНК ассоциировано с РНКП II, и, по крайней мере, некоторые из них активируют транскрипцию собственных генов [84]. Предполагается, что кольцевые нкРНК косвенно взаимодействуют с РНКП II через рибонуклеопротеиновый комплекс U1 сплайсосомы, однако конкретный механизм их действия не известен [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последнее время появляются все новые данные о различных нкРНК, вовлеченных в регуляцию транскрипции в клетках эукариот как на уровне конкретных генов, так и в более глобальном масштабе. Чаще всего это длинные нкРНК, регулирующие этот процесс на стадиях ремоделирования хроматина. В данном обзоре описаны те нкРНК, механизмы действия которых тесно связаны с контролем функционирования транскрипционного комплекса РНКП II. Рассмотренные нкРНК имеют и ряд других, не менее важных свойств. Например, Alu РНК связывает белки SRP9/14 (signal recognition particle) и в составе этого РНП ингибирует инициацию трансляции. Отметим, что в свободном виде Alu РНК, на-

против, способна активировать этот процесс [85]. У1 мРНК представляет собой один из основных компонентов сплайсосомы, и ее участие в активации транскрипционных факторов не столь значимо. В то же время способность GAS5 РНК взаимодействовать с онкогенными miR может оказаться не менее важной, чем способность связывать GR-рецепторы. Наконец, показано, что B2 РНК регулирует транскрипцию, не только взаимодействуя с РНКП II и подавляя ее активность, но и непосредственно связываясь с генами белков теплового шока и ингибируя

их экспрессию в отсутствие стресса. При повышении температуры B2 РНК подвергается деградации, инициированной белком EZH2 в составе комплекса PRC2, и освобождает эти гены для активной транскрипции [86]. Эти и другие факты свидетельствуют о многообразии свойств и функций нкРНК, и, несомненно, указывают на их чрезвычайную важность для жизнедеятельности клетки. ●

*Работа выполнена в рамках гранта РФФ
(№ 14-24-00061).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yang Z., Li X., Yang Y., He Z., Qu X., Zhang Y. // Cell Death Dis. 2016. V. 7. № 9. P. e2389.
- Francia S. // Front Genet. 2015. V. 13. № 6. P. 320.
- Kaikkonen M.U., Lam M.T.Y., Glass C.K. // Cardiovasc. Res. 2011. V. 90. № 3. P. 430–440.
- Castelnuovo M., Stutz F. // Curr. Opin. Cell Biol. 2015. V. 34. P. 16–22.
- Esteller M. // Nat. Rev. Genet. 2011. V. 12. № 12. P. 861–874.
- Khurana E., Fu Y., Chakravarty D., Demichelis F., Rubin M.A., Gerstein M. // Nat. Rev. Genet. 2016. V. 17. № 2. P. 93–108.
- Lopez-Pajares V. // Pflug. Arch. 2016. V. 468. № 6. P. 971–981.
- Iwasaki Y.W., Siomi M.C., Siomi H. // Annu. Rev. Biochem. 2015. V. 84. P. 405–433.
- Yan B.X., Ma J.X. // Cell Mol. Life Sci. 2012. V. 69. № 17. P. 2833–2842.
- Lam M.T., Li W., Rosenfeld M.G., Glass C.K. // Trends Biochem. Sci. 2014. V. 39. № 4. P. 170–182.
- St. Laurent G., Wahlestedt C., Kapranov P. // Trends Genet. 2015. V. 31. № 5. P. 239–251.
- Rutenberg-Schoenberg M., Sexton A.N., Simon M.D. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2016. V. 17. P. 69–94.
- Eidem T.M., Kugel J.F., Goodrich J.A. // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. № 12. P. 2652–2659.
- Boon R.A., Jaé N., Holdt L., Dimmeler S. // J. Am. Coll. Cardiol. 2016. V. 67. № 10. P. 1214–1226.
- Walters R.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. // IUBMB Life. 2009. V. 61. № 8. P. 831–837.
- Kettenberger H., Eisenführ A., Brueckner F., Theis M., Famulok M., Cramer P. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2006. V. 13. № 1. P. 44–48.
- Mondragón E., Maher L.J. // Nucl. Acids Ther. 2016. V. 26. № 1. P. 29–43.
- Kramerov D.A., Vassetzky N.S. // Heredity. 2011. V. 107. № 6. P. 487–495.
- Fornace A.J.Jr., Alamo I.Jr., Hollander M.C., Lamoreaux E. // Exp. Cell Res. 1989. V. 182. № 1. P. 61–74.
- Elbarbary R.A., Lucas B.A., Maquat L.E. // Science. 2016. V. 351. № 6274. P. aac7247.
- Ponicsan S.L., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2010. V. 20. № 2. P. 149–155.
- Vassetzky N.S., Ten O.A., Kramerov D.A. // Gene. 2003. V. 319. P. 149–160.
- Mariner P.D., Walters R.D., Espinoza C.A., Drullinger L.F., Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Mol. Cell. 2008. V. 29. № 4. P. 499–509.
- Allen T.A., Von Kaenel S., Goodrich J.A., Kugel J.F. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. № 9. P. 816–821.
- Espinoza C.A., Allen T.A., Hieb A.R., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. № 9. P. 822–829.
- Kassube S.A., Fang J., Grob P., Yakovchuk P., Goodrich J.A., Nogales E. // J. Mol. Biol. 2013. V. 425. № 19. P. 3639–3648.
- Wagner S.D., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Mol. Cell Biol. 2010. V. 30. № 1. P. 91–97.
- Kramerov D.A., Vassetzky N.S. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2011. V. 2. P. 772–786.
- Allen T.A., Von Kaenel S., Goodrich J.A., Kugel J.F. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. № 9. P. 816–821.
- Bladon T.S., Frégeau C.J., McBurney M.W. // Mol. Cell Biol. 1990. V. 10. № 8. P. 4058–4067.
- Espinoza C.A., Goodrich J.A., Kugel J.F. // RNA. 2007. V. 13. № 4. P. 583–596.
- Ponicsan S.L., Kugel J.F., Goodrich J.A. // Noncoding RNA. 2015. V. 1. P. 4–16.
- Sansó M., Fisher R.P. // Transcription. 2013. V. 4. № 4. P. 146–152.
- Wagner S.D., Yakovchuk P., Gilman B., Ponicsan S.L., Drullinger L.F., Kugel J.F., Goodrich J.A. // EMBO J. 2013. V. 32. № 6. P. 781–790.
- Flores R., Ruiz-Ruiz S., Serra P. // Semin Liver Dis. 2012. V. 32. № 3. P. 201.
- Буренина О.Ю., Елкина Д.А., Хартманн Р.К., Орецкая Т.С., Кубарева Е.А. // Биохимия. 2015. Т. 80. № 3. С. 1641–1661.
- Guiro J., O'Reilly D. // WIREs RNA. 2015. V. 6. № 1. P. 79–92.
- Kwek K.Y., Murphy S., Furger A., Thomas B., O'Gorman W., Kimura H., Proudfoot N.J., Akoulitchev A. // Nat. Struct. Biol. 2002. V. 9. № 11. P. 800–805.
- Leichter M., Marko M., Ganou V., Patrinoú-Georgoula M., Tora L., Guialis A. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1814. № 12. P. 1812–1824.
- Masters J.N., Attardi G. // Mol. Cell Biol. 1985. V. 5. № 3. P. 493–500.
- Blume S.W., Meng Z., Shrestha K., Snyder R.C., Emanuel P.D. // J. Cell Biochem. 2003. V. 88. № 1. P. 165–180.
- Martianov I., Ramadass A., Serra Barros A., Chow N., Akoulitchev A. // Nature. 2007. V. 445. № 7128. P. 666–670.
- Yang Z., Zhu Q., Luo K., Zhou Q. // Nature. 2001. V. 414. № 6861. P. 317–322.
- Nguyen V.T., Kiss T., Michels A.A., Bensaude O. // Nature. 2001. V. 414. № 6861. P. 322–325.
- Wei P., Garber M.E., Fang S.M., Fischer W.H., Jones K.A. // Cell. 1998. V. 20. № 4. P. 451–462.
- Jonkers I., Lis J.T. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2015. V. 16. № 3. P. 167–177.
- McNamara R.P., Bacon C.W., D'Orso I. // Cell Cycle. 2016. V. 15. № 16. P. 2115–2123.

48. Peterlin B.M., Brogie J.E., Price D.H. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2012. V. 3. № 1. P. 92–103.
49. Wassarman D.A., Steitz J.A. // Mol. Cell. Biol. 1991. V. 11. № 7. P. 3432–3445.
50. Gupta S., Busch R.K., Singh R., Reddy R. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. № 31. P. 19137–19142.
51. D'Orso I. // RNA Biol. 2016. V. 13. № 6. P. 545–553.
52. Quaresma A.J.C., Bugai A., Barboric M. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № 16. P. 7527–7539.
53. Liu W., Ma Q., Wong K., Li W., Ohgi K., Zhang J., Aggarwal A., Rosenfeld M.G. // Cell. 2013. V. 155. № 7. P. 1581–1595.
54. Karn J., Stoltzfus M.C. // Cold Spring Harb. Perspect Med. 2012. V. 2. № 2. P. a006916.
55. Tahirov T.H., Babayeva N.D., Varzavand K., Cooper J.J., Sedore S.C., Price D.H. // Nature. 2010. V. 465. № 7299. P. 747–751.
56. Zhou M., Halanski M.A., Radonovich M.F., Kashanchi F., Peng J., Price D.H., Brady J.N. // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 14. P. 5077–5086.
57. Krueger B.J., Varzavand K., Cooper J.J., Price D.H. // PLoS One. 2010. V. 5. № 8. P. e12335.
58. Ott M., Geyer M., Zhou Q. // Cell Host Microbe. 2011. V. 10. № 5. P. 426–435.
59. Ji X., Zhou Y., Pandit S., Huang J., Li H., Lin C.Y., Xiao R., Burge C.B., Fu X.D. // Cell. 2013. V. 153. № 4. P. 855–868.
60. Leygue E. // Nucl. Recept. Signal. 2007. V. 5. P. e006.
61. Liu C., Wu H.-T., Zhu N., Shi Y.-N., Liu Z., Ao B.-X., Liao D.-F., Zheng X.-L., Qin L. // Clin. Chim. Acta. 2016. V. 459. P. 137–146.
62. Caretti G., Schiltz R.L., Dilworth F.J., Di Padova M., Zhao P., Ogryzko V., Fuller-Pace F.V., Hoffman E.P., Tapscott S.J., Sartorelli V. // Dev. Cell. 2006. V. 11. № 4. P. 547–560.
63. Colley S.M., Leedman P.J. // Biochimie. 2011. V. 93. № 11. P. 1966–1972.
64. Lanz R.B., Razani B., Goldberg A.D., O'Malley B.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 25. P. 16081–16086.
65. Novikova I.V., Hennelly S.P., Sanbonmatsu K.Y. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. № 11. P. 5034–5051.
66. Sanbonmatsu K.Y. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1859. № 1. P. 41–45.
67. Jung E., Jang S., Lee J., Kim Y., Shin H., Park H.-S., Lee Y. // Mol. Biol. Rep. 2016. V. 43. № 10. P. 1019–1025.
68. Zhao X., Patton J.R., Ghosh S.K., Fischel-Ghodsian N., Shen L., Spanjaard R.A. // Mol. Endocrinol. 2007. V. 21. № 3. P. 686–699.
69. Ghosh S.K., Patton J.R., Spanjaard R.A. // Biochemistry. 2012. V. 51. № 41. P. 8163–8172.
70. McKay D.B., Xi L., Barthel K.K., Cech T.R. // J. Mol. Biol. 2014. V. 426. № 8. P. 1766–1785.
71. Hube F., Velasco G., Rollin J., Furling D., Francastel C. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. № 2. P. 513–525.
72. Tani H., Torimura M., Akimitsu N. // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. P. e55684.
73. Pickard M.R., Williams G.T. // Genes. 2015. V. 6. № 3. P. 484–499.
74. Yu X., Li Z. // Oncol Lett. 2015. V. 10. № 3. P. 1953–1958.
75. Mayama T., Marr A.K., Kino T. // Horm. Metab. Res. 2016. V. 48. № 8. P. 550–557.
76. Kino T., Hurt D.E., Ichijo T., Nader N., Chrousos G.P. // Sci. Signal. 2010. V. 3. № 107. P. ra8.
77. Pickard M.R., Williams G.T. // Oncotarget. 2016. V. 7. № 9. P. 10104–10116.
78. Guo C., Song W., Sun P., Jin L., Dai H. // J. Biomed. Sci. 2015. V. 22. P. 100.
79. Qian X., Xu C., Zhao P., Qi Z. // Virology. 2016. V. 492. P. 155–165.
80. Kuwabara T., Hsieh J., Nakashima K., Taira K., Gage F.H. // Cell. 2004. V. 116. № 6. P. 779–793.
81. Peyman J.A. // Biol. Reprod. 1999. V. 60. № 1. P. 23–31.
82. Shamovsky I., Ivannikov M., Kandel E.S., Gershon D., Nudler E. // Nature. 2006. V. 440. № 7083. P. 556–560.
83. Meng X., Li X., Zhang P., Wang J., Zhou Y., Chen M. // Brief Bioinform. 2017. V. 18. № 4. P. 547–557.
84. Li Z., Huang C., Bao C., Chen L., Lin M., Wang X., Zhong G., Yu B., Hu W., Dai L. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2015. V. 22. № 3. P. 256–264.
85. Chen L.L., Yang L. // Trends Cell Biol. 2017. V. 27. № 7. P. 480–490.
86. Zovoilis A., Cifuentes-Rojas C., Chu H.P., Hernandez A.J., Lee J.T. // Cell. 2016. V. 167. № 7. P. 1788–1802.

УДК 577.213/.217

Вклад рибосомного белка S1 в структуру и функцию Q β -репликазы

З. Ш. Кутлубаева, Е. В. Четверина, А. Б. Четверин*

Институт белка РАН, 142290, Московская обл., Пушкино, ул. Институтская, 4

*E-mail: alexch@vega.protres.ru

Поступила в редакцию 07.07.2016

Принята к печати 09.11.2016

РЕФЕРАТ Кристаллическая структура бактериальной рибосомы была решена с высоким разрешением более 10 лет назад, однако она не содержит информации о структуре самого большого рибосомного белка – S1. Этот необычный белок состоит из шести гибко сочлененных доменов, поэтому он не имеет фиксированной структуры, что мешает образованию кристаллов. Белок S1 является не только компонентом рибосомы, но и одной из четырех субъединиц Q β -репликазы – РНК-зависимой-РНК-полимеразы бактериофага Q β . Считалось, что в обоих случаях роль этого РНК-связывающего белка состоит в удержании матрицы вблизи активного центра фермента. В последние годы был совершен прорыв в исследовании белка S1 в составе Q β -репликазы. В частности, обнаружена его парадоксальная способность вытеснять РНК из репликазного комплекса и установлена кристаллическая структура его фрагмента, способного выполнять эту функцию. Новые результаты заставляют переосмыслить вклад белка S1 в структуру и функцию рибосомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаг Q β , инициация, кристаллическая структура, ОВ-домен, рибосомный белок S1, репликация РНК, РНК-зависимая-РНК-полимераза, терминация.

ВВЕДЕНИЕ

Находящийся на малой (30S) субчастице белок S1 не только является самым большим белком рибосомы *Escherichia coli*, но и имеет необычную структуру [1]. В то время как другие рибосомные белки формируют компактные глобулы [2, 3], белок S1 представляет собой гибкую цепь [4, 5], почти такую же длинную, как рибосома [1], и состоящую из шести структурно подобных звеньев [6], называемых ОВ-доменами (от Oligonucleotide/oligosaccharide Binding [7]).

Белок S1 жизненно важен для клетки, так как делеции или амбер-мутации его гена *rpsA* являются летальными [8, 9]. Однако точная функция белка S1 в рибосоме до сих пор не известна; не известно и то, как расположены в рибосоме его структурные звенья. Известно лишь, что N-концевой сегмент белка взаимодействует с белком S2, находящимся между головкой и платформой 30S субчастицы [10]. Не помогло прояснить ситуацию и решение кристаллической структуры рибосомы, так как удалось закристаллизовать лишь рибосомы, полностью лишенные белка S1 [3]. По-видимому, этот белок, не имеющий фиксированной конфигурации, мешает кристаллизации рибосом.

Не вызывает сомнений, что обладающий выраженными РНК-связывающими свойствами белок S1 важен для инициации трансляции [1, 11]. Но не менее очевидно и то, что стадией инициации участие белка S1 в трансляции не ограничивается, так как, в отли-

чие от факторов инициации, белок S1 присутствует в рибосоме в стехиометрических количествах и остается связанным с рибосомой во время элонгации синтезируемого полипептида [1].

Помимо собственно синтеза белка, белок S1 участвует в других процессах, происходящих в клетке – как на рибосоме, так и вне ее [11]. Одна из наиболее известных внерибосомных функций белка S1 – участие в синтезе РНК в виде α -субъединицы Q β -репликазы, РНК-зависимой-РНК-полимеразы бактериофага Q β . Помимо белка S1, Q β -репликаза содержит кодируемую геномом фага каталитическую β -субъединицу, а также факторы элонгации трансляции EF-Tu и EF-Ts (γ - и δ -субъединицы соответственно) [12]. Субъединицы β , γ и δ составляют кор Q β -репликазы, с которым белок S1 связан относительно слабо (как и с рибосомой [1]) и частично диссоциирует в процессе выделения фермента [13].

Исследование белка S1 в составе Q β -репликазы дало в последние годы результаты, позволяющие существенно продвинуться в понимании структуры и функции этого белка. Эти результаты и являются предметом настоящего обзора.

ДОМЕННАЯ СТРУКТУРА БЕЛКА S1

«Классический» ОВ-домен состоит из ≈ 70 аминокислотных остатков и представляет собой «бочонок», образованный пятью уложенными в виде греческого ключа β -тяжами и обычно прикрытый α -спиралью

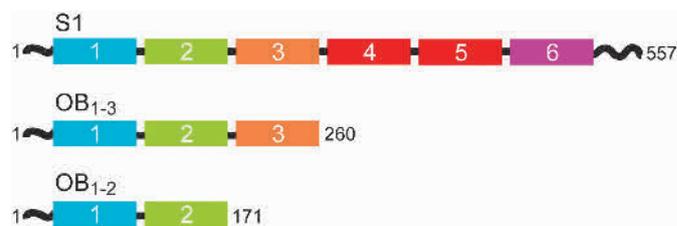
[7, 14]. ОВ-домены присутствуют в структуре многих белков, способных связывать полинуклеотиды и полисахариды [15]. Анализ аминокислотной последовательности [6] позволил сделать вывод, что в белке S1 присутствует шесть ОВ-доменов (рисунок). Последующие структурные исследования подтвердили этот вывод с одним уточнением: N-концевой ОВ-домен (ОВ₁) содержит не пять, а четыре β-тяжа [10, 16–18].

Название ОВ-домена предполагает, что он должен обладать сродством к полинуклеотидам. Действительно, показано, что домены ОВ₃–ОВ₆ обладают РНК-связывающими свойствами [1, 16, 19]. В то же время считалось, что домены ОВ₁ и ОВ₂ не способны связывать РНК, а вовлечены в белок-белковые взаимодействия, обеспечивающие связывание белка S1 с рибосомой и кором Qβ-репликазы [1]. Недавно было показано, что домены ОВ₁ и ОВ₂ действительно образуют контакты с кором Qβ-репликазы [17, 18]. Кроме того, домен ОВ₂ способен взаимодействовать с РНК благодаря высокой концентрации положительно заряженных остатков на участке поверхности, не вовлеченной в белок-белковые взаимодействия [18]. Таким образом, все пять классических ОВ-доменов белка S1 обладают РНК-связывающими свойствами.

Особая роль принадлежит N-концевому сегменту, предшествующему домену ОВ₁ и состоящему из 20 аминокислотных остатков. В несвязанном состоянии этот сегмент не имеет структуры [20], однако приобретает α-спиральную конфигурацию при взаимодействии с рибосомным белком S2 [10] и с кором Qβ-репликазы [17, 18], причем в последнем случае эта спираль на виток длиннее. По-видимому, N-концевая α-спираль вносит основной вклад во взаимодействие белка S1 с рибосомой [19]. Она также важна для взаимодействия белка S1 с кором Qβ-репликазы. Это следует как из кристаллографических данных [17, 18], так и из экспериментов по гель-фильтрации белковых комплексов. Оказалось, что выход комплекса белка S1 или его фрагмента с кором Qβ-репликазы резко падает, если эта спираль удалена (З.Ш. Кутлубаева, П. Северин и А.Б. Четверин, неопубликованные данные).

БЕЛОК S1 КАК ФАКТОР ТЕРМИНАЦИИ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Qβ-репликаза знаменита своей уникальной способностью быстро размножать РНК. Подобно ПЦР, реакция имеет экспоненциальную кинетику: и исходная матрица, и ее комплементарная копия служат матрицами в следующем цикле репликации; благодаря этому число матриц возрастает в каждом цикле вдвое до тех пор, пока репликаза остается в моляр-



Схематичное изображение доменной структуры белка S1 и его функциональных фрагментов. ОВ-домены показаны в виде нумерованных цветных прямоугольников, окрашенных в соответствии с работой [16], указаны также номера концевых аминокислотных остатков

ном избытке. Однако эта реакция, в отличие от ПЦР, изотермична: нет надобности повышать температуру для расплавления дуплекса, так как непосредственным продуктом реакции является одноцепочечная РНК. Как Qβ-репликазе удастся осуществлять копирование РНК по принципу комплементарности, но сохранять матрицу и растущую цепь одноцепочечными, остается одной из неразрешенных загадок репликации фага Qβ [12].

В 1972 году Ч. Вайсманн и сотр. опубликовали работу [21], в которой утверждалось, что белок S1 нужен Qβ-репликазе только для инициации копирования геномной (плюс) цепи РНК фага Qβ и не нужен для копирования других матриц репликазы, в том числе минус-цепи Qβ РНК и малых реплицирующихся РНК («6S» или RQ РНК, от Replicable by Qβ replicase). Вскоре первый автор этой работы опубликовал обзор, в котором, ссылаясь на свои неопубликованные результаты, утверждал, что белок S1 не нужен также и на стадиях элонгации и терминации минус-цепи, образующейся при копировании плюс-цепи Qβ РНК [22]. Этот взгляд на роль белка S1 в репликации РНК продержался в течение последующих 40 лет.

Свои результаты Вайсманн и сотр. получили в условиях, когда концентрации Qβ-репликазы и матрицы были близки, и экспоненциальный синтез РНК был невозможен. Мы обнаружили, что совсем другой результат получается в условиях большого избытка репликазы. Оказалось, что при этом белок S1 многократно стимулирует репликацию не только Qβ РНК, но и RQ РНК. Выяснилось, что в присутствии белка S1 большая часть продукта представлена одноцепочечной РНК, тогда как в его отсутствие – двухцепочечной [23]. Создавалось впечатление, что белок S1 помогает репликазе поддерживать одноцепочечное состояние матрицы и растущей цепи РНК благодаря известной способности связывать одиночные цепи РНК и расплавлять дуплексы [24].

Чтобы проверить это предположение, мы исследовали состояние РНК в процессе элонгации в присутствии и в отсутствие белка S1. В качестве матрицы использовали плюс-цепь Q β РНК длиной 4217 нуклеотидов, копирование которой при 30°C занимает около 4 мин. Чтобы исключить завышение количества двухцепочечной РНК в результате ее образования при денатурации репликативного комплекса [25], состояние РНК определяли до стадии фенольной экстракции как РНК, устойчивую к рибонуклеазе T1. Оказалось, что как в присутствии, так и в отсутствие белка S1 синтезируемая цепь остается одноцепочечной в течение всей элонгации и даже некоторое время по ее завершении. Однако если в присутствии белка S1 наблюдали быстрый выход одноцепочечного полноразмерного продукта из репликативного комплекса, то в отсутствие белка S1 синтезированная цепь оставалась связанной с репликативным комплексом. Со временем меньшая ее часть спонтанно покидала комплекс в одноцепочечном состоянии, а большая часть образовывала дуплекс с матрицей и приобретала устойчивость к рибонуклеазе [23].

Этот результат показал, что белок S1 катализирует выход одноцепочечного продукта из активного центра Q β -репликазы. Иными словами, он выполняет функцию фактора терминации. По-видимому, эту функцию белок S1 выполняет при размножении любой законной матрицы [26] Q β -репликазы. В результате, как исходная матрица, так и ее комплементарная копия оказываются доступными для копирования в следующем цикле репликации, что создает условия для экспоненциального размножения РНК.

ДВЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА S1 ИМЕЮТ РАЗНУЮ СТРУКТУРНУЮ ОСНОВУ

Таким образом, белок S1 выполняет при репликации Q β РНК две функции: функцию фактора терминации, общую для всех законных матриц, и ранее представлявшуюся единственной, специальную функцию, выполняемую только при инициации на плюс-цепи.

Проведенное нами прямое исследование скорости инициации на плюс-цепи Q β РНК показало, что потребность в белке S1 не является абсолютной. В буфере с низкой концентрацией соли (50 мМ NaCl) инициация в отсутствие белка S1 происходит почти так же хорошо, как и в его присутствии. Однако добавление 50 мМ (NH₄)₂SO₄ приводит к практически полному подавлению инициации в отсутствие белка S1 и только к двукратному торможению в его присутствии (инициация на других законных матрицах подавляется приблизительно вдвое независимо от присутствия белка S1) [23]. Таким же эффектом обладает добавление 100 мМ любого другого одно-

валентного катиона независимо от природы аниона (З.Ш. Кутлубаева, Е.В. Четверина и А.Б. Четверин, неопубликованные данные). В силу сказанного, функцию белка S1 на стадии инициации мы называем антисолевой. По-видимому, при размножении фага Q β в клетках *E. coli* антисолевая функция используется наряду с терминационной, так как цитоплазматическая концентрация одновалентных катионов даже превышает 150 мМ [27].

Чтобы выяснить, все ли домены белка S1 необходимы для выполнения его функций, мы клонировали и очистили фрагменты белка S1, содержащие разное число ОВ-доменов, начиная с N-конца (рисунки). Оказалось, что фрагмент ОВ₁₋₂ может заменить белок S1 на стадии терминации, а фрагмент ОВ₁₋₃ – в защите стадии инициации от соли [23].

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ КОРА Q β -РЕПЛИКАЗЫ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ БЕЛКА S1

Как и при исследовании рибосомы, отсутствие у белка S1 фиксированной конформации не позволяло получить кристаллы холофермента Q β -репликазы. Эту проблему удалось преодолеть после того, как обнаружили, что относительно короткие (и, следовательно, менее гибкие) фрагменты способны заменять белок S1 во всех его функциях [23]. Ранее две команды (датско-российская и японская) независимо друг от друга решили кристаллическую структуру кора Q β -репликазы [28, 29]. Недавно те же команды независимо решили структуру комплекса, содержащего кор репликазы и два первых ОВ-домена белка S1 [17, 18, 30]. Хотя японская команда исследовала кристаллы комплекса кора репликазы с фрагментом ОВ₁₋₃ [17], а датско-российская – с фрагментом ОВ₁₋₂ [18], в обоих случаях была получена равноценная структурная информация, так как третий ОВ-домен не виден, поскольку не фиксирован в структуре комплекса [17]. Помимо вклада в понимание механизма репликации РНК, эти работы интересны тем, что впервые установлена кристаллическая структура 1/3 молекулы рибосомного белка S1, причем именно той ее части, структура которой была наименее изучена.

Связывание доменов ОВ₁ и ОВ₂ почти не влияет на структуру кора Q β -репликазы. Эти домены взаимодействуют с β -субъединицей в районе домена «пальцев», который участвует в формировании активного центра репликазы, связывании РНК и разведении комплементарных цепей репликативного комплекса [28, 31]. N-Концевая α -спираль белка S1 находится между доменами ОВ₁ и ОВ₂ и образует ряд контактов с β -субъединицей и EF-Tu [18]. Эти контакты аналогичны тем, которые та же спираль образует с рибосомным белком S2 [10].

Хотя две группы исследователей приводят почти идентичные структурные данные [17, 18], они делают несколько разные выводы. Так, японская группа утверждает, что домены OB_1 и OB_2 не имеют на своей поверхности положительно заряженных и гидрофобных аминокислотных остатков, способных образовывать связи с фосфатами и азотистыми основаниями РНК, и поэтому не могут взаимодействовать с РНК [17]. Другая группа, напротив, указывает на существование протяженного участка поверхности домена OB_2 , несущего положительный заряд, и с помощью ЯМР выявляет способность этого домена связывать РНК [18].

ВКЛАД БЕЛКА S1 В ИНИЦИАЦИЮ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Эта функция аналогична той, которой обычно наделяют белок S1, рассматривая его роль в трансляции. Разница в том, что, стимулируя инициацию трансляции подавляющего большинства мРНК [1, 11], белок S1 стимулирует инициацию репликации только одной из многих матриц Q β -репликазы. В отличие от других матриц, инициация на плюс-цепи Q β РНК требует, чтобы репликаза связалась не только с 3'-концом, с которого начинается ее считывание, но и с «M-сайтом» – внутренним участком, отстоящим от 3'-конца матрицы на ≈ 1500 нуклеотидов. В отсутствие белка S1 репликаза не может связаться с M-сайтом [32]. По-видимому, белок S1 стимулирует инициацию на плюс-цепи Q β РНК, повышая сродство репликазы к M-сайту. В пользу этого говорит и тот факт, что инициация становится чувствительной к повышенной концентрации соли как в отсутствие белка S1 [23], так и в его присутствии при наличии определенных мутаций в M-сайте [33]. Способность фрагмента OB_{1-3} , но не OB_{1-2} заменять белок S1 в антисолевой функции означает, что третий OB-домен играет основную роль во взаимодействии с M-сайтом, а домены OB_1 и OB_2 нужны постольку, поскольку они формируют связь между доменом OB_3 и кором репликазы.

ВКЛАД БЕЛКА S1 В ТЕРМИНАЦИЮ РЕПЛИКАЦИИ РНК

Японская группа предложила механизм действия белка S1, в котором ключевая роль в инициации и терминеции принадлежит подвижному домену OB_3 , взаимодействующему на стадии инициации с M-сайтом плюс-цепи Q β РНК, а на стадии терминеции – с новосинтезированной цепью РНК [17, 34]. Хотя при этом авторы цитируют нашу статью [23], читали они ее, как видно, невнимательно, поскольку там прямо показано, что на стадии терминеции белок S1 может быть заменен фрагментом OB_{1-2} , в котором домен OB_3 отсутствует, а следовательно, играть ре-

шающую роль не может (как, впрочем, не заметили они и того факта, что в той же статье на полтора года раньше них продемонстрирована решающая роль домена OB_3 на стадии инициации).

В датско-российской работе показано, что область с высокой плотностью положительного заряда домена OB_2 непосредственно примыкает к подобной же области на поверхности β -субъединицы и образует с ней непрерывный положительно заряженный тракт, ведущий от отверстия, предназначенного для выхода синтезированной цепи из активного центра [18]. Вероятно, этот тракт существует для выхода синтезированной цепи из репликативного комплекса.

Однако детальный механизм терминеции предлагать еще рано, так как терминеция осуществляется в составе закрытой конформации Q β -репликазы [26], тогда как структура комплекса кора с фрагментом OB_{1-2} решена для открытой конформации. В этой связи отметим, что белок S1 катализирует терминецию, даже если он добавлен на стадии элонгации, но не после ее завершения [23]. Иными словами, где-то в конце стадии элонгации существует «точка невозврата», после которой белок S1 не может помочь выходу синтезированной цепи. Что это за точка?

В результате инициации на законной матрице с участием GTP Q β -репликаза переходит в закрытую конформацию, из которой ни матрица, ни ее комплементарная копия не могут диссоциировать пока не завершится элонгация [26]. Это обеспечивает высокую процессивность репликазы, но препятствует эвакуации ее активного центра по завершении синтеза копии. Чтобы обеспечить «рециклинг» фермента, необходимо осуществить обратный переход из закрытой конформации в открытую. Возможно, что этот переход индуцируется загадочным безматричным 3'-концевым аденилированием синтезированной цепи, которое предшествует ее терминеции [12] и представляет тот самый момент, до наступления которого белок S1 должен успеть встроиться в репликазу, чтобы выполнить функцию фактора терминеции.

В заключение отметим, что обнаружение способности белка S1 удалять РНК из комплекса изменяет базовую парадигму, согласно которой назначение этого белка состоит в удержании РНК вблизи активного центра фермента, будь то репликаза или рибосома [1], и заставляет переосмыслить возможную роль белка S1 в трансляции и иных клеточных процессах. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 14-14-00350).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Subramanian A.R. // *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 1983. V. 28. P. 101–142.
2. Spirin A.S., Serdyuk I.N., Shpungin J.L., Vasiliev V.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 10. P. 4867–4871.
3. Schuwirth B.S., Borovinskaya M.A., Hau C.W., Zhang W., Vila-Sanjurjo A., Holton J.M., Cate J.H. // *Science.* 2005. V. 310. № 5749. P. 827–834.
4. Chu Y.G., Cantor C.R. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. № 6. P. 2363–2379.
5. Moore P.B., Laughrea M. // *Nucl. Acids Res.* 1979. V. 6. № 6. P. 2355–2361.
6. Gribskov M. // *Gene.* 1992. V. 119. № 1. P. 107–111.
7. Murzin A.G. // *EMBO J.* 1993. V. 12. № 3. P. 861–867.
8. Kitakawa M., Isono K. // *Mol. Gen. Genet.* 1982. V. 185. № 3. P. 445–447.
9. Sorensen M.A., Frick J., Pedersen S. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 280. № 4. P. 561–569.
10. Byrgazov K., Grishkovskaya I., Arenz S., Coudevylle N., Temmel H., Wilson D.N., Djinovic-Carugo K., Moll I. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 1. P. 661–673.
11. Hajsndorf E., Boni I.V. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 7. P. 1544–1553.
12. Четверин А.Б. // *Молекуляр. биология.* 2011. Т. 45. № 1. С. 160–172.
13. Blumenthal T. // *Methods Enzymol.* 1979. V. 60. P. 628–638.
14. Bycroft M., Hubbard T.J., Proctor M., Freund S.M., Murzin A.G. // *Cell.* 1997. V. 88. № 2. P. 235–242.
15. Draper D.E., Reynaldo L.P. // *Nucl. Acids Res.* 1999. V. 27. № 2. P. 381–388.
16. Salah P., Bisaglia M., Aliprandi P., Uzan M., Sizun C., Bontems F. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 16. P. 5578–5588.
17. Takeshita D., Yamashita S., Tomita K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 16. P. 10809–10822.
18. Gytz H., Mohr D., Seweryn P., Yoshimura Y., Kutlubaeva Z., Dolman F., Chelchessa B., Chetverin A.B., Mulder F.A., Brodersen D.E., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 22. P. 10893–10906.
19. Aliprandi P., Sizun C., Perez J., Mareuil F., Caputo S., Leroy J.L., Odaert B., Laalami S., Uzan M., Bontems F. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 19. P. 13289–13301.
20. Giraud P., Crechet J., Uzan M., Bontems F., Sizun C. // *Biomol. NMR Assign.* 2015. V. 9. № 1. P. 107–111.
21. Kamen R., Kondo M., Römer W., Weissmann C. // *Eur. J. Biochem.* 1972. V. 31. № 1. P. 44–51.
22. Kamen R. // *RNA Phages.* / Ed. Zinder N.D. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1975. P. 203–234.
23. Vasilyev N.N., Kutlubaeva Z.S., Ugarov V.I., Chetverina H.V., Chetverin A.B. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1781.
24. Kolb A., Hermoso J.M., Thomas J.O., Szer W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 6. P. 2379–2383.
25. Feix G., Slor H., Weissmann C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967. V. 57. № 5. P. 1401–1408.
26. Ugarov V.I., Demidenko A.A., Chetverin A.B. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 45. P. 44139–44146.
27. Richey B., Cayley D.S., Mossing M.C., Kolka C., Anderson C.F., Farrar T.C., Record M.T., Jr. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 15. P. 7157–7164.
28. Kidmose R.T., Vasiliev N.N., Chetverin A.B., Andersen G.R., Knudsen C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 24. P. 10884–10889.
29. Takeshita D., Tomita K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 36. P. 15733–15738.
30. Olesen H., Knudsen C., Seweryn P., Brodersen D., Kutlubaeva Z., Chetverin A., Mulder F., Jensen L., Yoshimura Y. // *Acta Cryst.* 2014. V. A70. C1602.
31. Takeshita D., Tomita K. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 2. P. 229–237.
32. Meyer F., Weber H., Weissmann C. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 153. № 3. P. 631–660.
33. Schuppli D., Miranda G., Qiu S., Weber H. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 283. № 3. P. 585–593.
34. Tomita K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. № 9. P. 15552–15570.

УДК 577.2

Поддержание стабильности генома у *Heterocephalus glaber*

И. О. Петрусева¹, А. Н. Евдокимов¹, О. И. Лаврик^{1,2,3*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1³Алтайский государственный университет Министерства образования и науки РФ, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

*E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 11.05.2017

Принята к печати 30.08.2017

РЕФЕРАТ *Heterocephalus glaber* (голый землекоп) – одна из перспективных моделей для изучения функционирования систем поддержания стабильности генома, в том числе и за счет эффективной репарации повреждений ДНК. *H. glaber* отличается высокой продолжительностью жизни, повышенной устойчивостью к раковым заболеваниям и рядом других уникальных фенотипических черт. На протяжении по крайней мере 80% жизни это животное не проявляет признаков старения и сохраняет способность к размножению. *H. glaber* привлекает большое внимание исследователей, занятых изучением молекулярных основ высокой продолжительности жизни и устойчивости к развитию опухолей. Несмотря на то что *H. glaber* обитает в условиях постоянного генотоксического (окислительного и др.) стресса, его геном и протеом отличаются стабильностью и эффективностью функционирования. В соматических клетках *H. glaber* отсутствует «репликативное» старение, при этом в фибробластах существует дополнительный p53/pRb-зависимый механизм раннего контактного торможения, контролирующей пролиферацию клеток, а также механизм их *arf*-зависимого старения. Уникальные фенотипические черты и выявленные особенности функционирования генома, транскриптома и протеома, присущие *H. glaber*, указывают на высокую прочность и эффективное функционирование молекулярных машин, противостоящих накоплению повреждений в его геноме. В представленном обзоре проанализированы результаты изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе высокой продолжительности жизни *H. glaber* и его способности сопротивляться развитию опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Heterocephalus glaber*, онкоустойчивость, стабильность генома и протеома, репарация ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОП – окислительные повреждения; GPX1 – глутатионпероксидаза; GSH – восстановленный глутатион; PКТ – раннее контактное торможение; HA – гиалуроновая кислота; HAS2 – гиалуронсинтаза 2; PАРР – поли(ADP-рибоза)-полимераза; PARG – поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза.

ВВЕДЕНИЕ

Повреждения ДНК, обусловленные воздействием внешних факторов и нормальных метаболических процессов, возникают с частотой от 1000 до 1 млн на клетку живого организма в день [1]. В результате поврежденным оказывается всего 0.00017% человеческого генома, состоящего из 3 млрд п. н., однако повреждение критически важных генов (таких, как гены белков-супрессоров опухолей) может приводить к серьезным нарушениям в функционировании клеток. Эффективная работа систем репарации ДНК, противостоящих накоплению повреждений, вносит существенный вклад в поддержание стабильности генома, которое является одной из критически

важных функций клетки. Накопление повреждений ДНК и мутаций увеличивает риск развития рака и связано со старением [2–4]. У человека дефекты в работе систем репарации ДНК ассоциированы с рядом генетически обусловленных заболеваний [1–4]. Кроме того, высокая консервативность путей репарации позволяет считать эффективность работы систем, отвечающих за удаление повреждений из ДНК, одной из основ долголетия [2–7]. Количество экспериментальных исследований, посвященных поиску корреляции между активностью систем репарации ДНК и максимальной продолжительностью жизни, невелико [8, 9]. Сложность подобных исследований и противоречивые результаты, получаемые при их

проведении, могли быть следствием как несовершенства методов оценки активности, так и некорректного выбора модельных систем [10].

В качестве одной из перспективных моделей для исследования функционирования систем поддержания стабильности генома, в том числе и за счет эффективной репарации повреждений ДНК, интерес представляет голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). *H. glaber* – обитающее в норах на Юго-Востоке Африки (Эфиопия, Кения, Сомали) экстремально долго живущее мелкое млекопитающее, немногим превышающее по размерам мышь. Около 60 зоопарков мира, а также ряд лабораторий содержат колонии *H. glaber*. Это один из примерно 50 известных обитающих под землей травоядных грызунов, который является представителем исключительно редких истинно эусоциальных млекопитающих [11]. На фоне повышенного интереса к *H. glaber* журнал Science в 2013 году назвал его «позвоночным года». Продолжительность жизни *H. glaber* может достигать 32 лет, что в 10 раз больше, чем у мыши. Большую часть жизни (не менее 80%) это животное не имеет признаков старения и сохраняет способность к размножению [12–14], а механизмы защиты от раковых заболеваний, в том числе индуцированных [15], у него работают очень эффективно. В 2016 году впервые были зарегистрированы единичные случаи развития опухолей у содержащихся в неволе особей [16]. *H. glaber* привлекает большое внимание научного сообщества, вовлеченного в изучение молекулярных основ высокой продолжительности жизни и устойчивости к развитию опухолей.

Заметное продвижение в этом направлении обеспечили исследования, выполненные с использованием созданных в лабораториях линий клеток *H. glaber*, а также биоинформатических и «омиксных» подходов [17–21]. Были открыты уникальные особенности процессов метаболизма *H. glaber* и их регуляции.

В данном обзоре мы попытались проанализировать результаты этих исследований, а также работ, выполненных с применением биохимических и молекулярно-генетических подходов, с целью составить представление о возможных особенностях работы систем репарации ДНК у *H. glaber*.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНОМА И ТРАНСКРИПТОМА *H. glaber* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОИНФОРМАТИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ

Развитие методов высокоэффективного полногеномного секвенирования предоставило беспрецедентную возможность выявления генетических отличий *H. glaber*, лежащих в основе его уникальных черт. Анализ данных, полученных при первом секвени-

ровании генома *H. glaber*, позволил обнаружить ряд характерных и важных особенностей, в частности, черты, говорящие о его повышенной стабильности [17]. Позже была получена и проанализирована еще одна версия генома [18] и создан web-портал Naked Mole Rat Genome Resource (<http://www.nakedmole-rat.org>). Сравнительный анализ полных транскриптомов *H. glaber* и мыши выявил существенно более высокую транскрипционную активность некоторых генов *H. glaber*. В основном, это гены, ассоциированные с окислением-восстановлением и функционированием митохондрий. Обнаружено рекордное 300- и 140-кратное повышение уровня экспрессии генов *Ercat* и *A2m*, кодирующих внеклеточные белки. Уровни экспрессии генов, кодирующих белки репарации, у мыши и *H. glaber* различались не столь существенно [19].

Первые результаты глубокого (98.6%) секвенирования генома самца *H. glaber* были опубликованы в 2011 году [17]. Тогда же появились данные о различиях в уровне экспрессии митохондриальных генов и генов, имеющих отношение к окислительно-восстановительной системе, у *H. glaber* и мыши [19]. На основе результатов секвенирования были предсказаны последовательности 22000 генов *H. glaber*. Анализ синтетических областей хромосом *H. glaber* и человека позволил идентифицировать у *H. glaber* 750 приобретенных и 320 утраченных генов; 739 приобретенных и 448 утраченных генов выявлено у *H. glaber* при сравнении с мышью. Среди приобретенных генов 75.5% транскрибируются, а список утраченных включает много генов, имеющих отношение к функционированию рибосом и путям биосинтеза нуклеозидов. Среди псевдогенов у *H. glaber* преобладают гены, связанные со зрительной системой, обонянием, сперматогенезом и убиквитинированием белков [17]. Превращение этих генов в псевдогены (нефункциональные гены) коррелирует с ослабленными или подавленными у *H. glaber* физиологическими функциями [13] и к менее интенсивному, чем у мыши, накоплению убиквитинированных белков с возрастом [22].

С использованием GATK (Genome Analysis Toolkit, <https://software.broadinstitute.org/gatk/>) идентифицировано также 1.87 млн гетерозиготных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Значение нуклеотидного разнообразия составило 7×10^{-4} (среднее на нуклеотид), что гораздо ниже, чем в популяциях мыши или крысы и сравнимо с изменчивостью у человека. Низкий уровень изменчивости может отражать низкий эффективный размер популяции *H. glaber*, но может быть связан с высоким уровнем инбридинга, сниженной скоростью мутаций или высокой эффективностью работы систем репарации ДНК [17].

Предполагается, что со стабильностью генома коррелирует пониженное содержание транспозонов. Согласно [17] только 25% генома *H. glaber* представлено повторами, происходящими из транспозонов (у человека – 40%, у мыши – 37%, у крысы – 35%).

В число генов, подвергнутых действию положительного отбора, у землекопа, в отличие от крысы и мыши, входят *Terp1* и *Terf1*, вовлеченные в регуляцию длины теломер [23]. Длина теломер *H. glaber* невелика, они короче, чем у лабораторных мышей или крыс, и имеют примерно такую же длину, как теломеры человека. Ген *Tert*, кодирующий каталитическую субъединицу теломеразы, стабильно экспрессируется в соматических клетках *H. glaber* в любом возрасте. Активность теломеразы при этом невысока. В результате сравнительного исследования пришли к заключению, что между уровнями экспрессии теломеразы и размерами грызунов существует обратная корреляция, тогда как не найдено корреляции между длиной теломер и продолжительностью жизни [21, 24, 25]. Недавно выполненное детальное сравнение структуры генов теломеразной РНК (*hgTerc*) *H. glaber* и других видов выявило два основных отличия. Это замена А → G в первой петле псевдоузла P2b-p3, что соответствует нуклеотиду 111 в теломеразной РНК человека, и замена G → A в домене CR7-r8b (соответствует нуклеотиду 421 *hTERC*). В промоторных участках гена *hgTerc* идентифицированы два сайта связывания факторов транскрипции: сайт взаимодействия с факторами семейства ETS, найденный в промоторных участках всех проанализированных генов, и сайт связывания фактора SOX17, уникальный для гена *H. glaber*. Еще одной отличительной чертой гена *Terc* *H. glaber* оказалось отсутствие одного из сайтов связывания Sp1 [26]. Таким образом, ген *Terc* *H. glaber* имеет уникальный полиморфизм и структуру промоторов.

Как показали результаты секвенирования РНК, выделенных из мозга, печени и почек новорожденного, молодого (4 года) и старого (20 лет) *H. glaber*, лишь у малого числа генов уровень экспрессии с возрастом изменялся. В мозге человека в процессе старения падал уровень экспрессии 33 генов, а у 21, наоборот, возрастал [27]. У *H. glaber* уровень экспрессии 32 из этих генов не изменялся существенно с возрастом: у 30 генов он был стабильным, и только у двух генов (*Cyp46a1* и *Smad3*) он несколько возрастал [17]. Транскрипционная активность этих генов человека с возрастом снижалась [27].

Также был выполнен биоинформатический анализ 39 генов *H. glaber*, кодирующих ряд белков, ассоциированных с G1/S-переходом, термогенезом и зрением, в том числе циклин E1 (*Ccne1*), белок UCP1 (*Ucp1*) и гамма-кристаллин (γ -crystallin), а также генов,

кодирующих белки, непосредственно участвующие в процессах метаболизма ДНК: мультифункциональный белок репарации оснований AP-эндонуклеазу APE1, большую субъединицу фактора репликации/репарации RFC1 и топоизомеразу TOP2A. TOP2A контролирует топологию ДНК во время транскрипции и наряду с TERP1 и TERF1 является частью комплекса пяти белков альтернативного пути удлинения теломер. В результате сравнения с ортологами, представленными в геномах 36 млекопитающих, в генах *H. glaber* были найдены отличия, говорящие о присутствии 45 уникальных замен аминокислотных остатков в соответствующих белках [17].

Таким образом, первое предпринятое секвенирование [17] позволило выявить важные особенности генома *H. glaber*, хотя некоторые результаты позже уточнялись и пересматривались [18, 28, 29]. Так безволосый фенотип *H. glaber* был объяснен замещением консервативного аминокислотного остатка в белке, ассоциированном с ростом волос (HR) [17]. Такая интерпретация была основана на том, что подобные мутации в данном кодоне приводят к потере волосяного покрова у мыши, крысы и человека. Однако два других грызуна – дамараландский пескорой и морская свинка, также содержат эту мутацию в гене *Hr*, но имеют волосяной покров [29]. По-видимому, различия между генами *Hr* *H. glaber* и мыши/человека скорее отражают филогенетическую дивергенцию от мыши до человека [29, 30]. Отличия в структуре HAS2 (гиалуронсинтаза 2) *H. glaber* связывают с исключительной устойчивостью *H. glaber* к раку [31]. Однако некоторые из предположительно важных мутаций, найденных в гене, кодирующем Has2, одинаковы у нескольких видов, включая морскую свинку. Эти мутации не всегда ассоциированы с онкоустойчивостью, их функциональные последствия скорее неизвестны [32]. Интересно, что высокомолекулярные гиалуронаны синтезируются также у онкоустойчивого долгоживущего землекопа *Spalax galili*, однако его геном не содержит ни одной из мутаций, отнесенных к ключевым у *H. glaber* [33, 34]. Кроме того, под вопросом остается вывод [17] о пониженном содержании источника нестабильности – транспозонов – в геноме *H. glaber* по сравнению с мышью и человеком [28].

Сравнительный анализ группы генов, участвующих в поддержании стабильности генома у человека, мыши и землекопа, показал, что для генома *H. glaber* не характерно повышение числа копий генов [20]. В то же время ген *Cebpg*, кодирующий фактор транскрипции, участвующий в регуляции процессов репарации, представлен тремя копиями, ген *Tinf2* компонента шелтеринового комплекса – двумя. Кроме того, у *H. glaber* и человека, в отличие от мыши, в геноме

найден ген *Rpa4*, кодирующий аналог второй субъединицы белка RPA, состоящего из трех субъединиц (RPA1, RPA2 и RPA3) и участвующего во многих процессах, связанных с превращениями ДНК. Ранее полноразмерные кодирующие последовательности этого гена были обнаружены только у приматов и лошади [35]. Белки RPA4 и RPA2 могут экспрессироваться одновременно, а соотношение их количества зависит от типа ткани. Гетеротример α RPA (альтернативный RPA, содержащий субъединицу RPA4 вместо RPA2) не способен поддерживать репликацию SV40 (распространенная модель для изучения процесса репликации *in vitro*), но имеет повышенное сродство к поврежденной ДНК, участвует в репарации, а также в активации процесса контроля клеточного цикла (стадии G2/M) [36–38].

Возросшее качество аннотаций генома позволило по результатам следующего секвенирования идентифицировать ~1800 некодирующих, ~42000 кодирующих участков ДНК и примерно столько же белков. В результате у *H. glaber* выявлен ряд особенностей в последовательностях генов, связанных с противостоянием канцерогенезу и старению [18]. Выявлены уникальные замены во фрагменте гена *p53*, который кодирует участок, участвующий в регуляции апоптоза, и в генах рецепторов гиалуронана CD44 и HMMR. Кроме того, *p53 H. glaber* содержит мотивы PXXP (P – пролина, X – любая другая аминокислота), аналогичные PXXP *p53* человека.

Исследование геномов и транскриптомов девяти видов африканских голых землекопов показало, что у этих видов положительной селекции подвержены гены, связанные с супрессией опухолей, регуляцией теломера, делением клеток, репарацией ДНК и ответом на воздействие стресса [30].

Современные биоинформатические подходы позволяют проводить полноценное направленное сравнение транскриптомов групп генов у различных видов животных. Известно, что печень – орган с высоким уровнем окислительного метаболизма и большим количеством спонтанно возникающих повреждений. Направленное сравнение уровней экспрессии генов, кодирующих белки репарации, в тканях печени долгоживущих видов (человека и *H. glaber*) и короткоживущей мыши было проведено в работе [39]. Сравнение выборки из 130 генов выявило более высокую транскрипционную активность этих генов у долгоживущих видов. Среди 12 генов, уровень экспрессии которых не менее чем в 2 раза повышен и у человека, и у *H. glaber*, есть и ген опухолевого супрессора *p53*, важнейшего регулятора эксцизионных путей репарации. Повышен уровень экспрессии генов, кодирующих белки «мисматч» репарации (MSH3) и репарации оснований – ДНК-гликозилазы

(MUTYH, MBD4, NEIL1, NEIL2 и TDG), белки, участвующие в негомологичной рекомбинации (NHEJ1, Ku70, ДНК-полимеразы λ – POLL и κ – POLK), а также убиквитинлигазу UBE2N.

Большинство генов, кодирующих белки репарации, экспрессируются конститутивно и регулируются посттранскрипционными модификациями. Тем не менее, транскрипция некоторых генов этой группы индуцируется именно при генотоксическом стрессе, в том числе генов, кодирующих ключевые белки системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER): DDB1, DDB2, ERCC1, XPC, ERCC4 (XPF) и ERCC5 (XPG) [40]. С использованием специализированного алгоритма для сигнальных путей [41] показано, что у долгоживущих видов на генотоксическое воздействие более интенсивно реагируют пути, контролируемые ATM, BRCA1, *p53* и PTEN [39].

РАННЕЕ КОНТАКТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ

Опубликовано большое количество результатов изучения биохимических особенностей *H. glaber* с целью поиска механизмов, лежащих в основе реализации необычных фенотипических признаков *H. glaber*, в том числе устойчивости к раку. Один из таких механизмов – уникальная система раннего контактного торможения (early contact inhibition) роста клеток *H. glaber*, открытая в 2009 году [31].

Контактное торможение – ключевой механизм, блокирующий деление клеток при достижении культурой клеток плотности, при которой они начинают контактировать друг с другом или с внеклеточным матриксом [42]. У человека и мыши регулярное контактное торможение управляется мембранными белками и происходит при повышении уровня экспрессии ингибитора циклинзависимой киназы (CDK) *p27^{Kip1}*. *P27^{Kip1}* связывает комплексы циклин-CDK и останавливает клетки в фазе G1 клеточного цикла. Ключевые онкосупрессорные пути, пути Rb и *p53*, активируются продуктами генов *Ink4a* и *Arf* [43–46]. Белок *p16^{INK4a}* – продукт гена *Ink4a*, связывается с CDK 4/6 и ингибирует ее, что, в свою очередь, приводит к активации Rb [43]. Продукт гена *Arf* активирует *p53*, связывая и ингибируя белок MDM2. Таким образом, гены *Ink4a* и *Arf* играют критическую роль в старении и защите от рака [44–48].

Для фибробластов *H. glaber* не характерно репликативное старение, но в культуре они растут медленно и прекращают рост (деление) при низкой плотности, демонстрируя гиперчувствительность к появлению межклеточных контактов. Показано, что в этих клетках существует дополнительный механизм, контролирующий пролиферацию, названный «ранним контактным торможением» (PKT). Первоначально предполагалось, что PKT у *H. glaber*

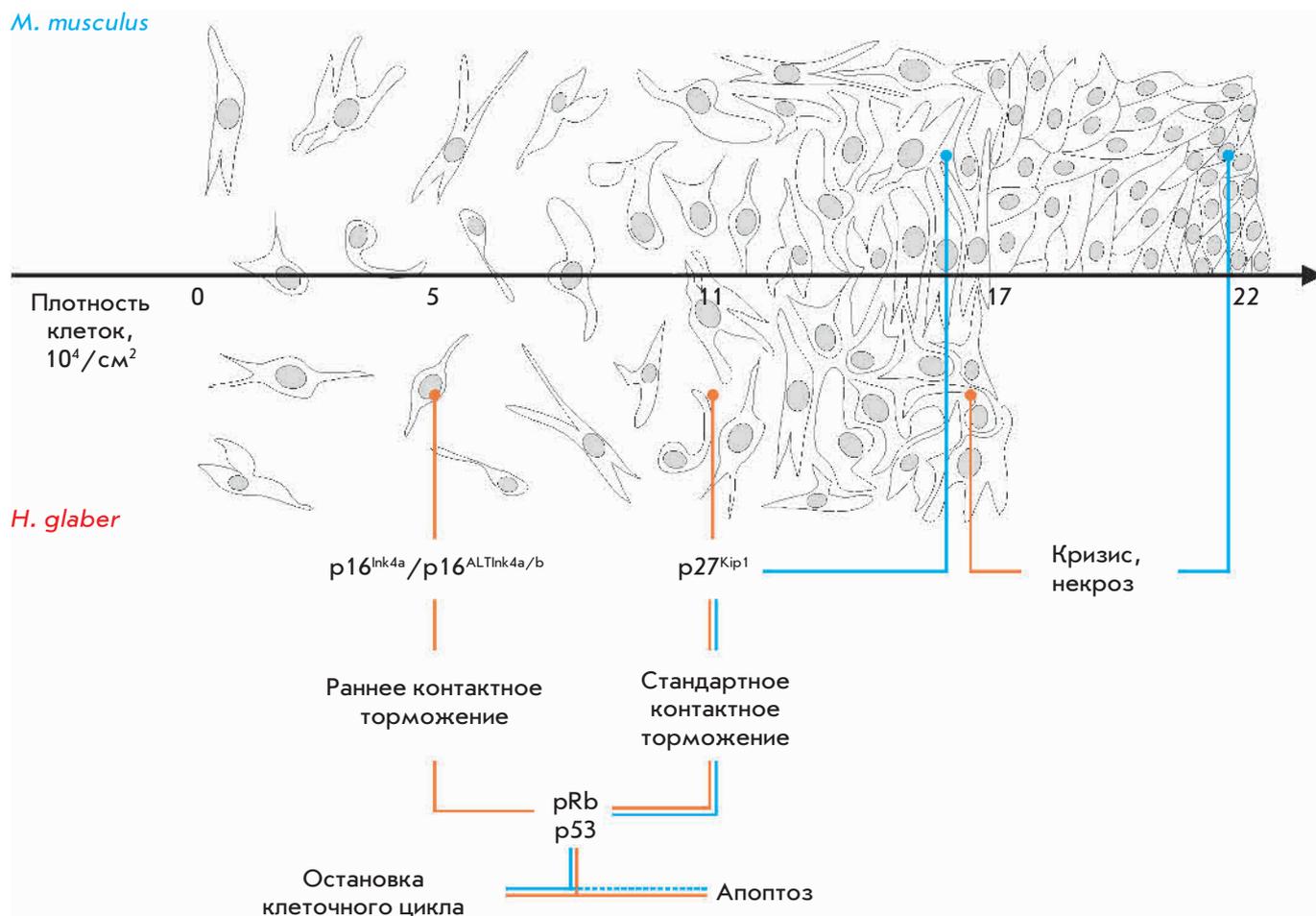


Рис. 1. Двухуровневое контактное торможение характерно для *H. glaber*, в отличие от одноуровневого у мыши. На основе данных, представленных в работах [31, 49]

ассоциировано, прежде всего, с повышенными уровнями белка $p16^{\text{INK4a}}$ [31]. Основанием для такого предположения послужил тот факт, что в мутантных клетках *H. glaber* SFMut, спонтанно образующихся в процессе длительного культивирования и утративших способность к раннему контактному торможению, $p16^{\text{INK4a}}$ не экспрессируется. С использованием рекомбинантных ДНК (плазмид), несущих гены, кодирующие мутантные формы большого Т-антигена SV40, инактивирующие либо $p53$ (LTK1; pSG5 LTK1), либо pRb (LTKΔ434-444, pSG5 LTKΔ434-444), либо ген белка дикого типа (wtLT; pSG5 LT), который подавляет активность и $p53$, и pRb , показано, что, в отличие от фибробластов мыши, способность фибробластов *H. glaber* к РКТ после трансфекции такими ДНК снижается в том случае, когда подавлена активность обоих белков-супрессоров. Возможность стандартного контактного торможения, в котором участвует $p27^{\text{Kip1}}$, лишь дублирует РКТ, проис-

ходящее при посредстве ингибитора киназ $p16^{\text{INK4a}}$ [31]. Позже с использованием данных секвенирования РНК показали, что в культивируемых клетках и тканях *H. glaber* при экспрессии продукта альтернативного сплайсинга генов $p15a$, $p15b$ и Arf локуса *Ink* появляется белок, названный $p\text{ALTINK4a/b}$. У мыши и человека белок $p\text{ALTINK4a/b}$ не выявлен. Экспрессия $p\text{ALTINK4a/b}$ индуцируется при РКТ и действии стрессов, таких, как УФ- или ионизирующее излучение, потеря прикрепления к субстрату и экспрессия онкогенов. Кроме того, $p\text{ALTINK4a/b}$ более эффективно индуцирует остановку клеточного цикла, давая клеткам больше времени на то, чтобы справиться с последствиями генотоксического воздействия, в том числе на репарацию повреждений ДНК до начала репликации. Двухуровневое контактное торможение, характерное для клеток *H. glaber* (в отличие от мыши и человека), может способствовать поддержанию стабильности его генома [49] (рис. 1).

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ГИАЛУРОНОВАЯ КИСЛОТА И ОНКОТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК *H. glaber*

В соответствии с данными [32], раннее контактное торможение связано с сверхвысокомолекулярными (6–12 МДа) гиалуронанами (НА, hyaluronic acid), которые синтезируются в тканях и клетках *H. glaber* и выделяются во внеклеточное пространство. Ранее этот полисахарид был более известен как компонент внеклеточного матрикса, связанный с воспалением и раком. Фрагменты НА разной молекулярной массы выполняют разные функции: молекулы среднего размера (30–500 кДа) могут стимулировать деление клеток, а меньшего (< 50 кДа) – их миграцию. Короткие фрагменты НА связываются с рецепторами НА, такими, как CD44 и HMMR, индуцируют воспаление и активируют сигнальные пути, которые способствуют выживанию, миграции и инвазии как опухолевых, так и нормальных клеток. В нормальных биологических жидкостях человека присутствуют НА 1–8 МДа [50, 51]. У *H. glaber* накопление молекул со сверхвысокой молекулярной массой происходит благодаря низкой активности его гиалуронидазы и высокой процессивности гиалуронансинтазы 2 (HAS2), обладающей особой структурой активного центра. Синтезу сверхвысокомолекулярных полимеров НА способствует замена в HAS2 остатков аспарагина в позициях 188 и 301 на серин. Нарушения в работе сигнальных путей, снимающие ограничения для начала онкотрансформации фибробластов мыши, не приводят к трансформации клеток *H. glaber*. Если синтез высокомолекулярной НА остановлен в результате нокдауна HAS2 или происходит быстрая деградация НА в результате повышенного уровня экспрессии гиалуронидазы, то клетки *H. glaber* становятся доступными для трансформации [32].

РАННЕЕ КОНТАКТНОЕ ТОРМОЖЕНИЕ И НОВЫЙ ТИП СТАРЕНИЯ В КЛЕТКАХ *H. glaber* – «ИНДУЦИРОВАННОЕ СУПРЕССИЕЙ *Arf* СТАРЕНИЕ»

Открытый в 2009 году феномен раннего контактного торможения роста фибробластов *H. glaber* продолжает привлекать внимание исследователей. Помимо недавно обнаруженного белка pALTINK4a/b, продукта экспрессии альтернативно сплайсированной формы *Ink4*, участвующего в РКТ [49], был открыт еще один новый, специфичный для клеток *H. glaber* эффект – старение, индуцированное супрессией *Arf*. С использованием классических процедур клонирования и последующего секвенирования по Сэнгеру были определены кодирующие последовательности генов *Ink4a* и *Arf* *H. glaber*, получены лентивирусные конструкции, содержащие эти гены, и высокоспецифичные поликлональные антитела к соответствующим

белкам. Было показано, что в фибробластах *H. glaber* после повреждающих ДНК воздействий или после серии пассажей активируется эндогенная экспрессия *Ink4a* и *Arf* [52]. Повышение уровня экспрессии *Ink4a* или *Arf* вызывало остановку клеточного цикла в фибробластах *H. glaber*. Таким образом, экспериментально доказано, что консервативную функцию ингибиторов клеточного цикла у *H. glaber* выполняют гены, участвующие в создании эффекта раннего контактного ингибирования [52]. Эти результаты использовали при изучении механизмов, которые подавляют развитие опухолей из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток *H. glaber* (induced pluripotent stem cells, iPSCs) [53]. «Опухолеродность» iPSCs была проверена по способности формировать тератомы. Показано, что iPSCs *H. glaber*, подсаженные (привитые) в яички мыши, в отличие от множества других стволовых клеток, не образуют тератом, т.е. не являются опухолеродными. Это уникальное свойство базируется на видоспецифичной активации онкосупрессорного гена *Arf* и супрессорной мутации со сдвигом рамки считывания в экспрессируемом стволовыми клетками онкогене *RAS* (*ERAS*). Повышение уровня экспрессии гена *Arf* в iPSCs мыши заметно снижало их склонность к образованию опухолей. Найден связанный с клетками *H. glaber* механизм, который может защищать iPSCs и соматические клетки от супрессии *Arf* и, как следствие, образования опухолей. Показано также, что в iPSCs *H. glaber* осуществляется особый тип старения – «индуцированное супрессией *Arf* старение» (*Arf* suppression-induced senescence). Специфичное для *H. glaber* *Arf*-зависимое старение может действовать как второй способ защиты, индуцирующий старение (и последующую гибель) клеток путем подавления экспрессии *Arf* в клетках, в которых этот ген был де-репрессирован воздействием стрессоров [53].

АПОПТОЗ

Апоптоз – один из механизмов сопротивления онкотрансформации клеток. Способность клеток *H. glaber* вступать в апоптоз в ответ на генотоксические воздействия к настоящему моменту изучена недостаточно. При изучении механизма РКТ было показано, что уровень спонтанного апоптоза в фибробластах *H. glaber* невысок, он не превышает 7% у фибробластов кожи и 15% – у культуры легочных фибробластов и отличается особым типом регуляции [31]. Примерно двукратное повышение количества апоптотических клеток в этих культурах происходило после трансфекции плазмидами, несущими гены, кодирующие мутантные формы большого Т-антигена SV40, pSG5 LTK1 и pSG5 LTΔ434–444. Трансфекция культур фибробластов *H. glaber* плазмидой pSG5 LT,

несущей ген дикого типа, приводила к падению числа апоптотических клеток ниже контрольного уровня. При этом фибробласты мыши не давали выраженных ответов на такие воздействия [31]. Известно, что у мыши и человека апоптоз в той или иной степени индуцируется и при потере активности регулятора клеточного цикла pRb [54, 55]. Для выяснения механизма, который обеспечивает торможение роста фибробластов *H. glaber* при неактивном p53, трансфицированные (этими рекомбинантными плазмидами) фибробласты *H. glaber* культивировали в присутствии ингибитора каспаз Z-Vad-FMK. Рост фибробластов, трансфицированных pSG5 LTΔ434-444, в присутствии ингибитора апоптоза усиливался. Мутантный белок LTΔ434-444 инактивирует pRb, что нарушает механизм остановки клеточного цикла. Комбинация инактивации pRb и ингибирования апоптоза присутствием Z-Vad-FMK приводит к росту клеток до высокой плотности. Характер роста клеток, трансфицированных pSG5 LTK1, в присутствии ингибитора апоптоза не менялся. Z-Vad-FMK и LTK1 инактивируют p53, но при этом активным остается pRb, он включает остановку клеточного цикла и сдерживает пролиферацию [31].

Для устойчивых к раку слепышей *Spalax (Spalax ehrenbergi, S. galili)* также характерен некротический путь гибели клеток [56]. У *Spalax* p53 отличается от p53 большинства родственных млекопитающих заменой аргинина в положении 174 на лизин. Эта специфическая мутация часто обнаруживается в опухолях человека [57]. Замена аргинина на лизин влияет на свойства ДНК-связывающего домена p53. Белок, содержащий такую замену, способен индуцировать остановку клеточного цикла, но не способен инициировать апоптоз. Мутация R174K в p53 снижает его способность активировать апоптотический каскад и активирует иммуновоспалительные процессы, стимулирующие развитие некроза, индуцируемого интерфероном-бета 1 [55, 56]. Тем не менее, некротическая смерть клеток *Spalax* также нуждается в функционировании пути, ассоциированного с активностью p53 [57–60]. В отличие от *Spalax*, в позиции 174 аминокислотной последовательности p53 *H. glaber*, как и в p53 нормальных клеток человека и мыши, находится остаток аргинина [18].

Изучение токсических воздействий на фибробласты *H. glaber* показало, что эти клетки более устойчивы к метилметансульфонату, параквату и низкому содержанию глюкозы в среде, при этом более чувствительны к H₂O₂, ультрафиолету и ротенону, чем фибробласты мыши [61]. В другой работе было проведено сравнение апоптотического ответа культивируемых клеток артериального эндотелия *H. glaber* и лабораторной мыши на воздействие окислителя (H₂O₂,

от 10⁻⁶ до 10⁻³ M) и повышенной температуры (42°C). Апоптотический ответ клеток *H. glaber* на действие H₂O₂ был в 3–10 раз слабее, а их устойчивость к воздействию повышенной температуры была выше, чем у клеток мышинового эндотелия [62].

ВЫСОКАЯ ТОЧНОСТЬ ТРАНСЛЯЦИИ И РАСЩЕПЛЕННАЯ 28S рРНК

Одна из важных особенностей функционирования ключевых систем *H. glaber* – высокая точность процесса трансляции. При близкой скорости трансляции количество ошибочно включенных аминокислот в фибробластах *H. glaber* в 4 раза ниже, чем в фибробластах мыши [63]. Повышение точности трансляции в *H. glaber* связали с тем, что расщепленная на два фрагмента 28S рРНК (так препараты 28S рРНК *H. glaber* выглядят при электрофоретическом анализе в денатурирующих условиях) неким образом оптимизирует укладку и/или динамику большой субъединицы рибосомы [63]. Сравнение транскриптомов ряда грызунов показало, что разрушение 28S рРНК *H. glaber* происходит в результате удаления фрагмента специфической последовательности, расположенной в домене D6 предшественника 28S рРНК [64]. У *H. glaber* и туко-туко (*Stenomys talarum*) эти последовательности отличает высокая степень консервативности, его 28S рРНК также выглядит расщепленной, однако для туко-туко повышенная точность синтеза белка не характерна [64]. Известно немало видов, в РНК которых выявлено подобное расщепление, что никак не коррелировало с продолжительностью их жизни. Неясно также, действительно ли 28S рРНК расщепляется в результате специфического сплайсинга, а фрагменты объединены в одну структуру только водородными связями, или расщепление – артефакт, возникающий при воздействии высокой температуры при выделении или анализе РНК [65–69]. Объяснение необычно высокой точности трансляции в *H. glaber* особенностью структуры 28S рРНК представляется, таким образом, спорным. Высокая точность процесса синтеза белков, безусловно, вносит вклад в стабильность протеома *H. glaber*, однако особенности молекулярных механизмов, ее определяющих, только предстоит изучить. В частности, у *H. glaber* совершенно не изучена первая стадия трансляции – аминоацилирование тРНК, которая в значительной степени определяет точность белкового синтеза [70].

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРЫ БЕЛКОВ

Теория окислительного стресса рассматривает накопление в клетке окислительных повреждений (ОП) как один из факторов старения. По этой причине внимание исследователей привлекает вопрос о содержа-

нии ОП и особенностях механизмов антиоксидантной защиты у «долгожителя» *H. glaber*.

Одна из главных мишеней, в которых возникают ОП, это белки. Окислительные воздействия могут приводить к нарушению структуры и функций белков, в частности, инактивировать ферменты и способствовать образованию белковых агрегатов, содержащих ковалентные сшивки. Высокой чувствительностью к окислению отличаются SH-группы цистеина, способные формировать как обратимые (дисульфид S-S, сульфеновая кислота), так и необратимые повреждения (сульфиновая и сульфоновая кислоты) [22]. Другой распространенный тип ОП белков – карбонилирование, необратимая модификация боковых цепей остатков пролина, аргинина, лизина, треонина, цистеина и гистидина [71].

В качестве модельных систем для изучения ОП белков используют, в основном, лизаты тканей различных органов *H. glaber* и лабораторных мышей соответствующего физиологического возраста [22, 72–76]. Изучено содержание ОП цистеина и уровень карбонилирования белков, а также влияние ОП на структуру и функционирование белков, а также активность ряда ферментов, участвующих в противостоянии накоплению окислительных повреждений.

Сравнение активности глутатионсинтетазы, каталазы, супероксиддисмутаза и глутатионпероксидазы (GPX1) показало, что в экстракте из печени молодой особи *H. glaber* активность всех ферментов, кроме GPX1, в 1.3–2 раза выше, чем в экстракте из печени мыши C57BL/6 соответствующего физиологического возраста. Активность GPX1 в экстракте *H. glaber* оказалась почти на порядок ниже [72]. В соответствии с более поздними данными у *H. glaber* резко снижен также уровень мРНК *Gpx1* и содержание соответствующего белка [19, 73].

Согласно [22], белки молодого *H. glaber* содержат в 1.6 раза больше как свободных SH-групп, так и обратимых ОП, таких, как S-S и сульфеновые производные цистеина, чем белки мыши (C57BL/6). Кроме того, у мышей количество ОП цистеина с возрастом возрастает в 3.4 раза, растет количество необратимых ОП цистеина и карбонильных повреждений, в то время как у *H. glaber* такие изменения отсутствуют [22, 72–76]. Это указывает на более эффективную работу противостоящих окислительному стрессу систем у *H. glaber*.

Анализ уровней карбонилирования белков в тканях *H. glaber* и мыши показал, что во всех образцах основными мишенями карбонилирования являются триозофосфатизомеразы (TPI) и пероксиредоксин 1 (Prdx1). Белки *H. glaber* содержат в 1.5 раза больше карбонильных повреждений, но при этом лучше сохраняют ферментативную активность. Удельная активность

TPI в цитозольной фракции лизата ткани почки *H. glaber* была в 3 раза выше, чем у мыши. Кроме того, при действии окислительного стресса (аскорбат/ Fe^{2+}) TPI и Prdx1 *H. glaber* формируют меньше ковалентно сшитых белковых олигомеров [73, 74].

С использованием 4,4'-дианилино-1,1'-бинафтил-5,5'-дисульфоновой кислоты (BisANS) в качестве неполярного флуоресцентного зонда, взаимодействующего с гидрофобными остатками аминокислот на поверхности белковых глобул, показано, что белки *H. glaber* гораздо более устойчивы к денатурирующему воздействию 1 М мочевины, чем белки мыши. В частности, глицеральдегидфосфат-дегидрогеназа (GAPDH), в активный центр которой входят SH-группы, у *H. glaber* сохраняет 60% активности, в отличие от 10% у GAPDH мыши [22].

Сравнение распределения карбонилированных белков по субклеточным фракциям у долгоживущих, в том числе и *H. glaber*, и короткоживущих млекопитающих показало, что в ядре у долгоживущих животных, в отличие от короткоживущих, относительное содержание белков с ОП ниже, чем в цитоплазме [9, 76]. Это позволило предположить существование обратной корреляции между уровнем окислительных повреждений ядерных белков и продолжительностью жизни [76]. Однако детально это не изучено. Данные о содержании повреждений в белках, участвующих в процессе репарации ДНК, отсутствуют.

Результаты оценок, которые не различают типов повреждений или поврежденных молекул (белков, ДНК), происходящих из различных клеточных компартментов, могут маскировать истинную картину. Затрудняет анализ данных и путаница в названиях методов и препаратов, используемых в различных публикациях. Одной из причин противоречий может быть то, что высокий уровень ОП характерен только для определенных молекул (классов молекул) и/или компартментов клетки [76].

Кроме того, существуют противоречивые данные, касающиеся антиоксидантного статуса. Так, содержание GSH в тканях *H. glaber* в одной работе оценено как в 1.4 раза более низкое [77], в другой – как в 1.4 раза более высокое [22], чем у мыши. Такие противоречия не позволяют сравнивать антиоксидантный статус этих организмов. Кроме того, на результаты экспериментов с использованием экстрактов тканей органов, а также биологических жидкостей *H. glaber* может влиять феномен его эусоциальности [78].

УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА И УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ИНГИБИТОР ПРОТЕАЗ – АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИН

Важную роль в поддержании содержания в клетке нужного количества активных белков правильной

структуры (протеостаза) играет убиквитин-протеасомная система [79].

Оценка протеолитической активности в сочетании с результатами вестерн-блот-анализа выявила более высокую химотрипсин-подобную (chymotrypsin like, ChT-L) и трипсин-подобную (trypsin-like, TL) протеазную активность 26S и 20S протеасом в экстрактах ткани печени *H. glaber*. Показано, что удельная ChT-L активность протеасом *H. glaber* в 3–5 раз выше, чем у протеасом мыши [80]. Основная часть этой активности обеспечивается работой 26S протеасом. Кроме того, известно, что 20S протеасомы могут осуществлять убиквитин независимый гидролиз белков, содержащих ОП, например карбонилированных белков [79]. Это может способствовать поддержанию стабильной работы протеома *H. glaber*, уровень убиквитинирования белков которого невысок и не увеличивается с возрастом. Содержание 19S регуляторных субъединиц и каталитических субъединиц иммунопротеасом ($\beta 5i$ и $\beta 2i$) у *H. glaber* также выше, чем у мыши [80]. Кроме того, у *H. glaber* выше базовый уровень экспрессии ключевых шаперонов: HSP72, HSP40 и HSP25. Два из этих шаперонов входят в состав так называемого цитозольного фактора, который защищает протеасомы от ингибиторов и увеличивает эффективность их работы [81]. Наблюдаемое у *H. glaber* увеличение пептидазной активности и участие шаперонов в защите протеасом от действия ингибиторов не относятся к ранее известным функциям шаперонов. Все это может отражать высокий уровень контроля качества протеома у *H. glaber*.

С поддержанием протеостаза связан и многофункциональный белок плазмы крови – альфа-2-макроглобулин (A2m). Известно, что A2m человека способен связывать различные цитокины, факторы роста (TGF- $\beta 1$, TNF- α , IL- $\beta 1$) и является универсальным ингибитором протеиназ (трипсина, химотрипсина, эластазы и металлопротеиназ). Связывание A2m-протеиназных комплексов с рецептором LRP1 (CD91) запускает их быстрое удаление из крови и тканей путем рецепторзависимого эндоцитоза. Предполагается, что этот белок обладает функцией шаперона, предотвращающего агрегацию белков, а также способствует удержанию в клетках цинка, снижение концентрации которого с возрастом сопровождается развитием ряда заболеваний у человека [82–85]. Уровень транскрипции гена, кодирующего A2m в печени *H. glaber*, повышен в 140 раз по сравнению с уровнем в печени мыши [19]. Концентрация белка A2m в плазме крови *H. glaber* в 2–3 раза выше, чем в плазме крови человека. Вероятно, с этим связана протеолитическая активность плазмы крови *H. glaber*, пониженная по сравнению с активностью в плазме крови человека [86].

Еще одна важная особенность *H. glaber* – постоянная активность сигнального пути, регулируемого фактором Nrf2, который активирует транскрипцию более 200 генов, принимающих участие в антиоксидантном и противовоспалительном ответе организма на эндогенные и экзогенные воздействия [87].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: СТАБИЛЬНЫЙ ГЕНОМ, СТАБИЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, СТАБИЛЬНЫЙ ПРОТЕОМ, ЭФФЕКТИВНАЯ РЕПАРАЦИЯ ДНК

Одной из основ поддержания стабильности генома считается эффективная работа систем репарации ДНК. К характерным особенностям генома *H. glaber* относятся повышенная стабильность его структуры и функционирования, которые сохраняются на протяжении всей жизни. Стабильностью отличается и его белковая система (протеом). Высокая точность трансляции, повышенный уровень экспрессии ключевых шаперонов и постоянно активные протеасомы в сочетании с высоким уровнем экспрессии A2m способствуют поддержанию в клетках *H. glaber* пула эффективно функционирующих белков. Экспериментально доказана устойчивость ряда белков *H. glaber* к денатурирующим воздействиям и их способность сохранять функциональную активность в условиях постоянного окислительного стресса. Все это, а также повышенный уровень экспрессии ряда генов, кодирующих белки репарации, и интенсивность ответа сигнальных путей на повреждение позволяют предполагать, что эффективность работы систем репарации ДНК у *H. glaber* должна быть высока. С таким предположением согласуются, в частности, результаты исследований, в которых были использованы клетки млекопитающих с различной продолжительностью жизни. Скорость УФ-индуцированного синтеза ДНК в фибробластах долгоживущего белоногого (оленьего) хомячка (*Peromyscus leucopus*) была в 2.5 раза выше, чем скорость синтеза ДНК в фибробластах мыши (*Mus musculus*) [8]. В фибробластах мутантной мыши-долгожителя (Snell dwarf mice) удаление УФ-повреждений происходит более эффективно, чем в фибробластах мыши с нормальной продолжительностью жизни [9]. Сравнение активности поли(ADP-рибоза)-полимераз (PARP) в моноядерных лейкоцитах крови 13 видов млекопитающих выявило положительную корреляцию между уровнем активности PARP и максимальной продолжительностью жизни, характерной для этих млекопитающих. В частности, активность PARP в клетках человека была в 5 раз выше, чем в клетках крысы. При этом содержание соответствующего белка не отличалось, а отсутствие в условиях эксперимента значимой видоспецифичной деградации полимера

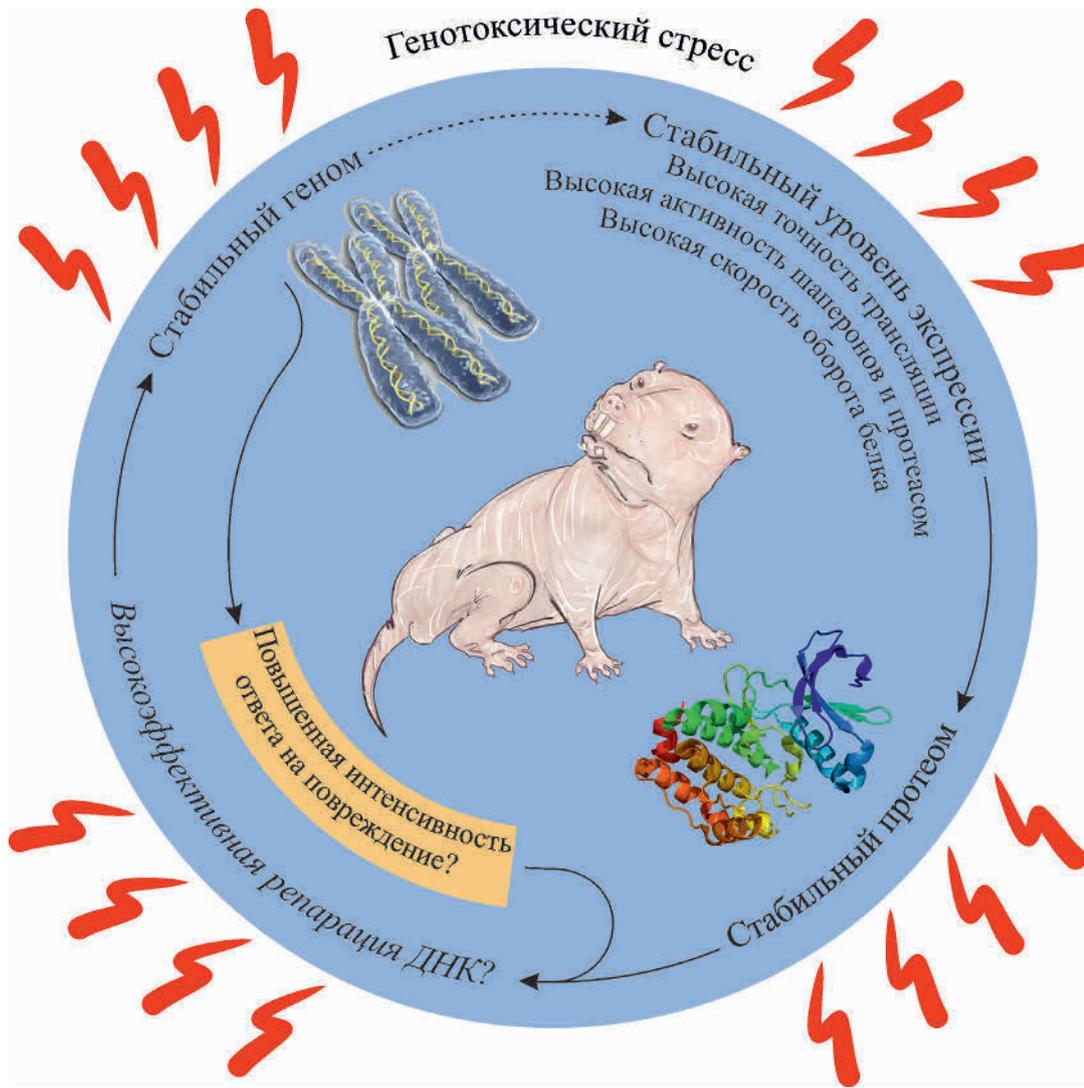


Рис. 2. Стабильный уровень экспрессии белков, стабильный протеом, повышенная интенсивность ответа на повреждение и эффективная репарация ДНК как составляющие устойчивости *H. glaber* к генотоксическим воздействиям

поли(ADP-рибозы) позволило исключить искажение результатов оценки активности PARP вследствие работы PARG (поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза). Высказано предположение, что более высокая способность к поли(ADP-рибозил)ированию может вносить вклад в эффективное поддержание целостности и стабильности геномов долгоживущих видов [88].

Вполне вероятно, что активность процессов поли(ADP-рибозил)ирования, регулирующих различные механизмы репарации [89], повышена и у экстремально долгоживущего *H. glaber*, однако экспериментальные доказательства этого факта на сегодняшний день отсутствуют.

Очевидно, что в основе уникальных фенотипических характеристик *H. glaber* [90] лежат особенности устройства и регуляции работы его генома и протеома.

Для изучения этих особенностей используются модельные системы различной степени сложности с использованием все более широкого набора методов [91]. Недавно в исследовании, проведенном с использованием фибробластов 16 видов млекопитающих, было показано, что для долгоживущих млекопитающих характерен повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих белки, имеющие отношение к репарации ДНК [92]. Моделирование и анализ стабильности генных сетей, связывающих возраст, устойчивость к стрессу и замедленное физиологическое старение, показали, что стабильность простейшей модельной генной сети резко возрастает при введении в расчеты такого параметра, как «эффективная репарация». Кроме того, согласно результатам моделирования, вклады в стабильность генной сети процессов репарации ДНК и процессов, обеспечивающих

присутствие в клетке эффективно функционирующих белков («поддержание протеостаза», «репарация протеома»), в равной степени существенны, а сами эти процессы взаимосвязаны [7].

Можно, таким образом, полагать, что молекулярные «машины», противостоящие накоплению повреждений в геноме *H. glaber*, включая механизмы репарации ДНК, функционируют с высокой эффективностью. Мы попытались проиллюстрировать этот вывод схемой, представленной на рис. 2. Однако отсутствие исследований процесса индукции апоптоза при различных генотоксических воздействиях и экспериментальных данных о работе систем репарации

ДНК образует своего рода белое пятно в знаниях о реальном вкладе этих процессов в долголетие и онкорезистентность *H. glaber*. Сравнительная оценка функциональной активности систем репарации ДНК представляется в этой связи весьма важной и актуальной задачей. ●

Авторы выражают глубокую благодарность академику В.П. Скулачеву за прочтение обзора и ценные замечания.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-24-00038).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scharer O.D. // *Angew. Chem. Int.* 2003. V. 42. № 26. P. 2946–2974.
- Vijg J., Suh Y. // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. V. 75. P. 645–668.
- Hoeijmakers J.H.J. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. № 15. P. 1475–1485.
- Friedberg E.C., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P.C., Hays J.B., Lehmann A.R., Lindahl T., Lowndes N., Sarasin A., Wood R.D. // *DNA Repair (Amst.)*. 2006. V. 5. № 8. P. 986–996.
- Hanawalt P.C. // *Mech. Ageing Dev.* 2008. V. 129. P. 503–505.
- Promislow D.E. // *J. Theor. Biol.* 1994. V. 170. P. 291–300.
- Kogan V., Molodtsov I., Menshikov L.I., Reis R.J.S., Fedichev P. // *Sci. Repts.* 2015. V. 5. № 13589. P. 1–12.
- Hart R.W., Sacher G.A., Hoskins T.L. // *J. Gerontol.* 1979. V. 34. P. 808–817.
- Salmon A.B., Ljungman M., Miller R.A. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. № 3. P. 219–231.
- Hanawalt P.C. // *Environ. Mol. Mutagen.* 2001. V. 38. № 23. P. 89–96.
- Begall S., Burda H., Schleich C. *Subterranean Rodents: News from Underground*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007.
- Gorbunova V., Seluanov A., Mao Z., Hine C. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 22. P. 7466–7474.
- Buffenstein R. // *J. Comp. Physiol. B.* 2008. V. 178. № 4. P. 439–445.
- Gorbunova V., Bozzella M.J., Seluanov A. // *AGE*. 2008. V. 30. № 2. P. 111.
- Liang S., Mele J., Wu Y., Buffenstein R., Hornsby P.J. // *Aging Cell.* 2010. V. 9. № 4. P. 626–635.
- Delaney M.A., Ward J.M., Walsh T.F., Chinnadurai S.K., Kerns K., Kinsel M.J., Treuting P.M. // *Vet. Pathol.* 2016. V. 53. № 3. P. 691–696.
- Kim E.B., Fang X., Fushan A.A., Huang Z., Lobanov A.V., Han L., Marino S.M., Sun X., Turanov A.A., Yang P., et al. // *Nature*. 2011. V. 479. № 7372. P. 223–227.
- Keane M., Craig T., Alfoldi J., Berlin A.M., Johnson J., Seluanov A., Gorbunova V., Di Palma F., Lindblad-Toh K., Church G.M., et al. // *Bioinformatics*. 2014. V. 30. № 24. P. 3558–3560.
- Yu C., Li Y., Holmes A., Szafranski K., Faulkes C.G., Coen C.W., Buffenstein R., Platzer M., de Magalhães J., Church G.M. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 11. P. e26729.
- MacRae S.L., Zhang Q., Lemetre C., Seim I., Calder R.B., Hoeijmakers J., Suh Y., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Aging Cell.* 2015. V. 14. № 2. P. 288–291.
- Seluanov A., Hine C., Bozzella M., Hall A., Sasahara T.H., Ribeiro A.A., Catania K.C., Presgraves D.C., Gorbunova V. // *Aging Cell.* 2008. V. 7. № 6. P. 813–823.
- Perez V.I., Buffenstein R., Masamsetti V., Leonard S., Salmon A.B., Mele J., Andziak B., Yang T., Edrey Y., Friguet B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 9. P. 3059–3064.
- Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Malyavko A.N., Naraikina Y., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *Acta Naturae*. 2012. V. 4. № 2. P. 44–61.
- Gomes N.M.V., Ryder O.A., Houck M.L., Charter S.J., Walker W., Forsyth N.R., Austad S.N., Venditt C., Pagel M., Shay J.W., et al. // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 5. P. 761–768.
- Gorbunova V., Seluanov A. // *Mech. Ageing Dev.* 2009. V. 130. № 12. P. 3–9.
- Evfratov S.A., Smekalova E.M., Golovin A.V., Logvina N.A., Zvereva M.I., Dontsova O.A. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 2. P. 41–47.
- Hong M.G., Myers A.J., Magnusson P.K., Prince J.A. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 8. P. e3024.
- Lewis K.N., Soifer I., Melamud E., Roy M., McIsaac R.S., Hibbs M., Buffenstein R. // *Mammalian Genome*. 2016. V. 27. P. 259–278.
- Delsuc F., Tilak M.K. // *Genome Biol. Evol.* 2015. V. 7. № 3. P. 768–774.
- Davies K.T., Bennett N.C., Tsagkogeorga G., Rossiter S.J., Faulkes C.G. // *Mol. Biol. Evol.* 2015. V. 32. № 12. P. 3089–3097.
- Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K.C., Gorbunova V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 46. P. 19352–19357.
- Faulkes C.G., Davies K.T.J., Rossiter S.J., Bennett N.C. // *Biol. Lett.* 2015. V. 11. № 20150185. P. 1–8.
- Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablavaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A. // *Nature*. 2013. V. 499. № 7458. P. 346–349.
- Manov I., Hirsh M., Iancu T.C., Malik A., Sotnichenko N., Band M., Avivi A., Shams I. // *BMC Biol.* 2013. V. 11. № 91. P. 1–17.
- Mullins D.N., Crawford E.L., Khuder S.A., Hernandez D.A., Yoon Y., Willey J.C. // *BMC Cancer*. 2005. V. 5. P. 141.
- Haring S.J., Humphreys T.D., Wold M.S. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 3. P. 846–858.
- Kemp M.G., Mason A.C., Carreira A., Reardon J.T., Haring S.J., Borgstahl G.E.O., Kowalczykowski S.C., Sancar A., Wold M.S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 7. P. 4788–4797.
- Mason A.C., Roy R., Simmons D.T., Wold M.S. // *Biochemistry*. 2010. V. 49. № 28. P. 5919–5928.
- MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A.,

- Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Aging* (Albany NY). 2015. V. 7. № 12. P. 1171–1184.
40. Christmann M., Kaina B. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 18. P. 8403–8420.
41. Buzdin A.A., Zhavoronkov A.A., Korzinkin M.B., Venkova L.S., Zenin A.A., Smirnov P.Y., Borisov N.M. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 1–20.
42. Abercrombie M. // *Nature.* 1979. V. 281. № 5729. P. 259–262.
43. Serrano M., Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1993. V. 366. № 6456. P. 704–707.
44. Hannon G.J., Beach D. // *Nature.* 1994. V. 371. № 6494. P. 257–261.
45. Quelle D.E., Zindy F., Ashmun R.A., Sherr C.J. // *Cell.* 1995. V. 83. № 6. P. 993–1000.
46. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. // *Cell.* 1997. V. 88. № 5. P. 593–602.
47. Gil J., Peters G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 9. P. 667–677.
48. Campisi J. // *Aging Cell.* 2008. V. 7. № 3. P. 281–284.
49. Tian X., Azpurua J., Ke Z., Augereau A., Zhang Z.D., Vijg J., Gladyshev V.N., Gorbunova V., Seluanov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 4. P. 1053–1058.
50. Cowman M.K., Lee H.-G., Schwertfeger K.L., McCarthy J.B., Turley E.A. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. № 261. P. 1–8.
51. Schwertfeger K.L., Cowman M.K., Telmer P.G., Turley E.A., McCarthy J.B. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 236.
52. Miyawaki S., Kawamura Y., Hachiya T., Shimizu A., Miura K. // *Inflammation Regeneration.* 2015. V. 35. № 1. P. 42–50.
53. Miyawaki S., Kawamura Y., Oiwa Y., Shimizu A., Hachiya T., Bono H., Koya I., Okada Y., Kimura T., Tsuchiya Y., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11471.
54. Martel C., Batsche E., Harper F., Cremisi C. // *Cell Death Differ.* 1996. V. 3. P. 285–298.
55. Morgenbesser S.D., Williams B.O., Jacks T., DePinho R.A. // *Nature.* 1994. V. 371. P. 72–74.
56. Shams I., Malik A., Manov I., Joel A., Band M., Avivi A. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 7. P. 1111–1118.
57. Ashur-Fabian O., Avivi A., Trakhtenbrot L., Adamsky K., Cohen M., Kajakaro G., Joel A., Amariglio N., Nevo E., Rechavi G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 33. P. 12236–12241.
58. Avivi A., Ashur-Fabian O., Joel A., Trakhtenbrot L., Adamsky K., Goldstein I., Amariglio N., Rechavi G., Nevo E. // *Oncogene.* 2007. V. 26. № 17. P. 2507–2512.
59. Malik A., Korol A., Weber M., Hankeln T., Avivi A., Band M. // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 1–20.
60. Band M., Ashur-Fabian O., Avivi A. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 16. P. 3347–3452.
61. Salmon A.B., Sadighi A.A., Buffenstein R., Miller R.A. // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008. V. 63. P. 232–241.
62. Labinskyy N., Csiszar A., Orosz Z., Smith K., Rivera A., Buffenstein R. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. V. 291. P. 2698–2704.
63. Azpurua J., Ke Z., Chen I.X., Zhang Q., Ermolenko D.N., Zhang Z.D., Gorbunova V., Seluanov A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 43. P. 17350–17355.
64. Fang X., Seim I., Huang Z., Gerashchenko M.V., Xiong Z., Turanov A.A., Zhu Y., Lobanov A.V., Fan D., Yim S.H., et al. // *Cell Reports.* 2014. V. 8. № 5. P. 1354–1364.
65. Melen G.J., Pesce C.G., Rossi M.S., Kornblihtt A.R. // *EMBO J.* 1999. V. 18. № 11. P. 3107–3118.
66. Winnebeck E.C., Millar C.D., Warman G.R. // *J. Insect Sci.* 2010. V. 10. P. 1–7.
67. McCarthy S.D., Dugon M.M., Power A.M. // *Peer J.* 2015. V. 3. P. e1436.
68. Ishikawa H., Newburgh R.W. // *J. Mol. Biol.* 1972. V. 64. № 1. P. 135–144.
69. Fujiwara H., Ishikawa H. // *Nucl. Acids Res.* 1986. V. 14. № 16. P. 6393–6401.
70. Yadavalli S.S., Ibba M. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 2012. V. 86. P. 1–43.
71. Nystrom T. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 1311–1317.
72. Andziak B., O'Connor T.P., Buffenstein R. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. V. 126. № 11. P. 1206–1212.
73. Kasaikina M.V., Lobanov A.V., Malinouski M.Y., Lee B.C., Seravalli J., Fomenko D.E., Turanov A.A., Finney L., Vogt S., Park, T.J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 19. P. 17005–17014.
74. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., van Remmen H., Buffenstein R. // *Aging Cell.* 2006. V. 5. № 6. P. 463–471.
75. De Waal E.M., Liang H., Pierce A., Hamilton R.T., Buffenstein R., Chaudhuri A.R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 434. № 4. P. 815–819.
76. Bhattacharya A., Leonard S., Tardif S., Buffenstein R., Fischer K.E., Richardson A., Austad S.N., Chaudhuri A.R. // *Aging Cell.* 2011. V. 10. № 4. P. 720–723.
77. Andziak B., Buffenstein R. // *Aging Cell.* 2006. V. 5. № 6. P. 525–532.
78. Новиков Е.А., Кондратюк Е.Ю., Бурда Г. // *Зоол. журн.* 2015. Т. 94. № 1. С. 119–124.
79. Сорокин А.В., Ким Е.Р., Овчинников Л.П. // *Успехи биол. химии.* 2009. Т. 49. С. 3–76.
80. Rodriguez K.A., Edrey Y.H., Osmulski P., Gaczynska M., Buffenstein R. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 5. P. e35890.
81. Rodriguez K.A., Osmulski P.A., Pierce A., Weintraub S.T., Gaczynska M., Buffenstein R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 11. P. 2060–2072.
82. Sottrup-Jensen L. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 20. P. 11539–11542.
83. Birkenmeier G., Muller R., Huse K., Forberg J., Glaser C., Hedrich H., Nicklisch S., Reichenbach A. // *Exp. Neurol.* 2003. V. 184. № 1. P. 153–161.
84. Borth W. // *FASEB J.* 1992. V. 6. № 15. P. 3345–3353.
85. Isaac L., Florido M.P., Fecchio D., Singer L.M. // *Inflamm Res.* 1999. V. 48. № 8. P. 446–452.
86. Thieme R., Kurz S., Kolb M., Debebe T., Holtze S., Morhart M., Huse K., Szafranski K., Platzer M., Hildebrandt T.B., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 6. P. e0130470.
87. Lewis K.N., Wason E., Edrey Y.H., Kristan D.M., Nevo E., Buffenstein R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 12. P. 3722–3727.
88. Grube K., Bürkle A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. № 24. P. 11759–11763.
89. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. // *Молекуляр. биология.* 2016. Т. 50. № 4. С. 655–673.
90. Skulachev V.P., Holtze S., Vyssokikh M.Y., Bakeeva L.E., Skulachev M.V., Markov A.V., Hildebrandt T.B., Sadovnichii V.A. // *Physiol. Rev.* 2017. V. 97. № 2. P. 699–720.
91. Dziegielewska M., Holtze S., Vole C., Wachter U., Menzel U., Morhart M., Groth M., Szafranski K., Sahm A., Sponholz C., Dammann P., Huse K., Hildebrandt T., Platzer M. // *Redox Biol.* 2016. V. 8. P. 192–198.
92. Ma S., Upneja A., Galecki A., Tsai Y.M., Burant C.F., Raskind S., Zhang Q., Zhang Z.D., Seluanov A., Gorbunova V., et al. // *Elife.* 2016. V. 5. pii: e19130.

УДК 576.315

Микроскопия сверхвысокого разрешения в изучении структуры и функционирования клеточного ядра

С. С. Рябичко¹, А. Н. Ибрагимов¹, Л. А. Лебедева¹, Е. Н. Козлов¹, Ю. В. Шидловский^{1,2*}¹Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119048, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

*E-mail: yul.biogen@gmail.com

Поступила в редакцию 03.04.2017

Принята к печати 07.11.2017

РЕФЕРАТ В последние десятилетия были разработаны новые микроскопические технологии, получившие общее название микроскопия сверхвысокого разрешения. Эти технологии позволяют получать изображения клетки в свете видимого диапазона с разрешением до 10 нм. Применение микроскопии нового типа представляет большой интерес для изучения строения и функционирования клеточного ядра. В обзоре рассмотрены основные данные, полученные в этой области.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гистоны, ДНК, микроскопия сверхвысокого разрешения, хроматин, хромосома, ядро клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МСВР – микроскопия сверхвысокого разрешения; BALM – binding activated localization microscopy (активированная связыванием локализационная микроскопия); FISH – fluorescence *in situ* hybridization (флуоресцентная гибридизация *in situ*); PALM – photoactivated localization microscopy (фотоактивированная локализационная микроскопия); SIM – structured illumination microscopy (микроскопия структурированного освещения); SMLM – single molecule localization microscopy (микроскопия единичных молекул); STED – stimulated emission depletion (истощение стимулированной эмиссией); STORM – stochastic optical reconstruction microscopy (стохастическая оптическая реконструкция).

ВВЕДЕНИЕ

Ядро клетки выполняет важнейшую функцию хранения и реализации наследственной информации. Прогресс в изучении структуры и функций ядра долгое время тормозился недостатком адекватных методов, применимых к внутриядерным структурам. Наиболее востребованный в настоящее время метод изучения структуры ядра – сканирующая конфокальная микроскопия – имеет предел разрешающей способности около 200 и 500 нм (латеральное и аксиальное разрешение соответственно). В распоряжении исследователей имеются также и другие микроскопические методы, позволяющие изучать процессы в ядре на молекулярном уровне [1]. Однако изучение ядра в масштабах 20–200 нм представляет техническую сложность. Лишь развитие методов группы ЗС и появление метода Hi-C позволило приблизиться к пониманию принципов организации хроматина на этом уровне [2, 3]. В последние десятилетия активно развивается еще один подход, который позволил сделать прорыв в области изучения деталей

строения и функционирования клеточного ядра – микроскопия сверхвысокого разрешения (МСВР). В МСВР дифракционный предел преодолевается с использованием различных технологий, включающих как технические решения в конструкции микроскопа, так и реконструкцию изображения с помощью вычислительного аппарата [4].

ПРИНЦИПЫ И ВОЗМОЖНОСТИ МСВР

Наиболее значительные успехи в визуализации со сверхвысоким разрешением были достигнуты при использовании микроскопии дальнего поля [5]. В 4Pi-микроскопии используются две противоположно направленные объективные линзы, фокусируемые в одной точке, что позволяет улучшить аксиальное разрешение до 100 нм. В других методах МСВР преодоление дифракционного предела достигается двумя путями. Первый – пространственное и/или временное модулирование перехода между двумя молекулярными состояниями флуорофора. Второй – сужение пика функции рассеяния точки, получае-

мой от большого количества изображений группы флуорофоров, локализованных вблизи друг друга. Основными методами первой группы являются методы истощения стимулированной эмиссией (STED), истощения основного состояния (GSD), структурированного освещения (SIM) и их некоторые комбинации с I⁵M-микроскопией (вариацией 4Pi) [6, 7]. Основные методы второй группы – фотоактивированная и флуоресцентная фотоактивированная локализационная микроскопия (PALM, FPALM), стохастическая оптическая реконструкция (STORM), активированная связыванием локализационная микроскопия (BALM) [7, 8].

В технологии SIM используется определенным образом структурированное освещение объекта, что позволяет удвоить разрешающую способность по каждой оси и достичь 100 нм для латерального и 300 нм для аксиального разрешения. В объеме это улучшение становится уже восьмикратным. Частое использование этого типа микроскопии связано с тем, что образцы можно готовить стандартным способом и применять стандартные флуорофоры. В методе STED образец подвергается практически одновременной обработке двумя лазерами с разной длиной волны – возбуждающим и истощающим, благодаря сочетанию которых возбуждение флуоресценции достигается в узкой области фокального центра размером порядка 50–80 нм. С помощью данного метода можно достичь разрешения 20 нм в фокальной плоскости и 45 нм во всех трех направлениях.

Методы PALM, FPALM, BALM и STORM относятся к микроскопии единичных молекул (SMLM). Образец подвергается многократному действию возбуждающего лазера малой мощности, в каждом акте активируется и точно локализуется (на основании функции рассеяния точки) небольшая доля флуорофоров. Разрешение изображения, полученного этими методами, зависит от соотношения количества фотонов от отдельного флуорофора к общему фону флуоресценции и может быть доведено в теории до 1 нм [9].

Более подробную информацию о принципах упомянутых методов, их преимуществах и недостатках можно почерпнуть в недавних обзорах, например, [10, 11]. Одна из последних разработок МСВР – методика W-4PiSMSN – позволяет визуализировать целую клетку с разрешением 10–20 нм, причем толщина клетки может достигать 10 мкм [12].

Как правило, для визуализации глобальной структуры ядра используют мечение гистонов флуоресцентными белками [13] либо флуоресцентные метки, связывающиеся с ДНК и РНК [14–16]. Гистоны могут быть слиты с флуоресцентными белками, а также модифицироваться химически [17, 18]. ДНК в опытах

с МСВР можно пометить с помощью классических красителей, таких, как Hoechst и DAPI [19], также созданы более фотостабильные и фотопереключаемые флуорофоры [15, 20, 21]. МСВР совместима с клик-химией, позволяющей ввести флуоресцентные метки в ДНК [22, 23]. Предложен метод визуализации ДНК на основе собственной флуоресценции нуклеотидов [24].

Детектировать специфические последовательности ДНК в МСВР можно с помощью классического метода флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), который сохраняет в целом тонкую структуру ядра [25]. Предложены метод DNA-PAINT, позволяющий получать многоцветное изображение с разрешением менее 10 нм [26], методы мультиплексного FISH со сменой зондов [27, 28]. Специфические последовательности ДНК могут быть также локализованы с помощью программируемых gRNA/dCas9-комплексов [29].

При визуализации ДНК с помощью SMLM разрешение составляет обычно около 25 нм, что соответствует примерно 70 п.н. линейной двухцепочечной ДНК [30, 31]. В живых клетках достигнуто разрешение 70 нм [32]. В настоящее время в методах с использованием гибридизации олигонуклеотидов удалось добиться разрешения 5 нм в плотно меченных образцах [33]. Таким образом, МСВР открыла возможность оптического генетического картирования высокого разрешения [34]. Так, изучены повторы ДНК на участке гетерохроматина Yq12 генома человека [35]. Подсчитано количество тринуклеотидных повторов в 5'-нетранслируемой области гена *FMR1* [36]. Микроскопия единичных молекул, соединенная с методикой Oligopaint, позволяет детектировать однонуклеотидные полиморфизмы и отличать таким образом гомологичные хромосомы друг от друга [37]. Предложен комплементарный метод молекулярных маяков, с помощью которого удалось визуализировать уникальную последовательность ДНК длиной 2.5 т.п.н. [38]. МСВР позволяет с высокой точностью измерять объем, который занимают отдельные генные локусы в пространстве ядра и оценивать уровень их компактизации [39], детектировать точное взаимное расположение отдельных локусов [40, 41]. Также с высокой точностью можно локализовать в ядре эпигенетические маркеры [42, 43].

Белок, который нужно обнаружить в ядре с помощью МСВР, обычно синтезируют в клетке в слитом виде с другим флуоресцентным белком. Важно, что МСВР позволяет не только локализовать флуорофор, но и определить его количество в месте локализации с точностью до одной молекулы [44–46]. Созданы методы одновременной детекции нескольких белков (в настоящее время до девяти) на одном препарате [47, 48].

МСВР применяют во многих исследованиях. Далее приведены основные результаты, полученные этим методом при изучении структуры и функций клеточного ядра.

ОБЩАЯ АРХИТЕКТУРА КЛЕТОЧНОГО ЯДРА И УПАКОВКА ХРОМАТИНА

Общая архитектура ядра была изучена с высоким разрешением в различных типах клеток [49]. Например, описаны перестройки структуры клеточного ядра в процессе миелопоза у человека [50], нейрогенеза у мыши [51], в клетках ранних эмбрионов и клонированных клеток быка [52, 53], в клеточном цикле дрожжей [54]. Подобные работы часто имеют описательный характер, так как о механизмах формирования тонкой структуры ядра известно очень немного.

В одной из ранних работ тонкую организацию клеточного ядра млекопитающих изучали с помощью 3D-SIM [55]. В нуклеоплазме выявлены каналы и лакуны, начинающиеся у ядерной поры и идущей в глубь ядра (интерхроматиновый компартмент). В пределах каждой хромосомной территории внутренние участки высокоструктурированных доменов хроматина отделены от интерхроматина слоем деконденсированного, транскрипционно активного хроматина толщиной 100–200 нм (периферический хроматин). Последний обогащен маркерами активной транскрипции и репликации, в то время как маркеры сплайсинга преимущественно локализуются в интерхроматиновом компартменте. Выявлены кластеры РНК-полимеразы II, в то же время существенная доля транскрипции обнаружена вне этих кластеров. Данные, полученные с помощью МСВР и 3С-методов, позволили создать модель организации ядра, в которой активный хроматин кластеризуется и выстраивается на границах сети внутриклеточных каналов, пронизывающих основную массу неактивного хроматина [56]. Локализация областей регуляции транскрипции на периферии доменов хроматина подтверждена с помощью FISH [57].

Изучение периферии ядра в клетках человека методом SIM показало, что у ядерных пор в целом снижается количество маркеров гетерохроматина, однако как эу-, так и гетерохроматин может формировать контакты с порой. С ядерными порами ассоциированы хроматинмодифицирующие ферменты, что может говорить о роли поры в организации структуры хроматина в ядре [58].

Одна из первых работ, в которой использовали меченые гистоны, показала, что общая плотность гистонов отличается в разных типах клеток человека. С помощью dSTORM обнаружены глобальные флуктуации плотности гистонов в ядре масштаба 1–2 мкм

[59]. Измерение общей плотности гистона H2B в ядрах клеточной линии U2OS человека методом PALM позволило определить параметры модели распределения хроматина в ядре, а также подтвердить модель фрактальной глобулы [60]. Изучение динамики гистона H2B с помощью dSTORM в клетках HeLa показало, что гистоны формируют кластеры, разделенные расстоянием около 100 нм идвигающиеся со скоростью 3 нм/с в интерфазном ядре [18]. С применением PALM в клетках человека описаны кластеры гистонов со средним диаметром 160 нм, формирование которых зависит от когезина и межнуклеосомных взаимодействий, но не зависит от транскрипции. Эти домены представлены и в митотических хромосомах, и в интерфазном ядре. Возможно, они являются строительными блоками хромосом [61].

Методом PALM показано существование филламентов диаметром 70 нм в метафазном хроматине дрозофилы [62]. STED-микроскопию использовали для изучения структуры хроматина в кардиомиоцитах, в которых выявлены домены хроматина размером 40–70 нм [63]. Детальный анализ распределения нуклеосом вдоль ДНК проведен с помощью STORM в клетках мыши и человека [64]. Показано, что нуклеосомы формируют в ядре гетерогенные группы различного размера (клатчи). Среднее количество нуклеосом в группе и их плотность зависят от типа клеток: в плюрипотентных клетках эти группы менее плотные и содержат меньше нуклеосом. РНК-полимераза II преимущественно локализуется с клатчами наименьшего размера, а гистон H1 и гетерохроматин – с наибольшими клатчами.

С помощью метода 3D-STORM проведено масштабное исследование упаковки ДНК в хроматине различного типа в клетках дрозофилы [65]. Изучены транскрипционно активные, неактивные и поликомб-домены. Первые оказались наименее компактными, последние – наиболее плотными. Степень упаковки указанных доменов по-разному зависит от размера домена: чем больше размер активного домена, тем менее он плотный, тогда как, чем больше размер поликомб-домена, тем выше его плотность. Показано, что для поликомб-доменов, в отличие от доменов двух других типов, характерна высокая степень перемешивания ДНК внутри отдельного домена и практически полное отсутствие перемешивания с соседними доменами другого типа. Созданы модели укладки хроматина в доменах разного типа.

Таким образом, к настоящему времени описаны внутриядерные домены хроматина различного масштаба. Для выяснения соотношения внутриядерных доменов друг с другом и с топологически ассоциированными доменами, выявляемыми при Hi-C-анализе, требуются дальнейшие исследования.

ГЕТЕРОХРОМАТИН

Детали строения гетерохроматина сателлитной ДНК в стареющих клетках человека изучали с применением STED-микроскопии [66]. Как в стареющих, так и в делящихся клетках сателлитная ДНК упакована в набор компактных глобул, разделенных линкерами, однако в процессе старения расстояние между глобулами увеличивается. Микроскопия LSBM (light-sheet Bayesian super-resolution microscopy) позволила увидеть, что основной белок гетерохроматина HP1 формирует в ядрах человека сетку [67].

В клетках дрожжей, как показано с помощью SIM, в интерфазе транскрипционно неактивный хроматин менее компактен, чем эухроматин. В то же время обнаружены высококонденсированные тельца, включающие около 50 т.п.н., фланкирующие неактивные теломерные области. Формирование этих телец не зависит от белка HP1, но зависит от метилирования остатка H3K36 [68].

3D-STORM в сочетании с методом Oligopaint был использован для визуализации хроматина, связанного с фактором поликомб, в эмбриональных стволовых клетках и предшественниках нейрональных клеток мыши [69]. Обнаружено формирование компактных областей в локусе генов *Notx*, причем при удалении белка Phc1 наблюдалась декомпактизация хроматина. Эти области состоят из небольших дискретных доменов, содержащих 20–140 т.п.н. ДНК, которые отличаются от топологически ассоциированных доменов (ТАД). В другой работе в ядрах клеток дрозофилы выявлено несколько сотен поликомб-кластеров, которые отличаются от поликомб-телец, изученных ранее. Количество кластеров зависит от целостности полимеризующегося SAM-мотива белка Ph и его содержания в клетке. Возможно, найденные кластеры формируют сеть дальних взаимодействий по всему геному и таким образом поддерживают глобальную архитектуру ядра [70].

Использование метода 3D-SIM позволило установить структуру телец Барра в клетках мышей [71]. Несмотря на значительное уменьшение в размерах, инактивированная X-хромосома сохраняет общую структуру, характерную для нормальной хромосомной территории. Однако при этом значительно уменьшается объем внутренних каналов. Этим же методом определена локализация РНК-связывающих белков Rbm15, Spen, Wtap на Xist РНК [72]. STORM-анализ инактивированной X-хромосомы в фибробластах мыши позволил подсчитать, что на ней присутствует лишь 50–100 молекул Xist и около 50 скоплений комплекса PRC2 [73].

СТРУКТУРА КОНДЕНСИРОВАННЫХ ХРОМОСОМ

Хроматин расположен определенным образом не только вдоль хромосомы (полосы на полите-

ных хромосомах), но и радиально. На митотической X-хромосоме самцов дрозофилы методом SIM продемонстрирована периферическая локализация активно транскрибируемых локусов, начиная с профазы. В целом, в конденсированной митотической хромосоме молчащие области локализуются ближе к ее оси, а активные – ближе к поверхности [74]. 3D-SIM использовали для изучения явления дифференциальной доступности разных локусов метафазой хромосомы в лимфоцитах человека [75].

Схожим образом визуализация хромосом мыши на стадии пахитены с помощью SMLM позволила выявить три типа хроматина [76]. Первый расположен радиально (несет маркер активной транскрипции H3K4me3) и формирует петлеподобные структуры. Второй расположен вдоль оси хромосомы и несет маркер H3K27me3. Наконец, имеется центромерный хроматин, несущий маркер H3K9me3.

С помощью 3D-SIM изучено участие различных форм конденсина в формировании остова хромосомы в клетках курицы. В клетках с нокаутом субъединиц конденсина I митотические хромосомы становились короче и толще, имели размытый остов, а с нокаутом субъединиц конденсина II остов был более четким, хромосомы – более удлиненными и теряли жесткость в аксиальном направлении [77]. Пространственную организацию мейотической хромосомы изучали с использованием различных методов МСВР [78]. В клетках дрожжей методом 3D-SIM показано формирование оси хромосомы из мейотического когезина, а также нарушения в строении хромосом в отсутствие когезина [79, 80].

С помощью STORM визуализированы так называемые T-петли на теломерах мыши. Изучение структуры петли на фоне различных мутаций показало значимость фактора TRF2 для формирования этой структуры [81].

Микроскопию единичных молекул применили к изучению организации центромеры в клетках курицы: центромерный хроматин в них представлен слоями с чередующимися доменами, обогащенными гистонами CENP-A или H3. Во время митоза CENP-C-зависимый механизм сшивает CENP-A-блоки [82]. В клетках дрожжей с помощью PALM проведен подсчет молекул CENP-A в центромере и показано, что этот гистон загружается у дрожжей на центромеру в фазе G2, в отличие от клеток многоклеточных [83].

Методом SIM на клетках различных видов растений показано, что гистон CENH3 и модифицированный гистон H2A^{Thr120P} встраиваются в различные нуклеосомы, которые формируют различные домены [84]. У ячменя два варианта центромерного гистона, альфа- и бета-CENH3, встраиваются в различные

домены центромерного хроматина в интерфазе, причем паттерн встраивания тканеспецифичен [85].

ТРАНСКРИПЦИЯ

МСВР использовали для визуализации процессов, происходящих при активации транскрипции генов. Методом STORM показано, что при активации гена *Hoxd* млекопитающих его локус декомпактизуется и принимает вытянутую конфигурацию [86]. В клетках мыши с помощью 3D-SIM визуализирован локус бета-глобина: неактивный локус имеет несколько различных конформаций, в процессе дифференцировки клеток локус уменьшается в размере, и его структура становится более упорядоченной [87]. На препаратах расправленного хроматина из клеток HeLa методом BALM была визуализирована локальная деконденсация хроматина в локусах активной транскрипции также. Стимуляция клеток приводила к появлению областей открытого хроматина длиной около 388 нм и толщиной около 60 нм, обогащенных активной формой РНК-полимеразы II [88]. С помощью этого же метода визуализированы дальние контакты, возникающие в геноме отдельной клетки при участии факторов транскрипции YAP, SRF, NF-κарраВ [89].

Микроскопия единичных молекул, соединенная с микроскопией светового листа, позволила провести количественный анализ транскрипционных фабрик в клетках млекопитающих [90]. Обнаружено, что более 70% сайтов транскрипции содержат только одну молекулу РНК-полимеразы II, что противоречит существующим моделям. Изучена динамика транскрипционных фабрик [31, 91]: эти фабрики не являются статичными структурами, они могут формироваться в ядре при стимуляции клетки. Формирование фабрик не блокируется ингибиторами элонгации РНК-полимеразы II, т.е. они формируются на стадии инициации транскрипции.

Концепция транскрипции на иммобилизованной транскрипционной фабрике получила подтверждение с помощью МСВР. Индукция клеток человека цитокином приводит к сближению в ядре двух генов, удаленно расположенных в геноме, причем их транскрипты также локализуются вблизи друг друга [92]. В этой же модели проведена визуализация процесса индуцированной транскрипции на матрице длинного гена (221 т.п.н.) [93]. Транскрипционная фабрика первоначально связывает промотор гена, после чего начинается протягивание матрицы ДНК через эту транскрипционную фабрику. Промотор при этом некоторое время остается рядом с РНК-полимеразой, однако затем он может терять связь и реинициация может произойти на другой фабрике.

Визуализация транскрипции на хромосомах типа ламповых щеток позволила увидеть процесс упа-

ковки новосинтезированной РНК с помощью метода dSTORM. Сплайсинг и плотная упаковка мРНК приводят к тому, что толщина транскрибируемой петли хроматина в целом остается практически неизменной вдоль активного гена [94].

У растений изучение распределения различных форм РНК-полимеразы II с помощью SIM и PALM показало существование сетей этих молекул в эухроматине, причем разные формы формируют различные сетки [95, 96]. Обнаружено увеличение количества молекул полимеразы в ядре полиплоидных клеток, в целом пропорциональное общему количеству генов. Возможно, что у растений существует другой способ организации транскрипции, отличный от транскрипционных фабрик млекопитающих.

Локализацию факторов транскрипции в ядре изучают, в основном, с помощью SMLM. Показано, что сайты связывания фактора транскрипции Sox2 у мышей кластеризуются в ядре, что играет важную роль в регуляции транскрипции его генов-мишеней [97]. Схожим образом фактор STAT1 человека формирует кластеры, причем размер и количество этих кластеров существенно возрастают при переходе от G1- к G2-фазе клеточного цикла, а также при стимуляции клетки цитокином [98]. Фактор транскрипции FoxP3 в T-клетках формирует два типа комплексов с другими факторами – активационный, располагающийся ближе к центру ядра, и репрессивный, локализующийся на периферии ядра [99]. МСВР применяли для изучения распределения гистона H2A и субъединицы хроматинремоделирующего фактора Snf2H [100], белка эухроматина MAD2L2 [101].

4Pi-микроскопию применили к изучению внутреннего строения телец PML в клетках человека. Транскрипционные факторы Sp100 и PML формируют оболочку телец толщиной 50–100 нм, проницаемую для белков. Внутренняя область телец содержит полимеризованные остатки белка SUMO, что служит основой концентрации SUMO-связывающих факторов в тельцах [102].

Изучение ядрышка в клетках человека с помощью SMLM показало, что, как и ядро в целом, оно имеет очень неоднородную структуру: содержит области с высокой и низкой концентрацией новосинтезированной РНК [103].

РЕПЛИКАЦИЯ

Методом STED-микроскопии с использованием меченых белков PCNA и RPA изучена структура репликационных фабрик в клетках человека [104]. Показано, что диаметр репликационных фабрик составляет в среднем 160 нм. В ранней S-фазе детектируется до 1400 фабрик с двумя-тремя вилка-

ми репликации каждая. Размер фабрик в клетках мыши, оцененный с применением SIM и SMI, составил 125 нм [105]. В клетках млекопитающих в S-фазе с помощью SIM выявлено около 5000 репликационных фабрик, каждая из которых представляла отдельный сайт репликации [106].

Изучение процесса репликации в клетках дрожжей с применением SIM показало, что кластеризация репликонов в отдельных репликационных фабриках является стохастическим процессом и сильно варьирует от клетки к клетке, однако, однажды объединившись в одной фабрике, репликоны остаются стабильно связанными [107]. С помощью SIM показано, что в клетках млекопитающих репликация периферического гетерохроматина, тесно связанного с ламинной, происходит без разборки последней [108].

МСВР позволила увидеть новую функцию фактора репликации Cdt1 в формировании протяженной конформации кинетохорного комплекса Ndc80 и его стабильной связи с микротрубочками в митозе клеток человека [109]. Получены данные о расположении компонентов кинетохора хромосом дрозофилы и роли белка Spc105 в сборке этой структуры [110]. Также изучено строение кинетохора в клетках дрожжей [111] и человека [112]. Визуализация митоза позволила проследить динамику переключения направления движения сестринских кинетохоров при прохождении метафазы [113].

Координация репликации и транскрипции изучена в клетках млекопитающих [114]. Показано, что в ядрышках, где активно транскрибируются гены рРНК, между этими процессами наблюдается сильная отрицательная корреляция. В то же время в нуклеоплазме эта корреляция не выявлена.

РЕПАРАЦИЯ И РЕКОМБИНАЦИЯ

Процесс репарации также изучен с помощью МСВР [115]. Паттерн локализации гистона gamma-H2AX (маркера двухцепочечных разрывов ДНК) и динамика сайтов его локализации изучены в ряде работ разными методами [116–118]. Также изучено взаимное расположение gamma-H2AX и репарационного комплекса Ku, подсчитано количество молекул этого комплекса на сайте репарации [119]. dSTORM был использован для выяснения молекулярных основ процесса негомологичного соединения концов в клетках человека: установлено, что концы ДНК сначала взаимодействуют друг с другом посредством белковых филаментов, затем выравниваются друг относительно друга и происходит лигирование [120].

С помощью 3D-SIM показано, что в клетках HeLa паттерн белков BRCA1 и 53BP1 внутри фокусов репарации является взаимоисключающим. Возможно, их взаимное расположение определяет выбор пути

репарации [121]. STED-микроскопию использовали для визуализации факторов репарации gamma-H2AX, 53BP1 и Rad51 в клетках HeLa после воздействия ионизирующего излучения. Первые два белка формируют области, размеры которых зависят от энергии излучения (540 нм для сильного и 412 нм для более слабого излучения), причем эти области имеют внутреннюю структуру и наблюдается отрицательная корреляция в распределении этих двух белков. Rad51 формирует области, лишенные внутренней структуры, размер которых (135 нм) не зависит от энергии излучения [122]. С помощью dSTORM установлено, что в клетках человека партнеры BRCA2 и Rad51 локализуются в разных сайтах репарируемой ДНК, что говорит об различной динамике их взаимодействия с ДНК [123]. С использованием STED и 3D-SIM на клетках человека показано, что маркер разрыва gamma-H2AX распределяется по близлежащим петлям хроматина, этот процесс контролируется белком CTCF. Таким образом, фокус репарации представляет собой тесную группу «нанофокусов», каждый из которых является петлей хроматина [124].

С использованием различных методов МСВР в клетках ячменя и пшеницы [125, 126], мыши [127], *Caenorhabditis elegans* [128], а также дрожжей [129] был визуализирован и изучен синаптонемный комплекс, формирующийся при мейозе между гомологичными хромосомами.

ЯДЕРНАЯ ОБОЛОЧКА

Ядерная мембрана содержит множество трансмембранных белков. Для их локализации разработаны методы МСВР, имеющие аксиальное разрешение менее 10 нм [130, 131].

Структура важнейшего из компонентов периферии ядра – ядерной поры – изучена с помощью различных методов МСВР с высокой точностью. У разных организмов определены размеры поры [132], положение основных субъединиц [133, 134], визуализирован процесс ее сборки [135]. Суммирование изображений нескольких тысяч индивидуальных ядерных пор позволило провести структурный анализ поры с точностью менее 1 нм [136]. Определены локализация и распределение по оболочке отдельных субъединиц ядерной поры [137–141]. С помощью МСВР изучен контакт нуклеопоринов с транспортными рецепторами [142], показан контакт ядерной поры с активным локусом [143].

Высокоскоростная SPEED-микроскопия с разрешением 8 нм в пространстве и 2 мс во времени позволила проследить процесс транспорта через ядерную пору в клетках человека [144]. Показано, что только 36% молекул мРНК, входящих в пору, успешно

экспортируются в цитоплазму, причем время непосредственного транспорта занимает около 12 мс. Изучена также кинетика транспорта мРНК через ядерные поры в клетках мыши с разрешением 26 нм в пространстве и 20 мс по времени [145]. Показано, что процесс экспорта – это трехстадийный процесс, включающий в посадку на пору (80 мс), перенос (5–20 мс) и освобождение (80 мс) транскрипта.

Изучение периферии ядра показало, что в ламине существуют инвагинации, неразличимые с помощью конфокальной микроскопии [146]. Инвагинации описаны в интерфазном ядре в различных типах клеток, однако их функции остаются неясными. Возможно, они играют роль в транспорте мРНК [147].

SIM-микроскопия позволила изучить связь ядерной ламины с актиновым цитоскелетом в клетках человека. Оказалось, что механическое давление актиновой нити вызывает формирование впячивания на ламине и появление доменов конденсированного хроматина [148].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность световой микроскопии всегда оставалась высокой для изучения внутриядерных процессов. Интенсивно развивающаяся группа методов МСВР открывает новые перспективы в этой области [149]. Важно отметить, что теоретически МСВР мо-

жет достигнуть разрешения вплоть до 1 нм, поэтому она является уникальным инструментом, позволяющим изучать процессы в масштабе от отдельной молекулы до целой клетки. Помимо решения фундаментальных задач, МСВР находит свое применение в изучении процессов, происходящих в ядрах клеток при различных патологиях. МСВР была использована при изучении детской геродермии [150], болезни Альцгеймера [151], гипоксии и голодания кардиомиоцитов, онкогенеза [21, 152], вирусных инфекций [150, 151]. Разрабатываются методы диагностики заболеваний, в частности онкологических, с применением МСВР [153].

Приведенные в обзоре данные показывают, что МСВР уже позволила существенно расширить наши знания о функционировании ядра на разных уровнях его организации. В то же время можно видеть, насколько мало использован ресурс этого мощного метода к настоящему моменту. Несомненно, сочетание МСВР с другими современными методами станет в ближайшем будущем основой новых открытий в области биологии клеточного ядра. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Министерства образования и науки РФ
14.613.21.0036 (уникальный идентификатор
RFMEFI61315X0036).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Vivante A., Brozgol E., Bronshtein I., Garini Y. // *Methods*. 2017. V. 123. P. 128–137.
- Flyamer I.M., Gassler J., Imakaev M., Brandao H.B., Ulianov S.V., Abdennur N., Razin S.V., Mirny L.A., Tachibana-Konwalski K. // *Nature*. 2017. V. 544. № 7648. P. 110–114.
- Sati S., Cavalli G. // *Chromosoma*. 2017. V. 126. № 1. P. 33–44.
- Candès E.J., Fernandez-Granda C. // *Commun. Pure Appl. Mathematics*. 2014. V. 67. № 6. P. 906–956.
- Hell S.W. // *Science*. 2007. V. 316. № 5828. P. 1153–1158.
- Nienhaus K., Nienhaus G.U. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 2 Pt A. P. 308–322.
- Turkowsky B., Virant D., Endesfelder U. // *Analyt. Bioanal. Chem.* 2016. V. 408. № 25. P. 6885–6911.
- Han R., Li Z., Fan Y., Jiang Y. // *J. Genet. Genom. = Yi chuan xue bao*. 2013. V. 40. № 12. P. 583–595.
- Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A., Ha T., Goldman Y.E., Selvin P.R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5628. P. 2061–2065.
- Cremer C., Szczurek A., Schock F., Gourram A., Birk U. // *Methods*. 2017. V. 123. P. 11–32.
- Klementieva N.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Sovrem. Tehnol. Med.* 2016. V. 8. № 2. P. 130–138.
- Huang F., Sirinakis G., Allgeyer E.S., Schroeder L.K., Duim W.C., Kromann E.B., Phan T., Rivera-Molina F.E., Myers J.R., Irnov I., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 4. P. 1028–1040.
- Watanabe S., Punge A., Hoppel G., Willig K.I., Hobson R.J., Davis M.W., Hell S.W., Jorgensen E.M. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 80–84.
- Benke A., Olivier N., Gunzenhauser J., Manley S. // *Nano Lett.* 2012. V. 12. № 5. P. 2619–2624.
- Flors C. // *Biopolymers*. 2011. V. 95. № 5. P. 290–297.
- Flors C. // *J. Microsc.* 2013. V. 251. № 1. P. 1–4.
- Klein T., Loschberger A., Proppert S., Wolter S., van de Linde S., Sauer M. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 7–9.
- Wombacher R., Heidebreder M., van de Linde S., Sheetz M.P., Heilemann M., Cornish V.W., Sauer M. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 9. P. 717–719.
- Szczurek A.T., Prakash K., Lee H.K., Zurek-Biesiada D.J., Best G., Hagmann M., Dobrucki J.W., Cremer C., Birk U. // *Nucleus*. 2014. V. 5. № 4. P. 331–340.
- Sreedharan S., Gill M.R., Garcia E., Saeed H.K., Robinson D., Byrne A., Cadby A., Keyes T.E., Smythe C., Pellett P., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 44. P. 15907–15913.
- Szczurek A., Klewes L., Xing J., Gourram A., Birk U., Knecht H., Dobrucki J.W., Mai S., Cremer C. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. e56.
- Vranken C., Deen J., Dirix L., Stakenborg T., Dehaen W., Leen V., Hofkens J., Neely R.K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 7. P. e50.
- Zessin P.J., Finan K., Heilemann M. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 2. P. 344–348.
- Dong B., Almassalha L.M., Stypula-Cyrus Y., Urban B.E., Chandler J.E., Nguyen T.Q., Sun C., Zhang H.F., Backman V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 35. P. 9716–9721.
- Markaki Y., Smeets D., Fiedler S., Schmid V.J., Schermelleh L., Cremer T., Cremer M. // *Bioessays*. 2012. V. 34. № 5. P. 412–426.
- Jungmann R., Avendano M.S., Woehrstein J.B., Dai M., Shih W.M., Yin P. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 3. P. 313–318.
- Schueder F., Strauss M.T., Hoerl D., Schnitzbauer J., Schlichthaerle T., Strauss S., Yin P., Harz H., Leonhardt H.,

- Jungmann R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017. V. 56. № 14. P. 4052–4055.
28. Wang Y., Woehrstein J.B., Donoghue N., Dai M., Avendano M.S., Schackmann R.C.J., Zoeller J.J., Wang S.S.H., Tillberg P.W., Park D., et al. // *Nano Lett.* 2017. V. 17. № 10. P. 6131–6139.
29. Anton T., Bultmann S., Leonhardt H., Markaki Y. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 2. P. 163–172.
30. Baday M., Cravens A., Hastie A., Kim H., Kudaki D.E., Kwok P.Y., Xiao M., Selvin P.R. // *Nano Lett.* 2012. V. 12. № 7. P. 3861–3866.
31. Kamiyama D., Huang B. // *Developmental Cell.* 2012. V. 23. № 6. P. 1103–1110.
32. Benke A., Manley S. // *Chembiochem.* 2012. V. 13. № 2. P. 298–301.
33. Dai M., Jungmann R., Yin P. // *Nat. Nanotechnol.* 2016. V. 11. № 9. P. 798–807.
34. Jeffert J., Kobo A., Su T., Grunwald A., Green O., Nilsson A.N., Eisenberg E., Ambjornsson T., Westerlund F., Weinhold E., et al. // *ACS Nano.* 2016. V. 10. № 11. P. 9823–9830.
35. Weiland Y., Lemmer P., Cremer C. // *Chromosome Res.* 2011. V. 19. № 1. P. 5–23.
36. Stuhlmüller M., Schwarz-Finsterle J., Fey E., Lux J., Bach M., Cremer C., Hinderhofer K., Hausmann M., Hildenbrand G. // *Nanoscale.* 2015. V. 7. № 42. P. 17938–17946.
37. Beliveau B.J., Boettiger A.N., Avendano M.S., Jungmann R., McCole R.B., Joyce E.F., Kim-Kiselak C., Bantignies F., Fonseka C.Y., Erceg J., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7147.
38. Ni Y., Cao B., Ma T., Niu G., Huo Y., Huang J., Chen D., Liu Y., Yu B., Zhang M.Q., et al. // *Elife.* 2017. V. 6. P. e21660.
39. Hildenbrand G., Rapp A., Spori U., Wagner C., Cremer C., Hausmann M. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. № 6. P. 4312–4318.
40. Esa A., Edelmann P., Kreth G., Trakhtenbrot L., Amariglio N., Rechavi G., Hausmann M., Cremer C. // *J. Microsc.* 2000. V. 199. № 2. P. 96–105.
41. Rauch J., Knoch T.A., Solovei I., Teller K., Stein S., Buiting K., Horsthemke B., Langowski J., Cremer T., Hausmann M., et al. // *Differentiation; Res. Biolog. Diversity.* 2008. V. 76. № 1. P. 66–82.
42. Hewitson T.D., Holt S.G., Tan S.J., Wigg B., Samuel C.S., Smith E.R. // *Front. Pharmacol.* 2017. V. 8. P. 307.
43. Tajbakhsh J., Stefanovski D., Tang G., Wawrowsky K., Liu N., Fair J.H. // *Exp. Cell. Res.* 2015. V. 332. № 2. P. 190–201.
44. Karathanasis C., Fricke F., Hummer G., Heilemann M. // *Chemphyschem.: Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 2017. V. 18. № 8. P. 942–948.
45. Wollman A.J., Leake M.C. // *Faraday Discuss.* 2015. V. 184. P. 401–424.
46. Zancchi F.C., Manzo C., Alvarez A.S., Derr N.D., Garcia-Parajo M.F., Lakadamyali M. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 8. P. 789–792.
47. Agasti S.S., Wang Y., Schueder F., Sukumar A., Jungmann R., Yin P. // *Chem. Sci.* 2017. V. 8. № 4. P. 3080–3091.
48. Georgieva M., Cattoni D.I., Fiche J.B., Mutin T., Chamoussat D., Nollmann M. // *Methods.* 2016. V. 105. P. 44–55.
49. Ricci M.A., Cosma M.P., Lakadamyali M. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017. V. 46. P. 186–193.
50. Hubner B., Lomiento M., Mammoli F., Illner D., Markaki Y., Ferrari S., Cremer M., Cremer T. // *Epigenet. Chromatin.* 2015. V. 8. P. 47.
51. Patel N.S., Rhinn M., Semprich C.I., Halley P.A., Dolle P., Bickmore W.A., Storey K.G. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 7. P. e1003614.
52. Popken J., Graf A., Krebs S., Blum H., Schmid V.J., Strauss A., Guengoer T., Zakhartchenko V., Wolf E., Cremer T. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 5. P. e0124619.
53. Popken J., Koehler D., Brero A., Wuensch A., Guengoer T., Thormeyer T., Wolf E., Cremer T., Zakhartchenko V. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 6. P. 542–554.
54. Wang R., Kamgoue A., Normand C., Leger-Silvestre I., Mangeat T., Gadalo O. // *J. Cell. Sci.* 2016. V. 129. № 24. P. 4480–4495.
55. Markaki Y., Gunkel M., Schermelleh L., Beichmanis S., Neumann J., Heidemann M., Leonhardt H., Eick D., Cremer C., Cremer T. // *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 2010. V. 75. P. 475–492.
56. Cremer T., Cremer M., Hubner B., Strickfaden H., Smeets D., Popken J., Sterr M., Markaki Y., Rippe K., Cremer C. // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. № 20 Pt A. P. 2931–2943.
57. Cremer M., Schmid V.J., Kraus F., Markaki Y., Hellmann I., Maiser A., Leonhardt H., John S., Stamatoyannopoulos J., Cremer T. // *Epigenetics Chromatin.* 2017. V. 10. № 1. P. 39.
58. Fiserova J., Efenberkova M., Sieger T., Maninova M., Uhlirva J., Hozak P. // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. № 12. P. 2066–2077.
59. Bohn M., Diesinger P., Kaufmann R., Weiland Y., Muller P., Gunkel M., von Ketteler A., Lemmer P., Hausmann M., Heermann D.W., et al. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. № 5. P. 1358–1367.
60. Recamier V., Izeddin I., Bosanac L., Dahan M., Proux F., Darzacq X. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 1. P. 75–84.
61. Nozaki T., Imai R., Tanbo M., Nagashima R., Tamura S., Tani T., Joti Y., Tomita M., Hibino K., Kanemaki M.T., et al. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 2. P. 282–293.
62. Matsuda A., Shao L., Boulanger J., Kervrann C., Carlton P.M., Kner P., Agard D., Sedat J.W. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 9. P. e12768.
63. Mitchell-Jordan S., Chen H., Franklin S., Stefani E., Bentolila L.A., Vondriska T.M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. V. 53. № 4. P. 552–558.
64. Ricci M.A., Manzo C., Garcia-Parajo M.F., Lakadamyali M., Cosma M.P. // *Cell.* 2015. V. 160. № 6. P. 1145–1158.
65. Boettiger A.N., Bintu B., Moffitt J.R., Wang S., Beliveau B.J., Fudenberg G., Imakaev M., Mirny L.A., Wu C.T., Zhuang X. // *Nature.* 2016. V. 529. № 7586. P. 418–422.
66. Swanson E.C., Rapkin L.M., Bazett-Jones D.P., Lawrence J.B. // *Nucleus.* 2015. V. 6. № 4. P. 254–260.
67. Hu Y.S., Zhu Q., Elkins K., Tse K., Li Y., Fitzpatrick J.A., Verma I.M., Cang H. // *Opt. Nanoscopy.* 2013. V. 2. № 1. P. e7.
68. Matsuda A., Chikashige Y., Ding D.Q., Ohtsuki C., Mori C., Asakawa H., Kimura H., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7753.
69. Kundu S., Ji F., Sunwoo H., Jain G., Lee J.T., Sadreyev R.I., Dekker J., Kingston R.E. // *Mol. Cell.* 2017. V. 65. № 3. P. 432–446.
70. Wani A.H., Boettiger A.N., Schorderet P., Ergun A., Munger C., Sadreyev R.I., Zhuang X., Kingston R.E., Francis N.J. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 10291.
71. Smeets D., Markaki Y., Schmid V.J., Kraus F., Tattermusch A., Cerase A., Sterr M., Fiedler S., Demmerle J., Popken J., et al. // *Epigenetics Chromatin.* 2014. V. 7. P. 8.
72. Moindrot B., Cerase A., Coker H., Masui O., Grijzenhout A., Pintacuda G., Schermelleh L., Nesterova T.B., Brockdorff N. // *Cell. Rep.* 2015. V. 12. № 4. P. 562–572.
73. Sunwoo H., Wu J.Y., Lee J.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 31. P. E4216–4225.
74. Strukov Y.G., Sural T.H., Kuroda M.I., Sedat J.W. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 1. P. e1000574.
75. Khan W.A., Rogan P.K., Knoll J.H. // *Mol. Cytogenet.* 2015. V. 8. P. 65.
76. Prakash K., Fournier D., Redl S., Best G., Borsos M., Tiwari V.K., Tachibana-Konwalski K., Ketting R.F., Parekh S.H.,

- Cremer C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 47. P. 14635–14640.
77. Green L.C., Kalitsis P., Chang T.M., Cipetic M., Kim J.H., Marshall O., Turnbull L., Whitchurch C.B., Vagnarelli P., Samejima K., et al. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 6. P. 1591–1604.
78. Carlton P.M. // *Biophys. Rev.* 2013. V. 5. № 4. P. 313–322.
79. Ding D.Q., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Curr. Genet.* 2016. V. 62. № 3. P. 499–502.
80. Ding D.Q., Matsuda A., Okamasa K., Nagahama Y., Haraguchi T., Hiraoka Y. // *Chromosoma*. 2016. V. 125. № 2. P. 205–214.
81. Doksanı Y., Wu J.Y., de Lange T., Zhuang X. // *Cell*. 2013. V. 155. № 2. P. 345–356.
82. Ribeiro S.A., Vagnarelli P., Dong Y., Hori T., McEwen B.F., Fukagawa T., Flors C., Earnshaw W.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 23. P. 10484–10489.
83. Lando D., Endesfelder U., Berger H., Subramanian L., Dunne P.D., McColl J., Klenerman D., Carr A.M., Sauer M., Allshire R.C., et al. // *Open Biol.* 2012. V. 2. № 7. P. 120078.
84. Demidov D., Schubert V., Kumke K., Weiss O., Karimi-Ashtiyani R., Buttler J., Heckmann S., Wanner G., Dong Q., Han F., et al. // *Cytogenet. Genome Res.* 2014. V. 143. № 1–3. P. 150–156.
85. Ishii T., Karimi-Ashtiyani R., Banaei-Moghaddam A.M., Schubert V., Fuchs J., Houben A. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 2. P. 277–284.
86. Fabre P.J., Benke A., Joye E., Nguyen Huynh T.H., Manley S., Duboule D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 45. P. 13964–13969.
87. van de Corput M.P., de Boer E., Knoch T.A., van Cappellen W.A., Quintanilla A., Ferrand L., Grosveld F.G. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 19. P. 4630–4639.
88. Wang Y., Maharana S., Wang M.D., Shivashankar G.V. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4477.
89. Wang Y., Ratna P., Shivashankar G.V. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 42422.
90. Zhao Z.W., Roy R., Gebhardt J.C., Suter D.M., Chapman A.R., Xie X.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 2. P. 681–686.
91. Chen X., Wei M., Zheng M.M., Zhao J., Hao H., Chang L., Xi P., Sun Y. // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 2. P. 2447–2454.
92. Papantonis A., Larkin J.D., Wada Y., Ohta Y., Ihara S., Kodama T., Cook P.R. // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. № 7. P. e1000419.
93. Larkin J.D., Papantonis A., Cook P.R., Marenduzzo D. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 4. P. 2216–2227.
94. Kaufmann R., Cremer C., Gall J.G. // *Chromosome Res.* 2012. V. 20. № 8. P. 1009–1015.
95. Schubert V. // *Cytogenet. Genome Res.* 2014. V. 143. № 1–3. P. 69–77.
96. Schubert V., Weisshart K. // *J. Exp. Botany*. 2015. V. 66. № 6. P. 1687–1698.
97. Liu Z., Legant W.R., Chen B.C., Li L., Grimm J.B., Lavis L.D., Betzig E., Tjian R. // *Elife*. 2014. V. 3. P. e04236.
98. Gao J., Wang F., Liu Y., Cai M., Xu H., Jiang J., Wang H. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 9045.
99. Kwon H.K., Chen H.M., Mathis D., Benoist C. // *Nat. Immunol.* 2017. V. 18. № 11. P. 1238–1248.
100. Gunkel M., Erdel F., Rippe K., Lemmer P., Kaufmann R., Hormann C., Amberger R., Cremer C. // *Biotechnol. J.* 2009. V. 4. № 6. P. 927–938.
101. Rahjouei A., Pirouz M., Di Virgilio M., Kamin D., Kessel M. // *Stem Cell Repts.* 2017. V. 8. № 4. P. 813–821.
102. Lang M., Jegou T., Chung I., Richter K., Munch S., Udvarhelyi A., Cremer C., Hemmerich P., Engelhardt J., Hell S.W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2010. V. 123. № 3. P. 392–400.
103. Szczurek A., Xing J., Birk U.J., Cremer C. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 114.
104. Cseresnyes Z., Schwarz U., Green C.M. // *BMC Cell. Biol.* 2009. V. 10. P. 88.
105. Baddeley D., Chagin V.O., Schermelleh L., Martin S., Pombo A., Carlton P.M., Gahl A., Domaing P., Birk U., Leonhardt H., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 2. P. e8.
106. Chagin V.O., Casas-Delucchi C.S., Reinhart M., Schermelleh L., Markaki Y., Maiser A., Bolius J.J., Bensimon A., Fillies M., Domaing P., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11231.
107. Saner N., Karschau J., Natsume T., Gierlinski M., Retkute R., Hawkins M., Nieduszynski C.A., Blow J.J., de Moura A.P., Tanaka T.U. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 202. № 7. P. 1001–1012.
108. Zhironkina O.A., Kurchashova S.Y., Bratseva A.L., Cherepanynets V.D., Strelkova O.S., Belmont A.S., Kireev, II. // *Tsitologiya*. 2014. V. 56. № 12. P. 899–906.
109. Varma D., Chandrasekaran S., Sundin L.J., Reidy K.T., Wan X., Chasse D.A., Nevis K.R., DeLuca J.G., Salmon E.D., Cook J.G. // *Nat. Cell. Biol.* 2012. V. 14. № 6. P. 593–603.
110. Venkei Z., Przewloka M.R., Ladak Y., Albadri S., Sossick A., Juhasz G., Novak B., Glover D.M. // *Open Biol.* 2012. V. 2. № 2. P. 110032.
111. Joglekar A.P., Bloom K., Salmon E.D. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 8. P. 694–699.
112. Wan X., O'Quinn R.P., Pierce H.L., Joglekar A.P., Gall W.E., DeLuca J.G., Carroll C.W., Liu S.T., Yen T.-J., McEwen B.F., et al. // *Cell*. 2009. V. 137. № 4. P. 672–684.
113. Burroughs N.J., Harry E.F., McAinsh A.D. // *Elife*. 2015. V. 4. P. e09500.
114. Smirnov E., Borkovec J., Kovacic L., Svidenska S., Schrofel A., Skalnikova M., Svindrych Z., Krizek P., Ovesny M., Hagen G.M., et al. // *J. Struct. Biol.* 2014. V. 188. № 3. P. 259–266.
115. Uphoff S., Kapanidis A.N. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 20. P. 32–40.
116. Bach M., Savini C., Krufczik M., Cremer C., Rosl F., Hausmann M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 8. P. 1726.
117. Bewersdorf J., Bennett B.T., Knight K.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 48. P. 18137–18142.
118. D'Abrantes S., Gratton S., Reynolds P., Kriechbaumer V., McKenna J., Barnard S., Clarke D., Botchway S.W. // *Radiat. Res.* 2017. doi: 10.1667/RR14594.1.
119. Britton S., Coates J., Jackson S.P. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 202. № 3. P. 579–595.
120. Reid D.A., Keegan S., Leo-Macias A., Watanabe G., Strande N.T., Chang H.H., Oksuz B.A., Fenyó D., Lieber M.R., Ramsden D.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 20. P. E2575–2584.
121. Chapman J.R., Sossick A.J., Boulton S.J., Jackson S.P. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 15. P. 3529–3534.
122. Reindl J., Girst S., Walsh D.W., Greubel C., Schwarz B., Siebenwirth C., Drexler G.A., Friedl A.A., Dollinger G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40616.
123. Sanchez H., Paul M.W., Grosbart M., van Rossum-Fikkert S.E., Lebbink J.H.G., Kanaar R., Houtsmuller A.B., Wyman C. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 8. P. 4507–4518.
124. Natale F., Rapp A., Yu W., Maiser A., Harz H., Scholl A., Grulich S., Anton T., Horl D., Chen W., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15760.
125. Colas I., Darrier B., Arrieta M., Mittmann S.U., Ramsay L., Sourdille P., Waugh R. // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 1235.
126. Phillips D., Nibau C., Wnetrzak J., Jenkins G. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 6. P. e39539.
127. Qiao H., Chen J.K., Reynolds A., Hoog C., Paddy M., Hunter N. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P. e1002790.

128. Sato-Carlton A., Li X., Crawley O., Testori S., Martinez-Perez E., Sugimoto A., Carlton P.M. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 10. P. e1004638.
129. Lao J.P., Cloud V., Huang C.C., Grubb J., Thacker D., Lee C.Y., Dresser M.E., Hunter N., Bishop D.K. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. № 12. P. e1003978.
130. Chizhik A.M., Ruhlandt D., Pfaff J., Karedla N., Chizhik A.I., Gregor I., Kehlenbach R.H., Enderlein J. // *ACS Nano.* 2017. doi: 10.1021/acsnano.7b04671.
131. Mudumbi K.C., Schirmer E.C., Yang W. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12562.
132. Huve J., Wesselmann R., Kahms M., Peters R. // *Biophys. J.* 2008. V. 95. № 2. P. 877–885.
133. Loschberger A., Franke C., Krohne G., van de Linde S., Sauer M. // *J. Cell. Sci.* 2014. V. 127. № 20. P. 4351–4355.
134. Loschberger A., van de Linde S., Dabauvalle M.C., Rieger B., Heilemann M., Krohne G., Sauer M. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. № 3. P. 570–575.
135. Otsuka S., Szyborska A., Ellenberg J. // *Meth. Cell. Biol.* 2014. V. 122. P. 219–238.
136. Szyborska A., de Marco A., Daigle N., Cordes V.C., Briggs J.A., Ellenberg J. // *Science.* 2013. V. 341. № 6146. P. 655–658.
137. Chatel G., Desai S.H., Mattheyses A.L., Powers M.A., Fahrenkrog B. // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 177. № 1. P. 81–89.
138. Dahan-Pasternak N., Nasereddin A., Kolevzon N., Pe'er M., Wong W., Shinder V., Turnbull L., Whitchurch C.B., Elbaum M., Gilberger T.W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. № 14. P. 3055–3069.
139. Gottfert F., Wurm C.A., Mueller V., Berning S., Cordes V.C., Honigsmann A., Hell S.W. // *Biophys. J.* 2013. V. 105. № 1. P. L01–03.
140. Kinoshita Y., Kalir T., Dottino P., Kohtz D.S. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 4. P. e36137.
141. Ma J., Kelich J.M., Junod S.L., Yang W. // *J. Cell. Sci.* 2017. V. 130. № 7. P. 1299–1306.
142. Ma J., Goryaynov A., Yang W. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. № 3. P. 239–247.
143. Rohner S., Kalck V., Wang X., Ikegami K., Lieb J.D., Gasser S.M., Meister P. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 200. № 5. P. 589–604.
144. Ma J., Liu Z., Michelotti N., Pitchiaya S., Veerapaneni R., Androsavich J.R., Walter N.G., Yang W. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2414.
145. Grunwald D., Singer R.H. // *Nature.* 2010. V. 467. № 7315. P. 604–607.
146. Schermelleh L., Carlton P.M., Haase S., Shao L., Winoto L., Kner P., Burke B., Cardoso M.C., Agard D.A., Gustafsson M.G., et al. // *Science.* 2008. V. 320. № 5881. P. 1332–1336.
147. Schoen I., Aires L., Ries J., Vogel V. // *Nucleus.* 2017. P. 506–514.
148. Versaevel M., Braquenier J.B., Riaz M., Grevesse T., Lantoine J., Gabriele S. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 7362.
149. Cremer C., Birk U. // *Front. Physics.* 2016. V. 4. P. 11.
150. Chojnowski A., Ong P.F., Wong E.S., Lim J.S., Mutalif R.A., Navasankari R., Dutta B., Yang H., Liow Y.Y., Sze S.K., et al. // *Elife.* 2015. V. 4. P. e07759.
151. Garcia A., Huang D., Righolt A., Righolt C., Kalaw M.C., Mathur S., McAvoy E., Anderson J., Luedke A., Itorralba J., et al. // *J. Cell. Physiol.* 2016. V. 232. № 9. P. 2387–2395.
152. Kirmes I., Szczurek A., Prakash K., Charapitsa I., Heiser C., Musheev M., Schock F., Fornalczyk K., Ma D., Birk U., et al. // *Genome Biol.* 2015. V. 16. P. 246.
153. Hausmann M., Ilic N., Pilarczyk G., Lee J.H., Logeswaran A., Borroni A.P., Krufczik M., Theda F., Waltrich N., Bestvater F., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 10. P. 2066.

УДК 576.315.42

Трансляционная кросс-активация геномных РНК потексвирусов в составе вирионов

М. В. Архипенко*, Н. А. Никитин, Е. К. Донченко, О. В. Карпова, И. Г. Атабеков

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

*E-mail: armar@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 02.03.2017

Принята к печати 03.10.2017

РЕФЕРАТ Ранее мы показали, что геномная РНК двух представителей потексвирусов – X-вируса картофеля и вируса мозаики альтернантеры – недоступна *in vitro* для рибосом в составе вирусных частиц, но может быть трансляционно активирована при взаимодействии вириона с транспортным белком 1 (ТБ1). С целью изучения механизмов трансляционной активации вирусной РНК потексвирусов нами исследованы трансляционные свойства двух других представителей этого рода – вируса мозаики нарцисса и вируса аукубы-мозаики картофеля. Показано, что в составе вирионов РНК потексвирусов обладает общими трансляционными свойствами *in vitro*, и ТБ1 способен трансляционно активировать РНК не только своего, гомологичного, вириона, но и РНК в составе вирионов других представителей группы (кросс-активация), проявляя при этом избирательную специфичность. Взаимная трансляционная кросс-активация происходит у вирусов, принадлежащих к одной или к близким филогенетическим подгруппам. Получены прямые доказательства того, что связывание ТБ1 с торцом вириона является обязательным, но недостаточным условием для трансляционной активации инкапсидированной РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирусы растений, геномная РНК, кросс-активация, потексвирусы, трансляционная активация, транспортный белок 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БО – белок оболочки; ВАМК – вирус аукубы-мозаики картофеля; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; ВМН – вирус мозаики нарцисса; ТБ1 – транспортный белок 1; ХВК – X-вирус картофеля.

ВВЕДЕНИЕ

Некоторое время назад в нашей лаборатории было показано, что геномная РНК одного из представителей потексвирусов – X-вируса картофеля (ХВК) – недоступна *in vitro* для рибосом в составе вирусных частиц, но может быть трансляционно активирована либо после фосфорилирования белка оболочки (БО) в составе вириона, либо при образовании комплекса вириона с транспортным белком 1 (ТБ1). Мы предполагаем, что эти два способа трансляционной активации функционируют на разных этапах инфекции. В первично зараженной клетке РНК становится доступной для рибосом в результате фосфорилирования БО в составе вириона. При распространении инфекции ТБ1, образующийся в первично зараженной клетке, входит в состав транспортной формы, связывается с торцом вируса и/или вирусного рибонуклеопротеида и активирует инкапсидированную РНК [1–3].

Изучая это явление, нам удалось выяснить, что ТБ1 взаимодействует с молекулами БО, расположенными на конце полярной белковой спирали ХВК,

соответствующем 5'-концу геномной РНК, но с самой РНК не взаимодействует. Фосфорилирование БО и взаимодействие с ТБ1 затрагивают различные области молекулы БО ХВК: если при фосфорилировании ключевую роль играют 19 N-концевых аминокислотных остатков БО, то в процессе связывания ТБ1 с вирионом определенную роль играет C-концевой участок БО ХВК протяженностью 10/18 аминокислотных остатков, доступный для взаимодействия с ТБ1 в торце вирусной частицы [4, 5].

Связывание ТБ1 с нативными вирионами ХВК приводит к линейной дестабилизации всей спиральной белковой оболочки вирусной частицы, вследствие чего вирион переходит из стабильного не-транслируемого состояния в метастабильную форму, благодаря чему 5'-конец вирусной РНК становится доступен для рибосом. Таким образом, очевидно, что ТБ1, являясь компонентом транспортной формы ХВК, может служить регулятором трансляции РНК в составе вириона или вирусного транспортного рибонуклеопротеида [1, 6, 7].

С использованием панели делеционных мутантов показано, что участок ТБ1, обеспечивающий его связывание с вирусной частицей, находится между 112 и 122 аминокислотными остатками. При этом связывание ТБ1 с БО в составе вириона является необходимым, но недостаточным условием активации трансляции инкапсидированной РНК. При удалении любого участка ТБ1, не препятствующего его связыванию с вирусной частицей, или при его фосфорилировании, по-видимому, происходит изменение конформации белка, что приводит к блокировке ТБ1-зависимой активации трансляции [5].

Геномная РНК другого потексвируса – вируса мозаики альтернатеры (ВМАльт, штамм ВМАльт-МУ) – не транслируется *in vitro* в составе вирусных частиц, но может трансляционно активироваться так же, как и РНК ХВК – путем фосфорилирования БО в составе вирусной частицы и при взаимодействии вирионов с ТБ1 ВМАльт [8, 9]. При изучении трансляционной активации геномов ХВК и ВМАльт возник вопрос – может ли ТБ1 ХВК активировать РНК в составе вирусных частиц ВМАльт и наоборот. Оказалось, что при взаимодействии вирионов ВМАльт с гетерологичным ТБ1 ХВК происходит эффективная активация трансляции инкапсидированной РНК ВМАльт [8]. Более того, ТБ1 ВМАльт может активировать трансляцию РНК в составе вириона ХВК [10].

Полученные результаты позволили предположить, что обнаруженные трансляционные свойства инкапсидированной РНК и механизм активации трансляции могут быть общими у вирусов, относящихся к роду *Potexvirus* (потексвирусы).

В данной работе изучены трансляционные свойства еще двух потексвирусов: вируса мозаики нарцисса (ВМН) и вируса аукубы-мозаики картофеля (ВАМК), и возможность трансляционной активации транспортными белками 1 инкапсидированной РНК четырех представителей этой группы (ХВК, ВМАльт, ВМН и ВАМК).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение препаратов вирусов и вирусных РНК

Препараты ХВК, ВАМК и ВМН выделяли из зараженных растений *Datura stramonium* L. согласно [1]. Препарат ВМАльт выделяли из зараженных растений портулака (*Portulaca grandiflora*) по методике, описанной в [8]. РНК выделяли фенольным методом с некоторыми модификациями [11].

Получение мутантных ТБ1

Рекомбинантные белки ТБ1 ХВК и ВМАльт получены как описано ранее [1, 10].

Генно-инженерные конструкции для экспрессии белков ТБ1 ВМН и ТБ1 ВАМК были созданы на основе плазмиды pQE30 (QIAGEN). Кодирующие области генов ТБ1 ВМН и ТБ1 ВАМК с добавлением His₆ получены амплификацией на матрицах геномных РНК ВМН и ВАМК (праймеры прямой NMV BamHI(+)-5'-acacggatccatggactgtaagta-3' и обратный NMV PstI(-)-5'-acacctgcagcgtagttaacaggtg-3') и на матрице геномной РНК ВАМК (праймеры прямой Aac-BamHI(+)-5'-acatggatccggaatggaatat-3' и обратный Aac-PstI(-)-5'-acacctgcagatcagtctaaat-3'). Этими плазмидами трансформировали клетки *Escherichia coli* M15[pREP4]. После индукции экспрессии рекомбинантные белки очищали с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Анализ полученных белковых препаратов при помощи электрофореза в 8–20% денатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ с ДСН) выявил единственную полосу, подвижность которой соответствовала рассчитанной молекулярной массе рекомбинантных ТБ1 ВМН (26.7 кДа) и ТБ1 ВАМК (27.2 кДа).

Трансляция *in vitro*

Трансляцию РНК в бесклеточной системе из экстракта зародышей пшеницы проводили согласно протоколу Promega с некоторыми модификациями как описано ранее [12]. Количество РНК в пробе составляло 40 мкг/мкл. Рекомбинантный ТБ1 для трансляционной активации РНК в составе вириона добавляли в молярном соотношении ХВК : ТБ1 = 1 : 100, т.е. на 1 мкг РНК (20 мкг вируса) 1.4 мкг ТБ1.

Иммуноэлектронная микроскопия

Анализ методом иммуноэлектронной микроскопии проводили как описано ранее [13]. В качестве первичных антител использовали поликлональные антисыворотки к ТБ1 ХВК, ТБ1 ВМАльт и ТБ1 ВАМК, полученные согласно [10]. В качестве вторичных использовали антивидовые антитела, конъюгированные с частицами коллоидного золота диаметром 12 нм. Полученные образцы контрастировали 2% водным раствором уранилацетата. Наблюдения проводили на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-1011 (JEOL, Япония) при 80 кВ. Изображения получали с помощью цифровой камеры Gatan Erlangshen ES500W с использованием программного обеспечения Gatan Digital Micrograph.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения трансляционных свойств инкапсидированной РНК потексвирусов были накоплены, выделены и очищены препараты ВМН и ВАМК, также получены рекомбинантные ТБ1 этих вирусов. Обнаружено, что трансляционные свойства инкап-

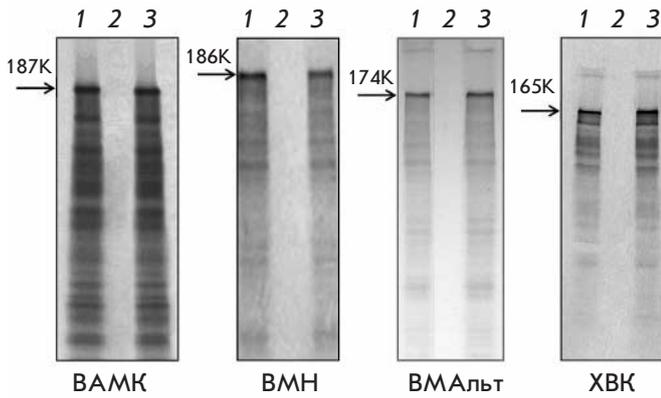


Рис. 1. Трансляционная активация инкапсидированных РНК ВАРК и ВРН *in vitro*. РНК вирусов ВАРК, ВРН, ВМАльт и ХВК (1); РНК в составе вирусных частиц (2); РНК в составе вирусных частиц, к которым добавлены ТБ1 вирусов (3). Стрелками показаны положения репликаз ВАРК (187К), ВРН (186К), ВМАльт (174К) и ХВК (165К). Электрофоретический анализ ³⁵S-меченых продуктов трансляции

сидированных РНК этих представителей потексвирусов не отличаются от свойств ВМАльт и ХВК: геномные РНК ВАРК и ВРН не транслируются *in vitro* в составе вирионов (рис. 1, дорожки 2), но могут быть трансляционно активированы после взаимодействия вирусных частиц с собственным ТБ1 вирусов (рис. 1, дорожки 3), как это было показано ранее для РНК ВМАльт и ХВК (рис. 1, положительные контроли).

Ранее мы показали возможность активации трансляции инкапсидированных РНК ХВК и ВМАльт при добавлении ТБ1 ВМАльт к ХВК и ТБ1 ХВК к ВМАльт – кросс-активацию трансляции [8, 10]. В данной работе мы попытались выяснить, возможна ли кросс-активация у других потексвирусов. В серии экспериментов показано, что трансляционная активация ВАРК происходит и при взаимодействии вирусной частицы с ТБ1 другого потексвируса – ВРН (рис. 2, 5). В то же время при взаимодействии вириона ВАРК с ТБ1 ХВК (рис. 2, 4) инкапсидированная РНК ВАРК трансляционно не активируется, в отличие от РНК ВМАльт [8]. Аналогичный результат получен и в «обратном» случае – при добавлении ТБ1 ВАРК к вирионам ХВК РНК ХВК оставалась недоступной для рибосом (рис. 2, 6).

Анализ кросс-активации трансляции РНК в составе вирионов ВРН и ХВК показал, что ТБ1 ВРН не активирует трансляцию ХВК (рис. 3, 4), тогда как ТБ1 ХВК активирует трансляцию инкапсидированной РНК ВРН (рис. 3, 3). Оказалось, что в паре ВРН–ХВК отсутствует взаимная кросс-активация, как и в паре ВРН–ВМАльт – РНК в составе вирио-



Рис. 2. Трансляционная активация геномной РНК ВАРК в составе вирусных частиц *in vitro*. РНК ВАРК в составе вирусных частиц (1); РНК ВАРК в составе вирусных частиц, к которым добавлен ТБ1 ВАРК (3); ТБ1 ХВК (4); ТБ1 ВРН (5); вирусные частицы ХВК после добавления ТБ1 ВАРК (6) и ТБ1 ХВК (7). Стрелками показаны положения репликазы ВАРК (187К) и ХВК (165К). Электрофоретический анализ ³⁵S-меченых продуктов трансляции

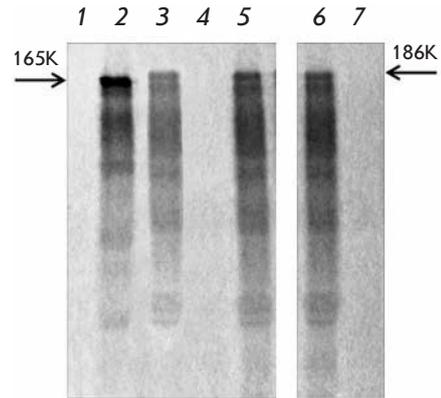


Рис. 3. Трансляционная активация геномной РНК ВРН в составе вирусных частиц *in vitro*. РНК ВРН в составе вирусных частиц (1) и после добавления ТБ1 ХВК (3), ТБ1 ВРН (5) или ТБ1 ВМАльт (7). Свободная РНК ВРН – положительный контроль (6). Трансляция инкапсидированной РНК ХВК после добавления к вирусным частицам ХВК ТБ1 ВРН (4) или ТБ1 ХВК – положительный контроль (2). Стрелками показаны положения репликаз ВРН (186К) и ХВК (165К). Электрофоретический анализ ³⁵S-меченых продуктов трансляции

нов ВРН не может быть активирована ТБ1 ВМАльт (рис. 3, 7), но при этом ТБ1 ВРН может активировать трансляцию РНК ВМАльт (рис. 4, 4), так же как это происходит в паре ВМАльт–ТБ1 ХВК (рис. 4, 3) [8]. Таким образом, при изучении трансляционной активации потексвирусов нами впервые обнаружено такое явление, как неполная кросс-активация инкапсидированных вирионных РНК.

Нами проверена возможность трансляционной активации ТБ1 ВАРК инкапсидированной РНК ВРН

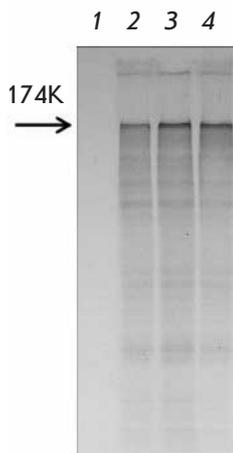


Рис. 4. Трансляционная активация геномной РНК ВМАльт в составе вирусных частиц *in vitro*. РНК ВМАльт в составе вириона (1); РНК ВМАльт – положительный контроль (2); к ВМАльт добавлен ТБ1 ХВК (3) и ТБ1 ВМН (4). Стрелкой показано положение репликазы ВМАльт (174К). Электрофоретический анализ ³⁵S-меченых продуктов трансляции

и ВМАльт, а также ТБ1 ВМАльт инкапсидированной РНК ВАМК. Оказалось, что ТБ1 ВАМК активирует трансляцию вирусной РНК ВМН, но его добавление к вирионам ВМАльт не приводит к трансляционной активации РНК этого вируса. Аналогичным образом РНК ВАМК в составе вириона не активируется трансляционно при добавлении ТБ1 ВМАльт (данные не приведены).

Результаты проведенных экспериментов обобщены в *таблице*.

На основании данных по кросс-активации можно утверждать, что ТБ1 ВМН может активировать трансляцию инкапсидированных геномных РНК ВАМК и ВМАльт, но не ХВК. ТБ1 ВАМК трансляционно активирует РНК ВМН в составе вириона, но не РНК ВМАльт и ХВК. В дополнение к ранее полученным данным о кросс-активации инкапсидированных РНК ВМАльт и ХВК удалось выяснить, что ТБ1 ХВК трансляционно активирует РНК ВМН в составе вириона, так же как и инкапсидированную РНК ВМАльт, но при взаимодействии ТБ1 ХВК с вирусными частицами ВАМК не происходит трансляционной активации РНК этого вируса. Оказалось, что ТБ1 ВМАльт не способен активировать трансляцию исследуемых в настоящей работе потексвирусов ВАМК и ВМН (*таблица*). Взаимная кросс-активация трансляции вирусной РНК существует в парах «ХВК-ВМАльт», «ВМН-ВАМК».

Таким образом, транспортные белки потексвирусов способны трансляционно активировать РНК в составе вирионов других представителей группы, но проявляют избирательную специфичность.

Чтобы интерпретировать полученные результаты, мы сравнили аминокислотную последовательность ТБ1 (*рис. 5*). Известно, что белки ТБ1 представителей рода *Potexvirus* принадлежат к суперсемейству I хеликаз, содержащих семь высококонсервативных NTP-азных/РНК-хеликазных мотивов, образующих

Трансляционная активация РНК в составе вирионов потексвирусов транспортными белками 1

Вирус	Белок			
	ТБ1 ХВК	ТБ1 ВМН	ТБ1 ВАМК	ТБ1 ВМАльт
ХВК	+	-	-	+
ВМН	+	+	+	-
ВАМК	-	+	+	-
ВМАльт	+	+	-	+

Примечание. Цветом выделены филогенетические подгруппы ТБ1 (согласно Wong et al. [16]): Ia (розовый); Ib (зеленый); Ic (желтый). «+» – трансляционная активация, «-» – отсутствие трансляционной активации.

NTP-азно/РНК-хеликазный домен [14, 15]. Ранее в нашей лаборатории была получена серия мутантов ТБ1 ХВК с делециями, затрагивающими различные функциональные районы молекулы. Выяснилось, что размер и позиция делеции в мутантных белках не оказывают существенного влияния на способность ТБ1 связываться с вирионом ХВК только в том случае, если делеция не затрагивала мотив IV NTP-азно/хеликазного домена (аминокислотные остатки 112–122). В связи с этим основное внимание при сравнении последовательностей мы обращали на мотив IV [5].

Поскольку мотивы IV ТБ1 ХВК, ВМАльт, ВАМК и ВМН, как видно из *рис. 5*, ощутимо отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности, трудно предсказать, связываются ли эти транспортные белки с торцом гетерологичных вирионов в случае отсутствия кросс-активации трансляции. Для ответа на этот вопрос были проведены дополнительные опыты.

Методом иммуноэлектронной микроскопии с использованием первичных антител к ТБ1 ХВК, ВМАльт и ВАМК и вторичных антител, конъюгированных с коллоидным золотом, показано, что с торцом вирионов ХВК могут связываться как активирующие трансляцию инкапсидированной РНК ХВК белки ТБ1 ХВК (*рис. 6А*, положительный контроль), ТБ1 ВМАльт (*рис. 6Б*), так и не активирующие – ТБ1 ВАМК (*рис. 6В*). В контрольном эксперименте (*рис. 6Г*, отрицательный контроль) в отсутствие ТБ1 не наблюдали связывания частиц золота с торцом вириона. Аналогичные результаты получены при анализе связывания транспортных белков, активирующих и не активирующих трансляцию РНК в составе вирионов ВМАльт (*рис. 6Д–З*). ТБ1 ВАМК успешно связывался с вирионом (*рис. 6Ж*), как ТБ1 ВМАльт (*рис. 6Д*) и ТБ1 ВМН (*рис. 6Е*), хотя трансляционно активировать РНК в составе вирионов ВМАльт способен только гомологичный ТБ1.

		Мотив I	Мотив IA	
ТБ1 ВМАльт	--MNHFINLLIEEGYVRTNEIL--SDTL	LVVHAVAGAGKSTLIRKFI	HQLPQARAYTHGVP	56
ТБ1 ХВК	--MDILISSLKSLGYSRTSKSLD-SGPL	LVVHAVAGAGKSTALRKLILRHPTFTVHTLGV	P	57
ТБ1 ВАМК	MEYSFLVRLLDHYGFERTTEKIVPGQPI	VVQGIAGCGKTTLLRNHFHQEYPSIPIYSC-FP		59
ТБ1 ВМН	MDCKYLLELLDSYSFIRSSRSFS--SPI	IIHGVAGCGKSTIIQKIALAFPELLIGSFTPA		58
	Мотив IA	Мотив II	Мотив III	Мотив IV
ТБ1 ВМАльт	DPPNLEGRFIQAFKSPDPNHFNILDEYCAEPLSG-GWNVLIADPLOHRSQ-ALRPHYIKR			114
ТБ1 ХВК	DKVSIRTRGIQKPGPIPEGNFAILDEYTLDNTRNSYQALFADPYQAPF-SLEPHFYLE			116
ТБ1 ВАМК	QKISENSEELQLLAKARFTASAILDEYLAHKFDYQKCLAVFADPLOYSHLGALRPHYQTS			119
ТБ1 ВМН	LLDSNSGRKQLAVTSDP---LDILDEYLG-GPNPVRRLAKFCDPLOYSCQPEVPHFSTL			114
	Мотив IV			
ТБ1 ВМАльт	ESHRLGVATCELLTRVGLPVLSHKTED--QVDYQGI FEGPLFGTVIALDSTVRALLLKHG			172
ТБ1 ХВК	TSFRVPRKVADLIAGCGFDFETNSQEEG-HLEITGIFKGPLLGKVAIAIDEESETTLRSHG			175
ТБ1 ВАМК	KHIGLVLVLLILSLRNWIPIESLLSEEKTIKCEDPYATDPIGQIIASNHEVLNLIKPOA			179
ТБ1 ВМН	LTWRFCVTRTALLNGIFGCQIKSRREDLCHLTHENPYTTDPKGVVVAHEQEVINLLLQHG			174
	Мотив V	Мотив VI		
ТБ1 ВМАльт	ISPLCPAEVLGSEFEETTUVSEVS--LSQVKFKHALYIALTRHKKSLHVRAPPLPDTPSR			230
ТБ1 ХВК	VEFVKPCQVTGLELKVVTIVSAAP--IEEIGQSTAFYNAITRSKGLTYVRAGT-----			226
ТБ1 ВАМК	VEAICSCSEVLGKEFQTVSCYYQSHKLEDSAEERRGLYIAISRKSAVLLFDLD-----			232
ТБ1 ВМН	CPVTPTQHLWGLTIPVVSVYITSIASLSTVDRAN-LFLSLTRDSKALHIFEFDAWSHATC			233
ТБ1 ВМАльт	SL	232		
ТБ1 ХВК	--			
ТБ1 ВАМК	--			
ТБ1 ВМН	--			

Рис. 5. Сравнение аминокислотных последовательностей ТБ1 ВМАльт, ХВК, ВАМК, ВМН. Серым цветом выделены консервативные мотивы ТБ1 (мотивы I, IA, II, III, IV, V, VI) (по Morozov et al. [15])

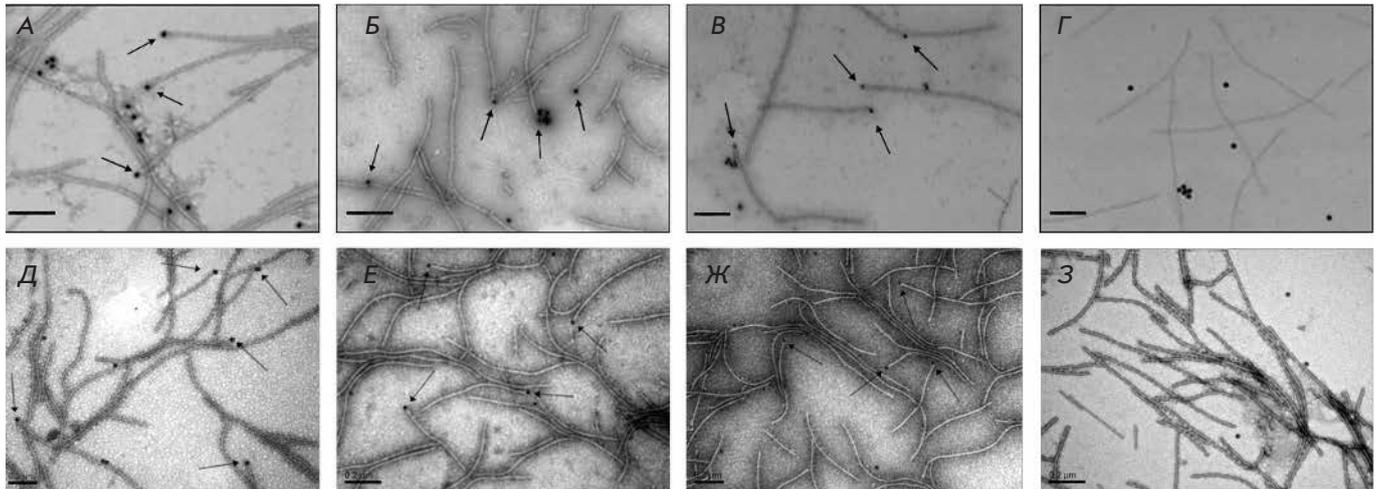


Рис. 6. Иммуноэлектронная микроскопия комплексов вирионов ХВК с ТБ1: ХВК (А), ВМАльт (Б) и ВАМК (В) и вирионов ВМАльт с ТБ1: ВМАльт (Д), ВМН (Е) и ВАМК (Ж). Первичные антитела к ТБ1 ХВК (А – положительный контроль), ВМАльт (Б, Д), ВАМК (В, Ж) и ВМН (Е) и вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (12 нм). Отрицательный контроль: вирионы ХВК (Г) или ВМАльт (З), инкубированные с первичными и вторичными антителами, конъюгированные с коллоидным золотом, в отсутствие ТБ1. Стрелками показано положение ТБ1 на торце вирионов. Масштабная линейка 200 нм

Таким образом, впервые показана возможность взаимодействия торца вириона потексвируса с гетерологичным ТБ1. При этом связывание ТБ1 с торцом вириона является обязательным, но недостаточным условием для трансляционной активации инкапсидированной РНК.

При филогенетическом анализе белков ТБ1 потексвирусов [16] представители рода *Potexvirus* были разделены на три подгруппы – Ia, Ib, Ic. К подгруппе Ia был отнесен ТБ1 ВМАльт, к подгруппе Ib – ТБ1 ВМН и ВАМК, а к Ic – ТБ1 ХВК.

В нашей работе показана взаимная кросс-активация трансляции пар вирусов ВАМК–ВМН и ВМАльт–ХВК, тогда как в других вариантах наблюдали неполную кросс-активацию (ВМН–ХВК и ВМН–ВМАльт) или полное ее отсутствие (ВАМК–ХВК) (таблица). Принадлежность вирусов ВАМК и ВМН к одной подгруппе (Ib) хорошо согласуется с данными по кросс-активации трансляции. При этом возможность трансляционной активации ТБ1 РНК в составе гетерологичных вирионов в случае ХВК и ВМАльт можно объяснить значительно большим филогенетическим родством между подгруппами Ia и Ic, чем между Ia и Ib [16]. На данном этапе исследования мы предполагаем, что ключевым моментом в специфичности процесса трансляционной активации РНК потексвирусов играет конформация транспортного белка и возможность его белок-белкового взаимодействия с С-концом белка оболочки вириона, приводящего к дестабилизации белковой спирали. Это подтверждают и данные о том, что фосфорилирование ТБ1 ХВК препятствует возможности трансляционной активации РНК ХВК в составе вируса [5]. Вряд ли конформация ТБ1 может критически влиять на связывание с торцом вириона, так как ранее мы по-

казали, что делеционные мутанты ТБ1 ХВК могут успешно взаимодействовать с вирусом [5]. Более того, установлено, что полноразмерные транспортные белки потексвирусов могут связываться с гетерологичными вирионами, но трансляционно их не активируют. Можно предположить, что филогенетически близкие гетерологичные транспортные белки, имеющие сходную пространственную структуру с гомологичным ТБ1, способны при связывании с вирионами дестабилизировать спиральную белковую оболочку вирусной частицы, вследствие чего 5'-конец вирусной РНК становится доступным для рибосом [7].

ВЫВОДЫ

На основании полученных результатов можно утверждать, что инкапсидированная РНК потексвирусов обладает общими трансляционными свойствами *in vitro*. Получены прямые доказательства того, что связывание ТБ1 с торцом вириона является обязательным, но недостаточным условием активации трансляции вирусной РНК. Транспортные белки 1 потексвирусов способны трансляционно активировать РНК в составе вирионов других представителей группы, но проявляют избирательную специфичность. Взаимная трансляционная кросс-активация происходит у вирусов, принадлежащих к одной филогенетической подгруппе (ВМН–ВАМК – Ib) или к близким подгруппам (ХВК–ВМАльт – Ic и Ia). Возможно, ТБ1 вирусов, активирующих трансляцию инкапсидированной РНК гетерологичных вирионов, обладают близкой пространственной конформацией, но это требует дополнительных экспериментальных доказательств. ●

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-24-00007.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V.Yu. // *Virology*. 2000. V. 271. № 2. P. 259–263.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Novikov V.K., Arkhipenko M.V. // *Virology*. 2001. V. 286. P. 466–474.
- Karpova O.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Sheval E.V., Kiselyova O.I., Poljakov V.Yu., Yaminsky I.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G. // *J. Gen. Virol.* 2006. V. 87. № 9. P. 2731–2740.
- Карпова О.В., Архипенко М.В., Заякина О.В., Никитин Н.А., Киселева О.И., Козловский С.В., Родионова Н.П., Атабеков И.Г. // *Молекуляр. биология*. 2006. Т. 40. № 4. С. 703–710.
- Zayakina O., Arkhipenko M., Kozlovsky S., Nikitin N., Smirnov A., Susi P., Rodionova N., Karpova O., Atabekov J. // *Mol. Plant. Pathol.* 2008. V. 9. № 1. P. 37–44.
- Kiseleva O.I., Yaminsky I.V., Karpova O.V., Rodionova N.P., Kozlovsky S.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 332. № 2. P. 321–325.
- Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 333. № 3. P. 565–572.
- Мухамеджанова А.А., Карпова О.В., Родионова Н.П., Атабеков И.Г. // *ДАН*. 2009. Т. 428. № 2. С. 266–268.
- Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // *Virus Genes*. 2011. V. 42. № 2. P. 268–271.
- Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // *Open Virol. J.* 2011. V. 5. P. 136–140.
- Karpova O.V., Tyulkina L.G., Atabekov K.J., Rodionova N.P. // *J. Gen. Virol.* 1989. V. 70. P. 2287–2297.
- Arkhipenko M.V., Petrova E.K., Nikitin N.A., Protopopova A.D., Dubrovin A.V., Yaminskii I.V., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. № 3. P. 40–46.
- Nikitin N., Trifonova E., Karpova O., Atabekov J. // *Microsc. Microanal.* 2013. V. 19. № 4. P. 808–813.
- Koonin E.V., Dolja V.V. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1993. V. 28. № 5. P. 375–430.
- Morozov S.Y., Solovyev A.G. // *J. Gen. Virol.* 2003. V. 84. P. 1351–1366.
- Wong S.M., Lee K.C., Yu H.H., Leong W.F. // *Virus Genes*. 1998. V. 16. № 3. P. 295–302.

УДК 620.3

Синтез и характеристика гибридных наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ для биомедицинских применений

И. В. Зелепукин^{1,2,3*}, В. О. Шипунова^{1,2,3}, А. Б. Миркасымов^{1,2}, П. И. Никитин^{3,4},
М. П. Никитин^{1,2}, С. М. Деев^{1,3,5}

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

²Московский физико-технический институт, 141700, Московская обл., Долгопрудный, Институтский пер., 9

³Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское ш., 31

⁴Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 38

⁵Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23

*E-mail: zelepukin@phystech.edu

Поступила в редакцию 15.07.2017

Принята к печати 30.10.2017

РЕФЕРАТ Создание маркеров, позволяющих получать одновременно количественную и визуальную информацию для картирования тканевых макрофагов и других клеток, представляет существенный интерес. Нами синтезированы магнитные и магнитно-флуоресцентные наномаркеры для мечения клеток, с высокой чувствительностью регистрируемые методом MPQ-детекции. Для стабилизации в физиологических условиях маркеры были покрыты оксидом кремния, причем с использованием модифицированной реакции Штобера получены маркеры, различающиеся размером и зарядами кинетического слоя. Разработан простой двухстадийный метод синтеза, позволяющий получать покрытые кремнием магнитные частицы с карбоксигруппами на поверхности сразу после завершения реакции Штобера за счет предварительной стабилизации маркеров карбоксиполимером. Полученные наномаркеры охарактеризованы методами электронной микродифракции, просвечивающей электронной микроскопии, динамического и электрофлоретического светорассеяния, изучено их взаимодействие с линиями эукариотических клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА магнитная детекция, магнитные наночастицы, мечение клеток, модификация поверхности, оксид кремния.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MPI (magnetic particle imaging) – метод визуализации магнитных частиц; MPQ (magnetic particle quantification) – метод количественной детекции магнитных частиц; ТЕОС – тетраэтилортосиликат; m-cit – магнитные частицы, покрытые цитрат-анионом; m-CMD – магнитные частицы, покрытые карбоксиметилдекстраном; m-cit-SiO₂ – магнитные частицы, покрытые оксидом кремния через промежуточное покрытие цитрат-анионом; m-CMD-SiO₂ – магнитные частицы, покрытые оксидом кремния через промежуточное покрытие карбоксиметилдекстраном.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время растет интерес к использованию наночастиц в качестве тераностических объектов (агентов, объединяющих диагностические и терапевтические функции на одной платформе) [1–3], создаются наноконструкции, способные выполнять терапевтическую функцию или связываться с клетками только в ответ на определенные сигналы от организма или на отсутствие таких сигналов [4], или внешних стимулов [5]. Для ранней диагности-

ки заболеваний и мониторинга проводимой терапии важна визуализация распределения наноагентов в организме при помощи различных маркеров.

Многие магнитные наночастицы относятся к суперпарамагнитным частицам, что позволяет детектировать их методами магнитно-резонансной томографии [6], MPI-визуализации [7], ферромагнитного резонанса [8], гигантского магнитного сопротивления [9] и другими [10–12]. Особый интерес представляет метод детекции нелинейных магнитных материалов,

основанный на воздействии на образец магнитным полем, генерируемым на двух частотах, и получения отклика на комбинаторных частотах приложенного поля (MPQ-детекция) [13]. Этот метод позволяет высокочувствительно и количественно выявлять суперпарамагнитные наночастицы в широком диапазоне концентраций, а также неинвазивно в живом организме, что открывает широкие перспективы для их использования в биомедицине.

Нестабилизированные магнитные наночастицы не обладают коллоидной стабильностью в физиологических условиях, они подвержены окислению, что может ухудшить предел их детекции [14]. Эффективным плотным покрытием, которое может защитить магнитные частицы от окисления и агрегации, является оболочка из диоксида кремния. Такое покрытие высокостабильно, инертно, его поверхность можно модифицировать для получения необходимых функциональных групп. Кроме того, мезопористую структуру оксида кремния используют для доставки терапевтических агентов и генетических векторов [15].

Наночастицы, содержащие диоксид кремния, часто синтезируют с помощью метода Штобера. Это простой и удобный одноступенчатый метод, в котором не используются сурфактанты или токсичные органические растворители, а относительно низкая скорость образования неорганических слоев позволяет контролировать размер получающихся наночастиц [16].

Нами синтезированы магнитные и магнитно-флуоресцентные маркеры, покрытые оболочкой оксида кремния. Поверхность частиц была функционализирована амино- и карбоксигруппами, чтобы обеспечить использование данных маркеров для конъюгации с другими наноагентами, белками и направляющими соединениями. Предложен также метод покрытия магнитных частиц оксидом кремния без необходимости дальнейшей модификации поверхности функциональными группами. Синтезированные нами наночастицы изучены методами просвечивающей электронной микроскопии, микродифракции электронов, динамического и электрофоретического светорассеяния, измерена чувствительность наночастиц в качестве магнитных маркеров для биомедицинских исследований. Показана возможность как количественного, так и визуального эффективного мечения наночастицами эукариотических клеток различного происхождения, установлена также относительно низкая цитотоксичность полученных маркеров в тестируемых концентрациях.

Полученные маркеры могут быть использованы *in vivo*, например, для выявления тканевых макро-

фагов и определения их активности для диагностики атеросклероза, рака, инфаркта миокарда и других заболеваний человека [17, 18].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы хлоридтетрагидрат железа (II), хлоридгексагидрат железа (III), тетраэтилорто-силикат (ТЕОС), (3-аминопропил)триэтоксисилан, трис(2,2'-бипиридил)рутения (II) хлорид гексагидрат, янтарный ангидрид, карбоксиметилдекстрана на натриевая соль, L-глутамин, краситель Hoechst 33342 фирмы Sigma-Aldrich, аммиак водный («ос. ч.»), азотная кислота («ос. ч.»), натрий лимонно-кислый трехзамещенный дигидрат, изопропиловый спирт («х. ч.»), этиловый спирт («х. ч.»), диметилсульфоксид («х. ч.») фирмы «Химмед», нингидрин («х. ч.»), раствор МТТ фирмы «Диаэм», метиловый спирт сухой фирмы Merck, конканавалин А (лектин из *Canavalia ensiformis*) фирмы Vector Laboratories, фосфатно-солевой буфер (PBS) pH 7.4, карбонатный буфер pH 9, среда McCoy's 5A фирмы Life technologies, эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (FBS) фирмы HyClone, клетки линий BT-474, SK-BR-3 (молочная железа человека), HEK 293T (почка эмбриона человека), CHO (яичник китайского хомячка). Для магнитной сепарации использовали постоянный цилиндрический железо-бор-неодимовый магнит D 25 × 10 мм фирмы Ningbo Ketian Magnet Co.

Синтез наночастиц магнетита

В смесь, содержащую 2.9 ммоль $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10.1 ммоль $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 40 мл дистиллированной воды, добавляли 5 мл 30% NH_4OH при постоянном перемешивании. Затем выдерживали раствор при 80°C в течение 2 ч. Полученные частицы обрабатывали раствором 2 М HNO_3 , а затем многократно промывали дистиллированной водой путем магнитной сепарации на 25-мм железо-бор-неодимовом магните. Последовательно собирали частицы, не притянувшиеся к магниту за 15 мин, получая таким образом различные фракции магнитных частиц. Первые две фракции имели низкие значения pH, что приводило к быстрой деградации частиц. В экспериментах использовали магнитные наночастицы третьей фракции.

Покрытие наночастиц оксидом кремния

Для стабилизации магнитных наночастиц в условиях реакции частицы предварительно покрывали цитрат-анионом, добавляя в коллоидный раствор магнитных частиц трехзамещенный цитрат натрия до концентрации 25 г/л. Альтернативно частицы могли быть покрыты полимерным покрытием из карбоксиметилдекстрана. Для этого в коллоидный раствор наночастиц при нагревании до 80°C до-

бавляли карбоксиметилдекстран до концентрации 50 г/л. После предварительной стабилизации магнитные частицы трехкратно промывали дистиллированной водой.

Магнитные частицы в объеме 50 мкл вносили в 1 мл спирта, рН реакционной смеси доводили до 9 и добавляли от 10 до 200 мкл ТЕОС. Через 1 день наночастицы промывали дистиллированной водой методом центрифугирования.

Функционализация поверхности кремниевых наночастиц

К синтезированным частицам добавляли 1% раствор (3-аминопропил)триэтоксисилана в этаноле, что приводило к экспонированию первичных аминогрупп на их поверхности. Затем частицы двукратно промывали этанолом. Далее аминогруппы модифицировали в карбоксигруппы, добавляя янтарный ангидрид в карбонатном буфере (рН 9) до концентрации 4 г/л. Через 3 ч частицы отмывали от продуктов реакции дистиллированной водой.

Получение магнитно-люминесцентных кремниевых наночастиц

Магнитно-люминесцентные наночастицы получали аналогично магнитным частицам, покрытым оксидом кремния в этаноле, добавляя 0.03 мг трис(2,2'-бипиридил)рутения (II) хлорида гексагидрата на 1 мл реакционной смеси через 5 мин после начала реакции гидролиза ТЕОС. После синтеза наночастицы хранили в темноте при +4°C.

Характеристика частиц

Гидродинамический размер наночастиц и потенциал кинетического слоя определяли методами динамического светорассеяния и электрофоретического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.). Использовали параметр среднего размера частиц и среднее значение дзета-потенциала. Для измерения потенциала кинетического слоя частицы перед измерением переводили в PBS, рН 7.4.

Морфологию наночастиц исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 (JEOL Ltd.) с ускоряющим напряжением 200 кВ. Образцы наночастиц наносили на медную сетку с углеродным покрытием, а затем высушивали на воздухе.

Фазовый состав частиц определяли методом микродифракции электронов.

Магнитный сигнал маркеров определяли методом МРQ-детекции нелинейных магнетиков [13]. Для измерения в катушку помещали 20 мкл образца наночастиц.

Спектр флуоресценции и поглощения получен с использованием планшетного ридера Infinite M1000PRO (Tecan Group Ltd.).

Мечение клеток наночастицами

Клетки линий BT-474, SK-BR-3, НЕК 293Т, СНО культивировали в среде McCoу's 5А с добавлением 10% инактивированной нагреванием эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота и 2 мМ L-глутамин при +37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Клетки пересеивали 2–3 раза в неделю при достижении 80–90% монослоя. Клетки, снятые с поверхности культурального пластика (0.7 × 10⁶), промывали дважды PBS, инкубировали с наночастицами в концентрации 0.01 г/л в течение 2 ч при комнатной температуре, отмывали при постоянном перемешивании от несвязанных частиц. Количество частиц, связанных с клетками, определяли методом МРQ-цитометрии [18].

Анализ жизнеспособности клеток

Цитотоксичность наночастиц оценивали с помощью МТТ-теста. Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по 10⁴ клеток на лунку в 200 мкл среды McCoу's 5А с 10% FBS. Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение ночи, затем среду удаляли и к клеткам стерильно добавляли бессывороточную среду (отрицательный контроль) и бессывороточную среду, содержащую тестируемые частицы в различных концентрациях в объеме 100 мкл на лунку. Клетки инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре, затем промывали бессывороточной средой, добавляли McCoу's 5А с 10% FBS и инкубировали в CO₂-инкубаторе (24 ч, 37°C). Затем среду стряхивали, клетки промывали 1 раз средой. После этого в лунки вносили по 100 мкл раствора МТТ (0.5 г/л в McCoу's 5А), инкубировали в течение 1 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. По истечении этого времени раствор МТТ удаляли, к содержимому лунок добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида, планшет встряхивали до полного растворения кристаллов формазана. Оптическую плотность содержимого каждой лунки измеряли на планшетном анализаторе Infinite M1000PRO (Tecan Group Ltd.) на длине волны λ = 540 нм.

Флуоресцентная микроскопия

Клетки рассеивали на 96-луночный планшет по 10⁴ клеток на лунку в 200 мкл среды McCoу's 5А с 10% FBS. После культивирования при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение ночи к клеткам стерильно добавляли тестируемые частицы, инкубировали 2 ч при комнатной температуре, затем промывали бессывороточной средой, добавляли McCoу's 5А с 10%

FBS и инкубировали в течение 24 ч при 37°C в CO₂-инкубаторе. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего трижды промывали PBS. Образцы клеток анализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000B (Leica Microsystems) в проходящем свете и в каналах флуоресценции, соответствующих флуоресценции наночастиц (возбуждение 545/30, эмиссия 610/75) и флуоресценции красителя Hoechst 33342 (возбуждение 360/40, эмиссия 470/40).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наночастицы магнетита синтезировали методом копреципитации хлоридов железа (II) и (III) в щелочных условиях. Синтез был оптимизирован для получения магнитных маркеров с минимальным пределом детекции. Так как многие фазы оксигидроксидов железа, получающиеся в результате реакции, не являются суперпарамагнитными и уменьшают удельный детектируемый магнитный сигнал всего образца наночастиц [19], очень важно было установить оптимальное соотношение солей железа в реакционной смеси. Установлено, что максимальный удельный сигнал частицы имеют при соотношении солей в смеси $[\text{FeCl}_2]/[\text{FeCl}_3] = 1/3.5$. Максимум магнитного сигнала при этом наблюдается в третьей и четвертой фракциях наночастиц (рис. 1А). Предел детекции таких наночастиц, определенный методом МРQ, составил 2.7 нг в 20 мкл раствора.

Далее наночастицы покрывали оксидом кремния. Дзета-потенциал магнитных наночастиц при pH 9 близок к нулю, что приводит к их агрегации в условиях реакции. Агломераты, образовавшиеся при высоких значениях pH, не выходят из осадка и теряют коллоидную стабильность, поэтому необходимо было модифицировать частицы перед синтезом кремниевого покрытия. С этой целью, как и в [20], использовали цитратное покрытие (далее такие частицы обозначены как m-cit). При этом потенциал кинетического слоя наночастиц становился сильно отрицательным, и частицы оставались стабильными в широком диапазоне значений pH. В качестве альтернативного типа промежуточного покрытия впервые использовано полимерное карбоксиметилдекстрановое покрытие (далее m-CMD). Магнитные наночастицы, покрытые карбоксиметилдекстраном, были стабильными в условиях реакции. Кроме того, полимер связывал между собой несколько частиц магнетита, что позволяло получать покрытые полимером частицы с высоким содержанием магнитных ядер, а следовательно, с более низким пределом детекции. Затем проводили гидролиз тетраэтилортосиликата и поликонденсацию продуктов реакции на поверхности магнетита.

В качестве модельной системы для изучения основных зависимостей синтеза использовали синтез наночастиц оксида кремния без магнитного ядра. Изучено влияние таких параметров, как используемый растворитель, соотношение $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$ и pH реакции, на размер получаемых SiO₂-наночастиц.

Установлено, что увеличение длины углеродной цепочки в используемом спирте приводит к существенному увеличению размера синтезируемых частиц. Средний размер частиц оксида кремния в метаноле составлял ~10 нм, в этаноле – 100 нм, изопропанол – 500 нм. Растворители с более длинной углеродной цепочкой являются гидрофобными, что не позволяет провести стандартную реакцию Штобера. Изменение соотношения $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}]$ в реакции позволяло более точно контролировать размеры получаемых частиц оксида кремния (рис. 1Б). Зависимость гидродинамического размера частиц от соотношения реагентов имела характерный вид с выраженным максимумом, что, вероятно, связано с истощением тетраэтилортосиликата или воды в результате реакции на краях исследуемого диапазона концентраций. Реакция Штобера протекает при щелочных значениях pH, при этом увеличение pH приводило к многократному ускорению реакции, что негативно сказывалось на дисперсности размеров частиц. Большинство экспериментов было проведено при pH 9, при этом время синтеза частиц составляло примерно 1 ч (рис. 1В).

Нами синтезированы как магнитные, так и магнитно-люминесцентные наночастицы, покрытые оксидом кремния. Рост размера магнитно-кремниевых частиц зависел от условий реакции так же, как и кремниевых частиц. В частности, соотношение $[\text{TEOS}]/[\text{H}_2\text{O}]$ при синтезе m-cit-SiO₂ влияло на размер наночастиц так же, как ранее было определено для SiO₂-наночастиц.

Использование метанола в качестве растворителя позволяло получить магнитные частицы со средним размером в диапазоне 50–80 нм, этанола – от 100 до 200 нм. В изопропанол магнитные частицы, покрытые цитратом, агрегировали, поэтому для проведения реакции их сначала покрывали тонким слоем SiO₂ в метаноле, а потом использовали в качестве ядер нуклеации в новой реакции Штобера в изопропанол. Это позволило получить частицы размером 300–500 нм.

При использовании карбоксиметилдекстрана в качестве промежуточного покрытия мы получали наночастицы со средним размером 200 ± 60 нм, при этом средний размер первоначальных m-CMD-частиц составлял 44 ± 12 нм. Наночастицы размером 200 ± 60 нм двукратно использовали как «затравки» в реакции Штобера в изопропанол для получения

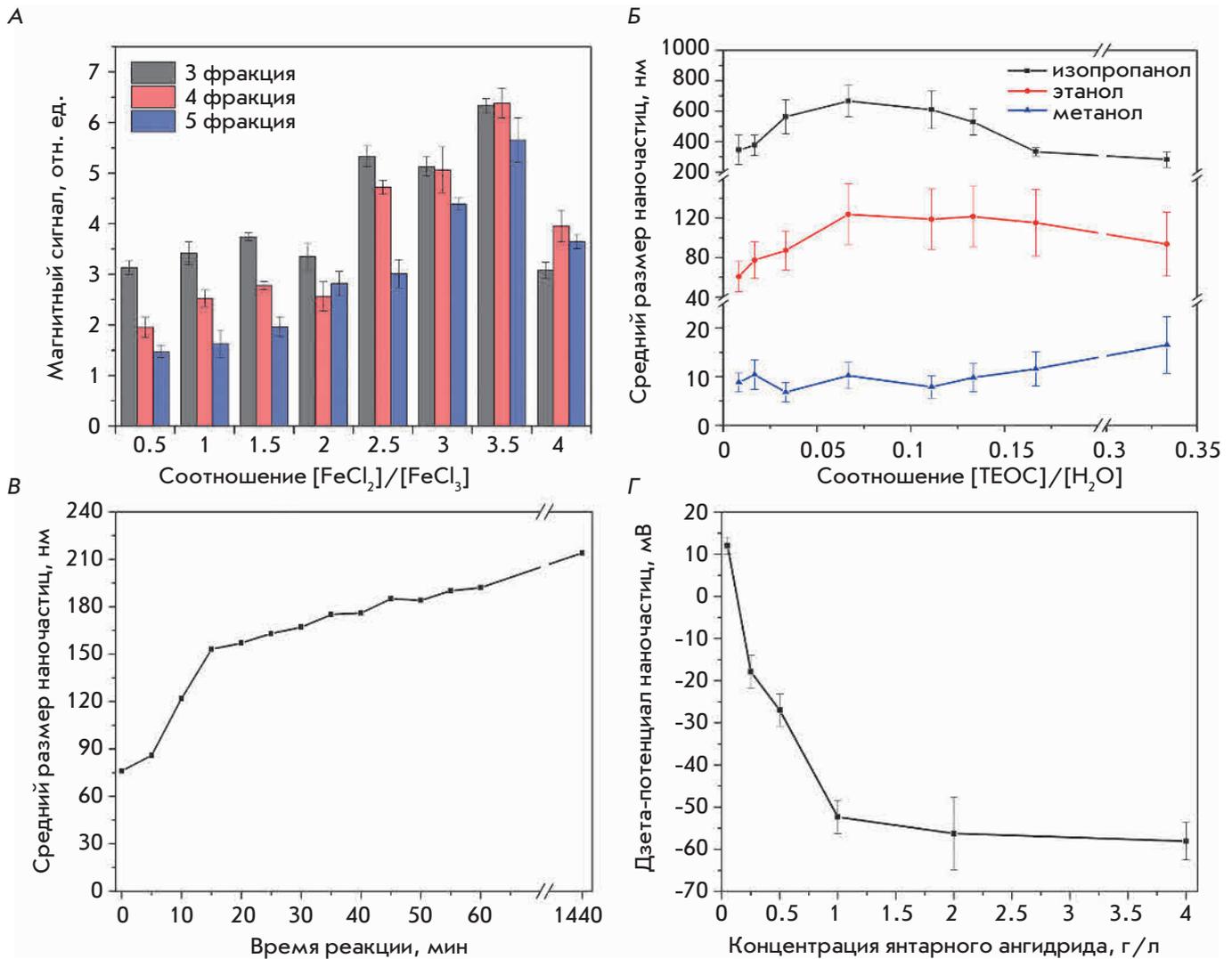


Рис. 1. Контроль физико-химических свойств магнитно-кремниевых наночастиц. **А** – зависимость удельного магнитного сигнала наночастиц от соотношения солей железа. **Б** – зависимость гидродинамического размера частиц от соотношения реагентов $[\text{TEOS}]/[\text{H}_2\text{O}]$ в реакции для различных растворителей. **В** – рост гидродинамического размера частиц в ходе реакции Штобера от времени. **Г** – влияние количества янтарного ангидрида в реакционной смеси на потенциал кинетического слоя наночастиц. Планки погрешностей характеризуют стандартное отклонение от среднего значения размера частиц

частиц размером 764 ± 187 нм. Использование описанных частиц в качестве ядер нуклеации в многоступенчатом варианте метода Штобера позволяет получить частицы более крупного размера, малоперспективные для *in vivo* экспериментов [21], однако интересные для *ex vivo* и *in vitro* диагностики.

Для синтеза флуоресцентных наночастиц мы, как и в [22], добавляли $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]\text{Cl}_2$ в реакционную смесь через 5 мин после начала реакции, чтобы избежать агрегации магнитных ядер за счет увеличения ионной силы раствора. Трис(2,2'-бипиридил)-

рутения (II) встраивался в образуемую аморфную решетку оксида кремния, в силу чего частицы приобрели флуоресцентные свойства. Спектр поглощения и флуоресценции частиц представлен на рис. 2. Частицы сохраняли коллоидную стабильность и способность к флуоресценции в течение, как минимум, 1 года.

Для различных биоприменений наночастиц часто требуется их конъюгация с белками или другими объектами. Конъюгация позволяет связывать между собой самые разные функциональные группы, одна-

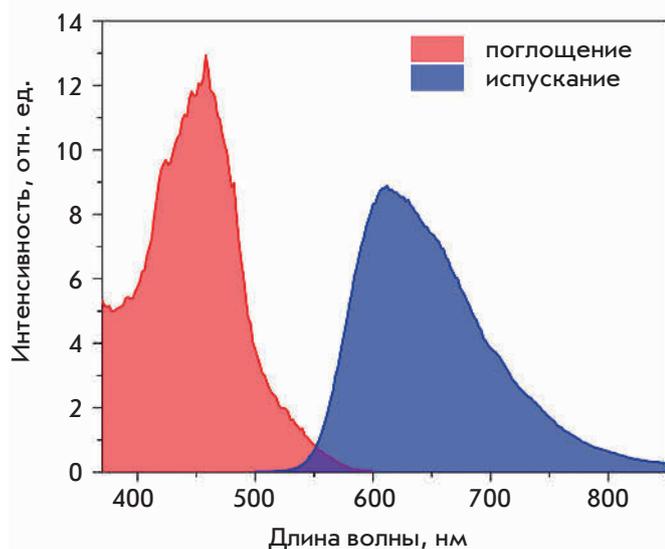


Рис. 2. Спектр поглощения и флуоресценции магнитно-люминесцентных кремниевых наночастиц

ко одним из наиболее удобных способов считается конъюгация карбоксильной группы с аминогруппой карбодимидным методом с образованием стабильной пептидной связи [23]. Синтезируемые наночастицы $m\text{-cit-SiO}_2$ первоначально содержат на поверхности гидроксильные группы, поэтому мы проводили двухступенчатую модификацию их поверхности, чтобы получить карбоксильные группы. Сначала поверхность SiO_2 -частиц обрабатывают (3-аминопропил)триэтоксисиланом. Присутствие аминогрупп на поверхности доказано изменением окраски раствора наночастиц при их взаимодействии с 5% раствором нингидрина, а также изменением среднего дзета-потенциала частиц с -36 до $+12$ мВ. После этого частицы обрабатывали янтарным ангидридом, и в результате реакции дециклизации аминогруппы на поверхности превращались в карбоксильные группы. Логарифмическая зависимость величины получаемого дзета-потенциала частиц от концентрации янтарного ангидрида в смеси позволила нам получить набор частиц с разными потенциалами кинетического слоя в диапазоне $+12 \dots -58$ мВ (рис. 1Г).

Экспонирование аминогрупп на поверхности приводит к агрегации частиц, однако после второго этапа модификации гидродинамический размер частиц становится равным размеру первоначальных частиц, что подтверждает отсутствие образования агрегатов и позволяет использовать метод для получения коллоидно-стабильных растворов магнитно-кремниевых частиц с разными зарядами.

Стоит отметить, что при использовании карбоксиметилдекстрана для промежуточной стабилизации

магнетита нет необходимости в дополнительной модификации поверхности магнитно-кремниевой частицы, так как сразу после синтеза на поверхности находятся карбоксигруппы в составе углеводного полимера. Присутствие декстрана на поверхности подтверждено седиментацией частиц в присутствии конканавалина А, связывающего сахара, а следовательно, и частицы с полисахаридом на поверхности между собой [24]. Таким образом, использование карбоксиметилдекстрана позволяет ускорить синтез и сразу после реакции Штобера получить маркеры, готовые к конъюгации с белками.

Морфологию синтезированных в этаноле и метаноле магнитно-кремниевых наночастиц $m\text{-cit-SiO}_2$ с карбоксигруппами на поверхности и частиц $m\text{-CMD-SiO}_2$, синтезированных в метаноле, изучали методами просвечивающей электронной микроскопии и электронной микродифракции (рис. 3).

Полученные микроэлектронные изображения позволили установить, что все синтезированные наночастицы представляют собой многоядерные структуры, содержащие от 2 до 30 ядер магнетита и имеющие сплошную оболочку из оксида кремния толщиной от 2 (рис. 3А) до 30 нм (рис. 3В). Частицы $m\text{-CMD-SiO}_2$ в среднем были более многоядерными, чем $m\text{-cit-SiO}_2$, и имели предел детекции 2.7 нг в 20 мкл раствора, что сравнимо или превосходит множество широко используемых в магнитометрии

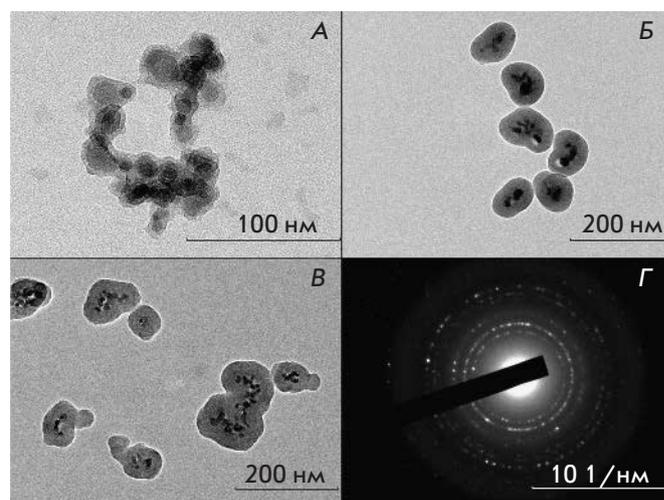


Рис. 3. Электронные микрофотографии типичного строения магнитно-кремниевых наночастиц. Частицы были синтезированы в метаноле (А) и этаноле (Б) через промежуточное покрытие цитрат-анионом, в этаноле через промежуточное покрытие карбоксиметилдекстраном (В). Г — картина дифракции электронов на образце наночастиц магнетита

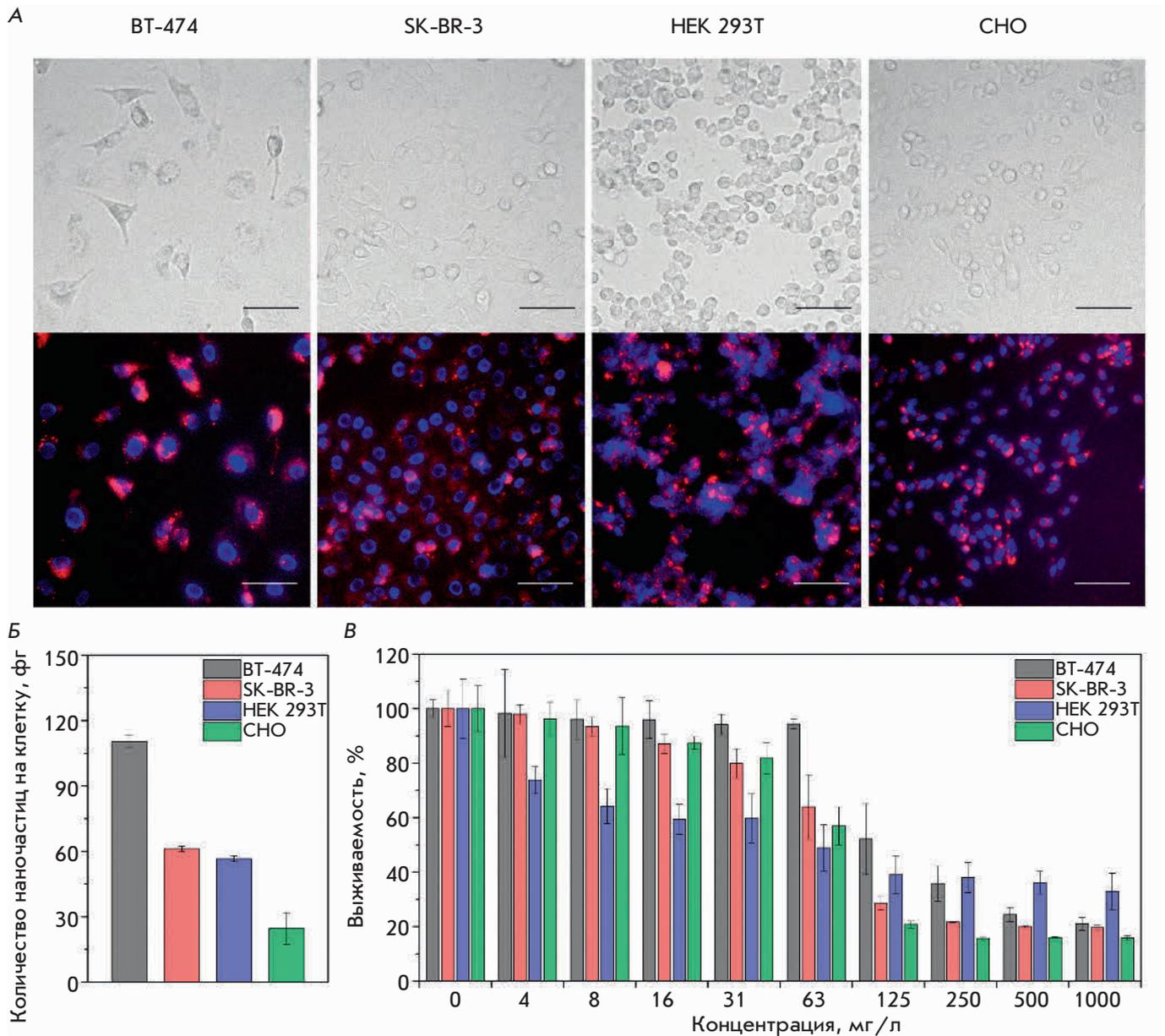


Рис. 4. Мечение клеток эукариот синтезированными магнитно-флуоресцентными наночастицами $m\text{-CMD-SiO}_2$. А – флуоресцентная микроскопия: визуализация клеток различного происхождения наночастицами $m\text{-CMD-SiO}_2$. Верхняя панель: изображения в проходящем свете. Нижняя панель – наложение изображений при возбуждении флуоресценции (для наночастиц – возбуждение 545/30, эмиссия 610/75, для окрашивания ядер клеток красителем Hoechst 33342 – возбуждение 360/40, эмиссия 470/40). Шкалы – 75 мкм. Б – взаимодействие наночастиц $m\text{-CMD-SiO}_2$ с клетками, измеренное методом MPQ-цитометрии. В – цитотоксичность наночастиц $m\text{-CMD-SiO}_2$

методов. Следует отметить, что размер наночастиц, определенный в результате анализа изображений, согласуется с данными, полученными методом динамического светорассеяния. Изучение дифракционного спектра магнитных ядер показало, что ядра состоят из магнетита Fe_3O_4 , кристаллографическая группа типа Fd3m (кубическая система), основные

межплоскостные расстояния в кристалле – 0.49; 0.29; 0.25; 0.21; 0.17; 0.15 нм. Самая сильная линия – 0.25 нм.

Синтез магнитных наночастиц, способных эффективно взаимодействовать с поверхностью живых клеток, востребован в таких областях, как МРТ-мониторинг стволовых клеток, магнитно-ассоциированная тканевая инженерия, магнетофекция эу-

кариотических клеток и ряде других. Предыдущие исследования показали, что одной из важных характеристик, определяющих взаимодействие частиц с белками и клетками, является величина дзета-потенциала [25]. В то время как положительный заряд на поверхности частицы приводит к более активной адсорбции белков, сильный отрицательный заряд существенно увеличивает эффективность клеточного поглощения частиц [25].

В данной работе показано эффективное мечение отрицательно заряженными m-CMD-SiO₂-частицами эукариотических клеток различного тканевого происхождения, полученных из разных организмов. Клеточные линии BT-474, SK-BR-3, НЕК 293Т, СНО инкубировали с наночастицами и отмывали от несвязавшихся частиц для дальнейшего анализа. С использованием флуоресцентной микроскопии установлено, что эти частицы способны эффективно визуализировать клетки эукариот (рис. 4А), сохраняя при этом целостность клеточной мембраны. При взаимодействии с мембраной клеток частицы, несмотря на их высокую коллоидную стабильность, проявляли склонность к образованию ярких и визуально детектируемых крупных конгломератов.

Наночастицы, используемые в качестве маркеров клеточной поверхности, должны обладать высокой биосовместимостью. Поэтому мы сравнили цитотоксичность частиц в формате МТТ-теста. При концентрации наночастиц, использованной для визуализации клеток, а именно 0.01 г/л, более 85% клеток (за исключением линии НЕК 293Т) сохраняло свою жизнеспособность (рис. 4В). При этом для всех четырех клеточных линий IC₅₀ m-CMD-SiO₂-частиц находилось в диапазоне 63–125 мг/л, что говорит об их низкой цитотоксичности, сравнимой с токсичностью других используемых *in vivo* магнитных наночастиц [26].

Интересно отметить, что флуоресцентные соединения на основе рутения (II) предлагается использовать в качестве химиотерапевтического агента [27]. Однако в нашем случае наличие рутения (II) не сильно влияло на токсичность частиц, вероятно, за счет его прочной фиксации в сплошной оболочке оксида кремния.

Физико-химические свойства этих частиц, такие, как флуоресценция, магнетизм, а также возможность эффективной модификации биомолекулами, делают особенно перспективным их диагностическое использование. Эти наночастицы позволяют проводить одновременно и визуализацию, и количественную детекцию накопления данных частиц в исследуемых местах локализации. Так, методом МРQ-цитометрии мы провели количественное ис-

следование взаимодействия наночастиц m-CMD-SiO₂ с указанными клеточными линиями и выявили статистически различное накопление наночастиц в различных клетках, выраженное в массовом содержании частиц на клетку (BT-474: 110.4 ± 1.3, SK-BR-3: 61.1 ± 1.2, НЕК 293Т: 56.6 ± 1.3, СНО: 24.6 ± 7.2 фг/клетку). Можно отметить, что даже более малые количества магнитных частиц, связанных с клетками, достаточны не только для *in vitro* визуализации клеток, но и для трекинга клеток в живом организме [28].

Таким образом, нами получены магнитные и магнитно-флуоресцентные частицы с заданным функционалом: магнетизм, флуоресценция, контролируемые поверхностные свойства. Данные частицы были эффективно использованы для мечения клеток эукариот с сохранением целостности и жизнеспособности клеток. Эти частицы можно с высокой чувствительностью детектировать оригинальным методом регистрации нелинейных магнетиков. Синтезированные нами наночастицы, покрытые SiO₂, можно далее «оснастить» молекулами различных биополимеров [29] и использовать для направленной терапии. Кроме того, они могут выступать в качестве перспективных маркеров клеточной поверхности, используемых в биологии и биомедицине: молекулярной и клеточной биологии, инженерии тканей, различных форматах иммуноанализа, а также в областях нанобиотехнологии, где необходимо высокоэффективное мечение клеток магнитными частицами с целью дальнейшего воздействия на полученные комплексы «клетка–наночастица» [30]. ●

Исследование выполнено при частичной поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 14-24-00106-П (синтез, модификация и изучение стабильности магнитно-кремниевых наночастиц), Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 17-02-01415 (характеризация строения наночастиц и количественная детекция магнитных маркеров), Российского фонда фундаментальных исследований и Фонда поддержки научно-проектной деятельности студентов, аспирантов и молодых ученых «Национальное интеллектуальное развитие» в рамках научного проекта № 17-34-80105 «мол_эв_а» (работа с клеточными культурами, анализ цитотоксичности, флуоресцентная микроскопия).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEF162117X0018.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoo D., Lee J. H., Shin T. H., Cheon J. // *Accounts Chem. Res.* 2011. V. 44. № 10. P. 863–874.
2. Aghayeva U.F., Nikitin M.P., Lukash S.V., Deyev S.M. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 2. P. 950–961.
3. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 277–296.
4. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nature Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 9. P. 716–722.
5. Wang Y., Shim M.S., Levinson N.S., Sung H.W., Xia Y. // *Adv. Funct. Materials.* 2014. V. 24. № 27. P. 4206–4220.
6. Huang J., Zhong X., Wang L., Yang L., Mao H. // *Theranostics.* 2012. V. 2. № 1. P. 86–102.
7. Gleich B., Weizenecker J. // *Nature.* 2005. V. 435. № 7046. P. 1214–1217.
8. Wilhelm C., Gazeau F., Bacri J.C. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. № 2. P. 118–125.
9. Devkota J., Kokkinis G., Berris T., Jamalieh M., Cardoso S., Cardoso F., Srikanth H., Phan M.H., Giouroudi I. // *RSC Advances.* 2015. V. 5. № 63. P. 51169–51175.
10. Gutierrez L., Mejias R., Barber D.F., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J., Lazaro F.J., Morales M.P. // *J. Physics D: Appl. Physics.* 2011. V. 44. № 25. P. 255002.
11. Quini C.C., Prospero A.G., Calabresi M.F., Moretto G.M., Zufelato N., Krishnan S., Pina D.R., Oliveira G.M., Baffa O., Bakuzis A.F., et al. // *Nanomedicine: NBM.* 2017. V. 13. № 4. P. 1519–1529.
12. Levy M., Luciani N., Alloyeau D., Elgrabli D., Deveaux V., Pechoux C., Chat S., Wang G., Vats N., Gendron F., et al. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 16. P. 3988–3999.
13. Nikitin M.P., Vetoshko P.M., Brusnetsov N.A., Nikitin P.I. // *J. Magnetism Magnetic Materials.* 2009. V. 321. № 10. P. 1658–1661.
14. Xi Z., Zheng B., Wang C. // *Nanosci. Nanotechnol. Lett.* 2016. V. 8. № 12. P. 1061–1066.
15. Slowing I.I., Vivero-Escoto J.L., Wu C.W., Lin V.S.Y. // *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1278–1288.
16. Stober W., Fink A., Bohn E. // *J. Colloidal Interface Sci.* 1968. V. 26. № 1. P. 62–69.
17. Weissleder R., Nahrendorf M., Pittet M.J. // *Nat. Materials.* 2014. V. 13. № 2. P. 125–138.
18. Shipunova V.O., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Deyev S.M. // *Nanoscale.* 2016. V. 8. № 25. P. 12764–12772.
19. Sakurai S., Namai A., Hashimoto K., Ohkoshi S.I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 51. P. 18299–18303.
20. Yang D., Hu J., Fu S. // *J. Phys. Chem. C.* 2009. V. 113. P. 7646–7651.
21. Mansour H.M., Rhee Y.S., Wu X. // *Int. J. Nanomed.* 2009. V. 4. P. 299–319.
22. Qian L., Yang X.R. // *Adv. Funct. Materials.* 2007. V. 17. № 8. P. 1353–1358.
23. Wu X., Liu H., Liu J., Haley K.N., Treadway J.A., Larson J.P., Ge N., Peale F., Bruchez M.P. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 41–46.
24. Zhang J., Roll D., Geddes C.D., Lakowicz J.R. // *J. Phys. Chem. B.* 2004. V. 108. № 32. P. 12210–12214.
25. Patil S., Sandberg A., Heckert E., Self W., Seal S. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. № 31. P. 4600–4607.
26. Bahadar H., Maqbool F., Niaz K., Abdollahi M. // *Iranian Biomed. J.* 2016. V. 20. № 1. P. 1–11.
27. Han Ang W., Dyson P.J. // *Eur. J. Inorganic Chem.* 2006. V. 2006. № 20. P. 4003–4018.
28. Lu C.W., Hung Y., Hsiao J.K., Yao M., Chung T.H., Lin Y.S., Wu S.H., Hsu S.H., Liu H.M., Mou C.Y., et al. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. № 1. P. 149–154.
29. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. P. 1–26.
30. Merkoci A. // *Biosensors Bioelectronics.* 2010. V. 26. № 4. P. 1164–1177.

УДК 577.21

Новый гибридный промотор ARE-hTERT для генной терапии рака

С. В. Калининко^{1#}, М. В. Шепелев^{1#*}, П. Н. Вихрева^{1,2}, И. В. Коробко¹¹Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова 34/5, Россия²MRC Toxicology Unit, University of Leicester, Leicester, UK

#Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

*E-mail: mshepelev@mail.ru

Поступила в редакцию 09.07.2017

Принята к печати 30.10.2017

РЕФЕРАТ Сконструирован новый гибридный опухолеспецифический промотор ARE-hTERT, состоящий из промотора гена *TERT* человека (hTERT) и генетических элементов антиоксидантного ответа (ARE) из промотора гена *GCLM* человека. Показано, что транскрипционная активность гибридного промотора повышена в опухолевых клетках с аномально активным фактором транскрипции Nrf2 и при индукции окислительного стресса, но при этом сохраняет опухолеспецифичность базального промотора hTERT. В *in vitro* схеме генной терапии фермент-пролекарство с применением химерного белка цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза и 5-фторцитозина гибридный промотор ARE-hTERT вызывал более выраженную гибель обработанных/необработанных химиотерапевтическими препаратами опухолевых клеток, чем промотор hTERT. Созданный нами гибридный промотор можно рассматривать в качестве лучшей альтернативы промотору hTERT в схемах генной терапии рака.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА промотор hTERT, ARE-элементы, окислительный стресс, гибридный промотор, генная терапия рака, опухолеспецифический промотор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ARE (antioxidant response element) – элементы антиоксидантного ответа; CMV (cytomegalovirus) – цитомегаловирус; GCLM (glutamate-cysteine ligase modifier subunit) – регуляторная субъединица глутамат-цистеин-лигазы; TERT (telomerase reverse transcriptase) – теломеразная обратная транскриптаза; tBHQ – (tert-butylhydroquinone) – *терт*-бутилгидрохинон; АФК – активные формы кислорода; ОЕЛ – относительные единицы люминесценции; СО – стандартное отклонение; ЦД : УФРТ – химерный белок дрожжевая цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза; 5ФЦ – 5-фторцитозин.

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия является динамически развивающимся подходом, применяемым при онкологических заболеваниях. В настоящее время получено разрешение на клиническое использование нескольких генно-терапевтических препаратов. Большое число препаратов находится на разных стадиях клинических исследований, и еще больше разрабатывается в лабораториях. Предложены различные подходы к обеспечению специфичности генно-терапевтических средств в опухолевых клетках, включая посттранскрипционную регуляцию уровня экспрессии трансгена за счет селективной стабилизации транскрипта в опухолевых клетках [1] или дестабилизации транскрипта в нормальных клетках [2]. При этом одной из наиболее используемых стратегий обеспечения специфичности генной терапии рака остается активация экспрессии трансгена преимущественно в опухолевых клетках за счет опухолеспецифических промоторов [3].

Использование опухолеспецифических промоторов, успешно применяемых во многих случаях, связано с рядом проблем, включая неабсолютную специфичность и низкую активность, что влияет на уровень экспрессии трансгена и соответственно на терапевтический эффект. В частности, один из наиболее охарактеризованных опухолеспецифических промоторов – промотор гена теломеразы человека (hTERT), активен в различных опухолях, что обеспечивает возможность воздействия на опухолевые клетки различного происхождения [3–7]. Тем не менее, промотор hTERT является достаточно слабым, что может влиять на эффективность проводимой терапии. Поэтому было предпринято несколько попыток повышения активности промотора hTERT. Показано, что слияние промотора hTERT с синтетическим ТАТА-боксом (нативный hTERT промотор не содержит ТАТА-боксы) или с минимальным ранним/предранним промотором цитомегаловируса (CMV) увеличивает активность промотора hTERT [8,

9]. Однако активность hTERT-промотора сильно зависит от используемых опухолевых клеточных линий, что снижает преимущество его универсальности [10]. Учитывая эти данные, можно констатировать, что необходимы новые подходы к усилению активности промотора hTERT в опухолевых клетках с сохранением его опухолеспецифичности.

Такие промоторы, как hTERT, проявляют опухолеспецифичность в результате их реактивации в опухолевых клетках, поэтому специфичность экспрессии трансгена можно повысить за счет использования генетических регуляторных элементов, которые либо отвечают на измененное микроокружение опухоли, либо аномально активны из-за соматических мутаций в опухолевых клетках. В качестве примера этой стратегии можно привести *cis*-действующие регуляторные элементы, определяющие транскрипционный ответ на окислительный стресс или гипоксию, характерные для многих опухолей. В частности, элементы антиоксидантного ответа (ARE), с которыми связывается фактор транскрипции Nrf2, основной активатор ответа на окислительный стресс, способны обеспечивать опухолеспецифическую экспрессию трансгена при соединении с базальным промотором [11]. В такой системе транскрипция поддерживается за счет аномальной активации Nrf2 в ответ на окислительный стресс или вследствие соматических мутаций, вызывающих конститутивную активацию Nrf2.

В данной работе показано, что комбинация ARE и опухолеспецифического промотора hTERT приводит к увеличению активности гибридного промотора ARE-hTERT в опухолевых клетках по сравнению с промотором hTERT. В то же время эта модификация не влияет на активность промотора в неопухолевых клетках, в которых Nrf2 в нормальных условиях не активен. Данный подход можно использовать для увеличения уровня экспрессии трансгенов и активности терапевтических белков в опухолевых клетках без снижения их специфичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеточных линий

Клеточные линии рака легкого человека Calu-1 (эпидермоидная карцинома, ECACC #93120818), NCI-H1299 (немелкоклеточный рак, ATCC #CRL-5803), A549 (немелкоклеточный рак, ATCC #CRL-185) и NCI-H358 (немелкоклеточная бронхоальвеолярная карцинома, ATCC #CRL-5807) культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) (HyClone, США), содержащей 10% фетальную бычью сыворотку (HyClone), пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) (Gibco, Великобритания). Клетки

бронхиального эпителия человека HBEpC (ECACC #502-05) культивировали в среде Bronchial Epithelial Growth Medium (Lonza, Швейцария). Для проведения экспериментов по оценке жизнеспособности клеток или измерению активности люциферазного репортерного гена клетки рассеивали в лунки 24-луночного планшета: NCI-H1299 – 20000 клеток на лунку; A549 – 30000; Calu-1 – 40000; NCI-H358 – 150000; HBEpC – 80000. На следующий день клетки трансфицировали с помощью реагента для трансфекции Unifectin-56 (Rusbiolink, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Плазмиды

Плазмида pH-TERT-Luc, несущая кДНК люциферазы светлячка под контролем промотора hTERT (-206...+37 н.), описана ранее [10]. Плазмида pARE-hTERT-Luc, несущая кДНК люциферазы светлячка под контролем гибридного промотора ARE-hTERT, получена путем клонирования 56 п.н. ARE-элемента (TGAGTAACGGTTACGAAGCACTT-TCTCGGCTACGATTTCTGCTTAGTCATTGTCTT) из промотора гена *GCLM* человека в 5'-область промотора hTERT в плазмиду pH-TERT-Luc [12]. Плазмиды pH-TERT-CD : UPRT и pARE-hTERT-CD : UPRT для продукции химерного белка дрожжевая цитозиндезаминаза : урацилфосфорибозилтрансфераза (ЦД : УФРТ) под контролем промоторов hTERT или ARE-hTERT соответственно созданы на основе вектора pBluescriptII SK⁻ (Stratagene, США) [13]. Сигнал терминации транскрипции и полиаденилирования вируса SV40 из плазмиды pBK-CMV (Stratagene) клонировали в 3'-область кДНК ЦД : УФРТ.

Химические вещества

Использовали *терт*-бутилгидрохинон (tBHQ), доксорубин, цисплатин, этопозид и 5ФЦ производства Sigma-Aldrich, США.

Измерение активности репортерного гена люциферазы

Смесью репортерной плазмиды, несущей кДНК люциферазы светлячка (pH-TERT-Luc, pARE-hTERT-Luc или pGL3-Basic (плазмида без промотора, Promega, США)) и плазмиды pRL-CMV (Promega), несущей кДНК люциферазы *Renilla* под контролем предраннего энхансера/промотора CMV, трансфицировали по три лунки для каждой экспериментальной точки. До определения активности люциферазы клетки, если указано специально, обрабатывали 100 мкМ tBHQ в течение 24 ч. Активность люциферазы измеряли через 2 дня после трансфекции с использованием набора реагентов Dual-Luciferase[®] Reporter

Assay System (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Активность люциферазы светлячка нормировали на активность люциферазы *Renilla* и вычисляли среднее значение относительных единиц люминесценции (ОЕЛ) и стандартное отклонение (СО).

Измерение жизнеспособности клеток

Клетки трансфицировали плазмидами, кодирующими ЦД : УФРТ, или пустым вектором рВК-СМV и рассеивали в лунки 96-луночного планшета через 24 ч после трансфекции (2000 клеток линий NCI-H1299, A549 и Calu-1 на лунку; 5000 – клеток линии NCI-H358). 5ФЦ и/или этопозид, цисплатин или доксорубин добавляли к клеткам через 24 ч после посева. Культуральную среду, содержащую 5ФЦ и/или химиотерапевтические препараты, меняли на свежую через 24 и 96 ч инкубации. Культуральная среда клеток, инкубируемых в течение 24–96 ч, если указано, содержала tBHQ в концентрации 100 мкМ. Количество живых клеток оценивали после 120 ч инкубации с использованием набора реагентов CellTiter96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) в соответствии с протоколом производителя. Каждую экспериментальную точку анализировали в трех повторах. Количество живых клеток нормировали на принятое за 100% количество живых клеток, инкубированных в отсутствие 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дизайн гибридного промотора ARE-hTERT

Способность различных ARE из генов, регулируемых транскрипционным фактором Nrf2, обеспечивать экспрессию трансгена в условиях окислительного стресса была проанализирована ранее. Показано, что наивысший уровень экспрессии трансгена обеспечивал ARE *GCLM* [12]. На основании этих данных мы поместили элемент ARE из промотора гена *GCLM* человека в 5'-область относительно фрагмента -206...+37 н. промотора hTERT, содержащего сайт начала транскрипции и способного обеспечивать опухолевую специфическую экспрессию трансгена [5].

Активность гибридного промотора ARE-hTERT в опухолевых и нормальных клетках

Активность промоторов hTERT и ARE-hTERT в нормальных и опухолевых клетках сравнивали с помощью двойного люциферазного теста. В трех из четырех клеточных линий рака легкого человека (NCI-H1299, Calu-1 и A549) активность промотора ARE-hTERT была в 2–3 раза выше активности промотора hTERT, тогда как в клетках линии NCI-H358

присутствие ARE не влияло на активность промотора (рис. 1, образцы «-tBHQ»). Важно отметить, что не выявлено влияния ARE на активность гибридного промотора в неопухолевых клетках HBePC: относительная активность люциферазы в клетках, трансфицированных плазмидами pARE-hTERT-Luc и rhTERT-Luc, составляла 1.41 ± 0.45 и 1.00 ± 0.214 ($P = 0.2272$, двунаправленный *t*-критерий Стьюдента) соответственно. Следовательно, в трех из четырех клеточных линий рака легкого человека промотор ARE-hTERT был более активен, чем промотор hTERT, при этом модификация не влияла на его активность в нормальных клетках.

Индукция окислительного стресса стимулирует активность гибридного промотора

Мы изучали возможность увеличения активности промотора ARE-hTERT в опухолевых клетках под действием окислительного стресса. Обработка клеток линии NCI-H358 веществом tBHQ приводила к ~2.5-кратному увеличению активности репортерного гена люциферазы под контролем промотора ARE-hTERT, но не влияла на активность промотора hTERT (рис. 1, образцы «+tBHQ»), что согласуется с данными о влиянии внешнего окислительного стресса на активность ARE гена *GCLM* [12]. Добавление tBHQ не влияло на активность промотора ARE-hTERT в клетках Calu-1, A549 и NCI-H1299, в которых активность промотора ARE-hTERT была существенно выше активности hTERT-промотора в отсутствие индукции окислительного стресса (рис. 1, образцы «+tBHQ»). Таким образом, в опухолевых клетках в базальных условиях гибридный промотор ARE-hTERT проявляет более высокую активность, чем промотор hTERT. Это может быть следствием часто наблюдаемой в опухолевых клетках аномальной активации транскрипционного фактора Nrf2, обусловленной соматическими мутациями, либо повышенным уровнем активных форм кислорода (АФК) [14–19]. Транскрипционную активность промотора ARE-hTERT в клетках с ее низким базальным уровнем можно увеличить путем обработки клеток индукторами окислительного стресса, такими, как tBHQ.

Гибридный промотор ARE-hTERT повышает эффективность суицидальной генной терапии рака *in vitro* при использовании схемы фермент-пролекарство

Повышенная активность гибридного промотора ARE-hTERT в клетках NCI-H1299, Calu-1 и A549, наблюдаемая в люциферазном тесте, указывает на то, что введение ARE может улучшить свойства векторов для генной терапии рака. Чтобы получить прямой

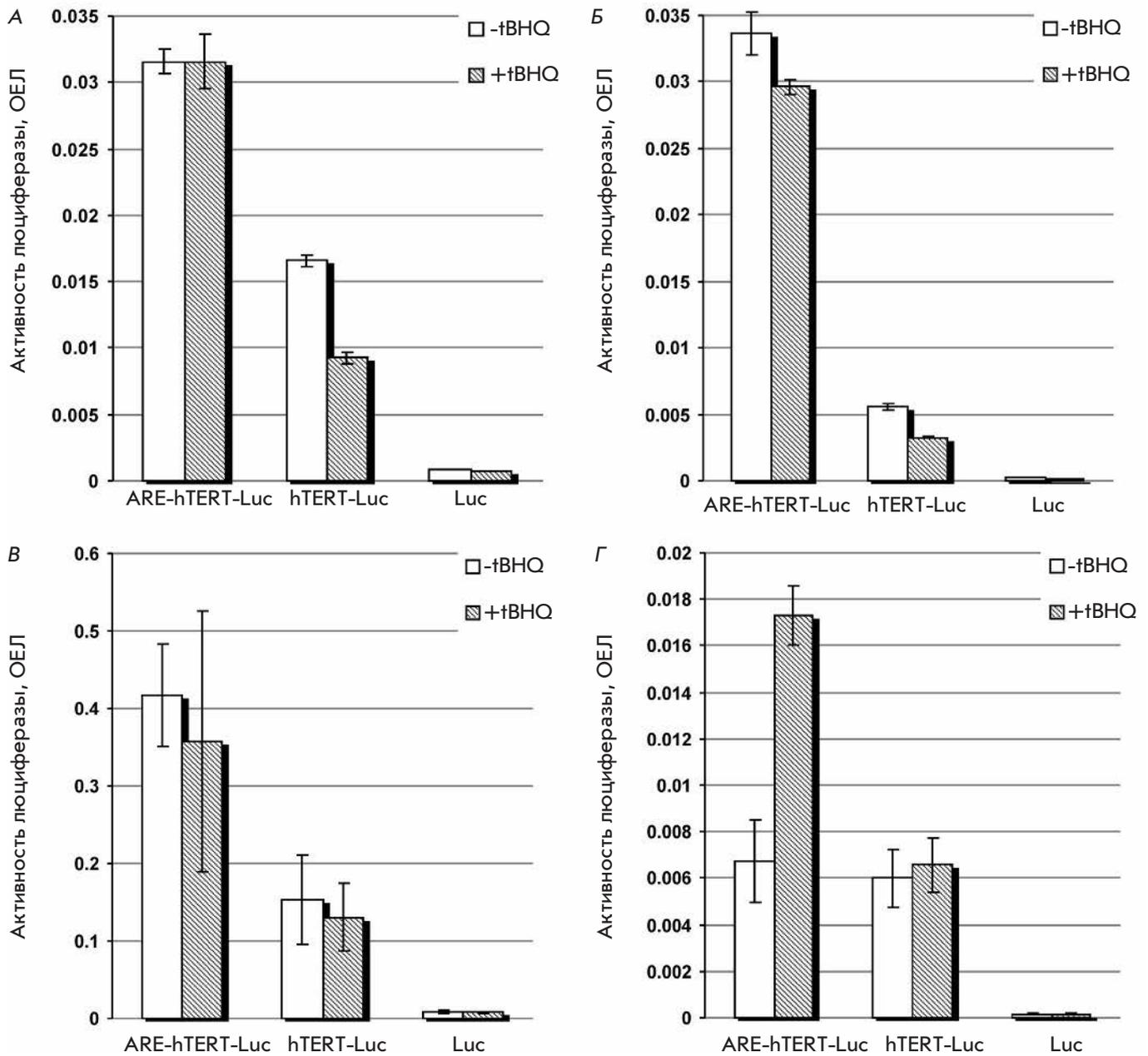


Рис. 1. Влияние модификации промотора hTERT с помощью последовательности ARE на активность репортерного гена люциферазы в клеточных линиях рака легкого. Активность репортерного гена люциферазы измеряли в клеточных линиях NCI-H1299 (А), Calu-1 (Б), A549 (B) и NCI-H358 (Г), трансфицированных плазмидами rhTERT-Luc (*hTERT-Luc*), pARE-hTERT-Luc (*ARE-hTERT-Luc*) и плазмидой без промотора pGL3-Basic (*Luc*) вместе с плазмидой pRL-CMV для нормирования. Если указано (заштрихованные столбцы), клетки обрабатывали tBHQ в концентрации 100 мкМ в течение 24 ч. Данные показаны как средние значения OEЛ ± CO

ответ на этот вопрос, сравнили гибель опухолевых клеток, экспрессирующих терапевтический трансген под контролем промотора hTERT или ARE-hTERT, в схеме суицидальной генной терапии фермент-пролекарство ЦД : УФРТ–5ФЦ [20]. Как и ожидалось, экспрессия ЦД : УФРТ под контролем промотора

ARE-hTERT приводила к более выраженной гибели клеток Calu-1, A549 и NCI-H1299 в присутствии 5ФЦ в той же концентрации по сравнению с экспрессией под контролем промотора hTERT (рис. 2А–В). При этом в клетках NCI-H358 экспрессия ЦД : УФРТ под контролем ARE-hTERT лишь

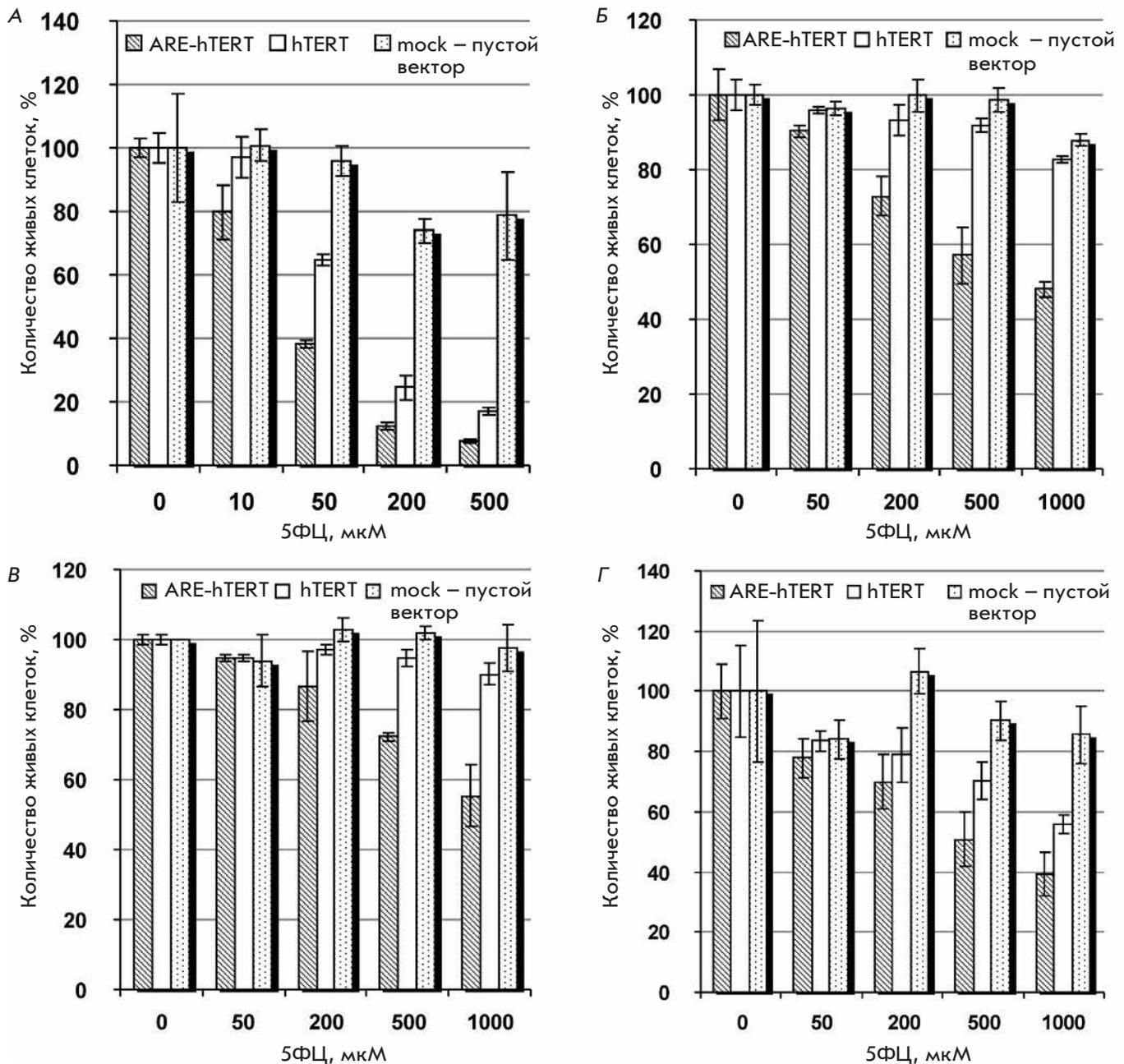


Рис. 2. Сравнение цитотоксического эффекта экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промоторов hTERT и ARE-hTERT в присутствии 5ФЦ в клеточных линиях рака легкого. Показано относительное количество живых клеток NCI-H1299 (А), Calu-1 (Б), А549 (В) и NCI-H358 (Г), трансфицированных плазмидами рARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы), рhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и пустым вектором рВК-СМV (mock, столбцы с точками), после инкубации с 5ФЦ в указанных концентрациях. Данные показаны как среднее значение (± СО) количества живых клеток относительно количества живых клеток, трансфицированных теми же плазмидами, но инкубированных без 5ФЦ

незначительно влияла на уровень цитотоксичности по сравнению с экспрессией под контролем промотора hTERT (рис. 2Г), что согласуется с результатами люциферазного теста. Обработка клеток NCI-H358 индуктором окислительного стресса tBHQ суще-

ственно усиливала цитотоксический эффект лишь при использовании промотора ARE-hTERT (рис. 3). Обработка клеток NCI-H1299, Calu-1 и А549 индуктором tBHQ не приводила к усилению цитотоксичности в случае использования промотора ARE-hTERT

(данные не показаны), более активного в базальных условиях по сравнению с промотором hTERT (рис. 1).

Экспрессия терапевтического трансгена под контролем промотора ARE-hTERT в схеме суицидальной генной терапии рака фермент-пролекарство более эффективно сенсibiliзирует опухолевые клетки к действию химиотерапевтических препаратов

Сообщалось о том, что суицидальная генная терапия рака по схеме фермент-пролекарство под контролем ARE увеличивает чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам, в частности, к доксорубину [11]. Поэтому мы исследовали влияние промотора ARE-hTERT на цитотоксичность при суицидальной генной терапии комбинацией фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ при одновременном использовании химиотерапевтических препаратов. Как видно из рис. 4А, экспрессия ЦД : УФРТ под контролем hTERT не вызывала гибель клеток NCI-H1299 в присутствии 10 мкМ 5ФЦ. Обработка 0.1 мкМ доксорубина приводила лишь к незначительной гибели клеток NCI-H1299. Важно отметить, что в тех же условиях использование промотора ARE-hTERT приводило к значительной гибели клеток (~40%), которая существенно потенцировалась при одновременной обработке доксорубином (рис. 4А). Сходные данные получены для клеток A549 и Calu-1, обработанных доксорубином, этопозином или цисплатином (рис. 4Б и данные не показаны). Важно отметить, что в использованных нами условиях генная терапия с применением промотора hTERT не оказывала эффекта, и не потенцировала действие химиотерапевтических препаратов. Тогда как модификация промотора с помощью ARE позволяла индуцировать выраженный цитотоксический эффект как в случае монотерапии, так и при комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы проверили гипотезу о том, что введение ARE в опухолеспецифический промотор, используемый для экспрессии трансгена в злокачественных клетках, может усилить активность промотора без существенного снижения опухолеспецифичности. Действительно, ранее было показано, что комбинация ARE и неселективного минимального промотора способна обеспечивать опухолеспецифическую экспрессию трансгена благодаря aberrантно активированному транскрипционному фактору Nrf2 [14-19] или вследствие присущего опухолевым клеткам высокого уровня АФК [11, 12]. Нами показано, что активность гибридного промотора, включающего промотор гена TERT человека и ARE из промотора

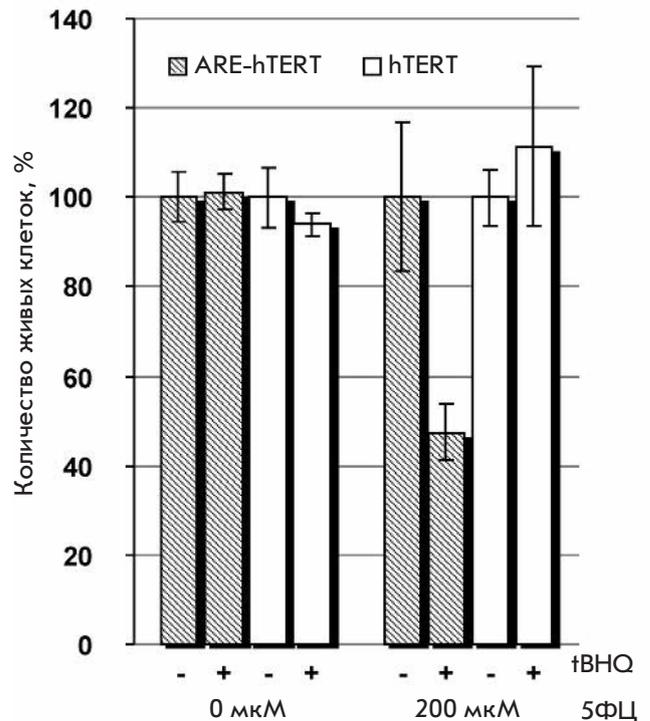


Рис. 3. В клетках NCI-H358 цитотоксический эффект от экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промотора ARE-hTERT в присутствии 5ФЦ усиливается индуктором окислительного стресса. Клетки NCI-H358 трансфицировали плазмидами pARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы) и rhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и определяли количество живых клеток после инкубации в отсутствие или в присутствии 200 мкМ 5ФЦ и/или 100 мкМ tBHQ, как указано. Данные показаны как среднее значение (± CO) количества живых клеток относительно количества живых клеток в образцах, обработанных сходным образом, но инкубированных в отсутствие 5ФЦ

гена GCLM человека, была выше в трех из четырех клеточных линий рака легкого человека как при измерении активности репортерного гена люциферазы, так и в схеме суицидальной генной терапии фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ *in vitro*. Модификация промотора hTERT с помощью ARE не влияла на его активность в клетках NCI-H358, что указывает на отсутствие аномальной регуляции Nrf2. Однако активность гибридного промотора в клетках NCI-H358 может стимулироваться индукторами окислительного стресса, такими, как tBHQ.

Важно отметить, что активность гибридного промотора ARE-hTERT не повышалась в первичных клетках эпителия бронхов человека HBEpC, что указывает на отсутствие влияния ARE на опухолеспецифичность транскрипции.

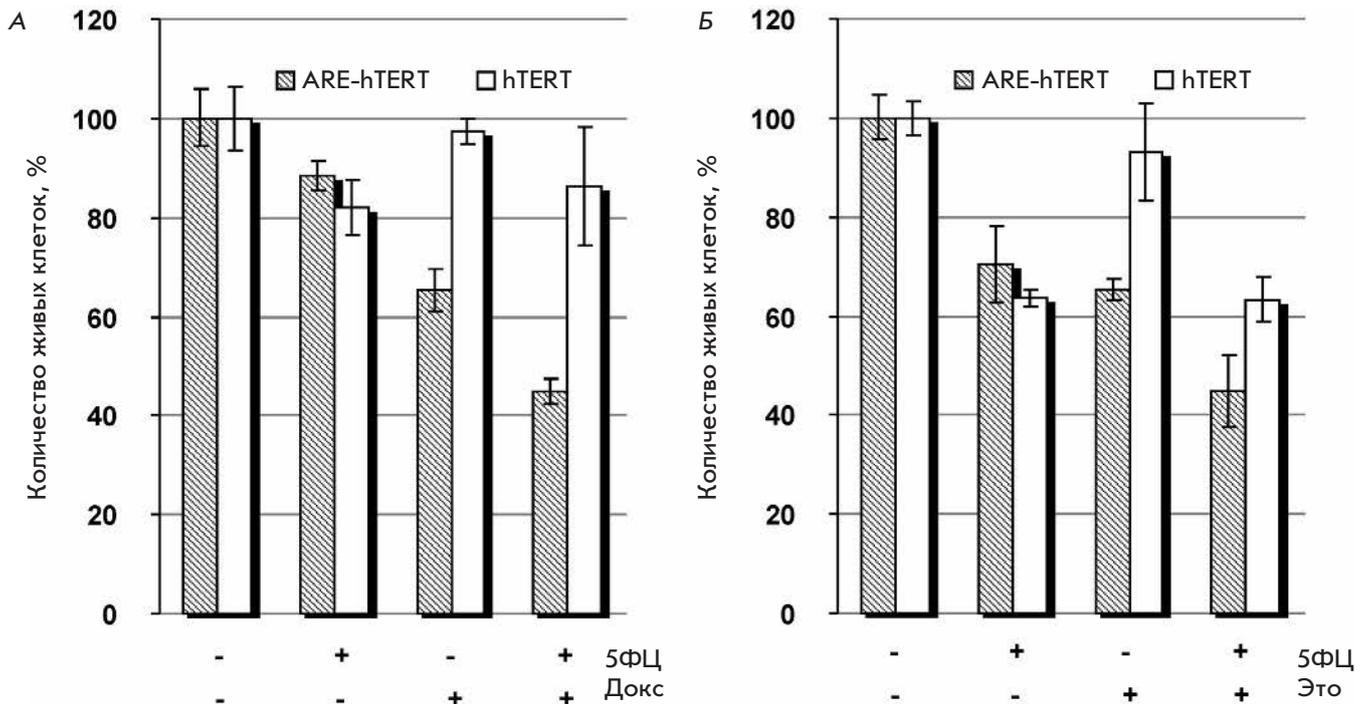


Рис. 4. Сравнение цитотоксического эффекта экспрессии ЦД : УФРТ под контролем промоторов hTERT и ARE-hTERT в присутствии комбинации 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов в клеточных линиях рака легкого. Клетки NCI-H1299 (А) и А549 (Б) трансфицировали плазмидами рARE-hTERT-CD : UPRT (заштрихованные столбцы) и рhTERT-CD : UPRT (пустые столбцы) и инкубировали в отсутствие или в присутствии 10 мкМ 5ФЦ и 0.1 мкМ доксорубина (Докс) (А) или 500 мкМ 5ФЦ и 2 мкМ этопозид (Это) (Б). Данные показаны как среднее значение (\pm СО) количества живых клеток относительно количества живых клеток в образцах, обработанных сходным образом, но инкубированных в отсутствие 5ФЦ и химиотерапевтических препаратов

Наши результаты показывают, что в существенной доле опухолей с активацией Nrf2 вследствие соматических мутаций гибридный промотор будет более активен, нежели обычный hTERT-промотор, при этом будет сохраняться высокая опухолеспецифичность экспрессии. Кроме того, опухолевые клетки в целом характеризуются повышенным уровнем АФК как *in vitro*, так и *in vivo*, что вызвано рядом факторов, таких, как изменение метаболизма и недостаточное кровоснабжение [21]. При этом многие химиотерапевтические препараты вызывают окислительный стресс, поэтому комбинация генной терапии с использованием промотора ARE-hTERT и химиотерапевтических препаратов *in vivo* способна еще больше увеличивать общую эффективность лечения за счет усиления экспрессии терапевтического трансгена.

Эффективность генной терапии рака определяется, прежде всего, уровнем экспрессии терапевтического трансгена, который должен быть достаточен для достижения требуемого эффекта. В данной рабо-

те мы использовали подход, основанный на системе фермент-пролекарство ЦД : УФРТ-5ФЦ, в котором общая эффективность терапии определяется эффективностью доставки плазмид в опухолевые клетки, активностью промотора и чувствительностью клеток к цитотоксическому веществу, которое образуется после конверсии пролекарства. Очевидно, эти параметры будут варьировать в различных типах клеток, потенциально приводя к снижению эффективности лечения. Действительно, схема генной терапии с экспрессией трансгена под контролем промотора hTERT не приводила к существенной гибели опухолевых клеток, и не наблюдалось потенцирования действия химиотерапевтических препаратов (рис. 4). Однако в тех же самых условиях генная терапия под контролем промотора ARE-hTERT вызывала цитотоксический эффект и существенно потенцировала цитотоксический эффект химиотерапевтических препаратов. Эти результаты показывают явные преимущества нового гибридного промотора ARE-hTERT в схемах генной терапии перед промотором hTERT.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами создан новый гибридный промотор, который сохраняет опухолеспецифичность базального промотора hTERT, но характеризуется повышенной транскрипционной активностью в опухолевых клетках, обусловленной или аномальной активацией транскрипционного фактора Nrf2, или повышением уровня АФК. Эти свойства позволяют рассматривать гибридный промотор ARE-hTERT как лучшую альтернативу промотору hTERT при использовании

в схемах генной терапии. Кроме того, комбинацию ARE-элементов с другими опухоле- или тканеспецифичными промоторами, используемыми для создания генно-терапевтических векторов, можно рассматривать как способ усиления их действия без существенной потери опухолеспецифичности. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
РФФИ № 13-04-40173.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shepelev M.V., Korobko E.V., Georgiev G.P., Sverdlov E.D., Korobko I.V. // *Cancer Gene Ther.* 2011. V. 18. № 9. P. 682–684.
2. Korobko I.V. // *Curr. Cancer Ther. Rev.* 2014. V. 10. № 3. P. 271–276.
3. Gu J., Fang B. // *Cancer Biol. Ther.* 2003. V. 2. № 4. Suppl. 1. P. S64–70.
4. Horikawa I., Cable P.L., Afshari C., Barret J.C. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 4. P. 826–830.
5. Takakura M., Kyo S., Kanaya N., Hirano H., Takeda J., Yutsudo M., Inoue M. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 3. P. 551–557.
6. Horikawa I., Barrett J.C. // *Carcinogenesis.* 2003. V. 24. № 7. P. 1167–1176.
7. Poole J.C., Andrews L.G., Tollefsbol T.O. // *Gene.* 2001. V. 269. № 1–2. P. 1–12.
8. Wirth T., Zender L., Schulte B., Mundt B., Plentz R., Rudolph K.L., Manns M., Kubicka S., Kühnel F. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 12. P. 3181–3188.
9. Davis J.J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. // *Cancer Gene Ther.* 2006. V. 13. № 7. P. 720–723.
10. Shepelev M.V., Kopantzev E.P., Vinogradova T.V., Sverdlov E.D., Korobko I.V. // *Oncol. Lett.* 2016. V. 12. № 2. P. 1204–1210.
11. Leinonen H.M., Ruotsalainen A.K., Määttä A.M., Laitinen H.M., Kuosmanen S.M., Kansanen E., Pikkarainen J.T., Lappalainen J.P., Samaranayake H., Lesch H.P., et al. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 3. P. 6227–6235.
12. Hurttila H., Koponen J.K., Kansanen E., Jyrkkänen H.K., Kivelä A., Kylätie R., Ylä-Herttua S., Levonen A.L. // *Gene Ther.* 2008. V. 15. № 18. P. 1271–1279.
13. Kuzmin D.V., Vinogradova T.V., Kopantzev E.P., Sverdlov E.D. // *Open Gene Ther. J.* 2010. V. 3. P. 31–39.
14. Hayes J.D., McMahon M. // *Trends Biochem. Sci.* 2009. V. 34. № 4. P. 176–188.
15. Kim Y.R., Oh J.E., Kim M.S., Kang M.R., Park S.W., Han J.Y., Eom H.S., Yoo N.J., Lee S.H. // *J. Pathol.* 2010. V. 220. № 4. P. 446–451.
16. Konstantinopoulos P.A., Spentzos D., Fountzilas E., Francoeur N., Sanisetty S., Grammatikos A.P., Hecht J.L., Cannistra S.A. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. № 15. P. 5081–5089.
17. Seng S., Avraham H.K., Birrane G., Jiang S., Li H., Katz G., Bass C.E., Zagazdzon R., Avraham S. // *Oncogene.* 2009. V. 28. № 3. P. 378–389.
18. Zhang P., Singh A., Yegnasubramanian S., Esopi D., Kombairaju P., Bodas M., Wu H., Bova S.G., Biswal S. // *Mol. Cancer Ther.* 2010. V. 9. № 2. P. 336–346.
19. Cairns R.A., Harris I.S., Mak T.W. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. № 2. P. 85–95.
20. Adachi Y., Tamiya T., Ichikawa T., Terada K., Ono Y., Matsu-moto K., Furuta T., Hamada H., Ohmoto T. // *Hum. Gene Ther.* 2000. V. 11. № 1. P. 77–89.
21. Brown N.S., Bicknell R. // *Breast Cancer Res.* 2001. V. 3. № 5. P. 323–327.

УДК 577.21

Мультилокусный анализ генетической предрасположенности к инфаркту миокарда у русских: репликационное исследование

Н. Г. Кукава^{1#}, Б. В. Титов^{1,2#}, Г. Ж. Осьмак^{1,2}, Н. А. Матвеева^{1,2}, О. Г. Кулакова^{1,2},
А. В. Фаворов³, Р. М. Шахнович¹, М. Я. Руда¹, О. О. Фаворова^{1,2*}

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

³Oncology Biostatistics and Bioinformatics, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21205, US

#Эти авторы внесли равный вклад в исследование.

*E-mail: olga.favorova@gmail.com

Поступила в редакцию 14.04.2017

Принята к печати 28.09.2017

РЕФЕРАТ В поисках генетических маркеров риска инфаркта миокарда (ИМ), обладающих прогностической значимостью для русского этноса, провели репликационное исследование ассоциации с ИМ вариантов генов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) у 405 пациентов, перенесших ИМ, в сравнении с 198 индивидами контрольной группы. Наблюдали значимую ассоциацию вариантов генов липидного обмена *PCSK9*, *APOE* и *LPL*, а также гена *eNOS* с ИМ. Варианты гена *MTHFR* и rs1333049 области 9p21 оказались незначимыми поодиночке, но входили в состав нескольких различных ИМ-ассоциированных аллельных сочетаний, обнаруженных с помощью мультилокусного анализа. Нелинейных эпистатических взаимодействий между компонентами найденных сочетаний не обнаружено. Сделано заключение, что кумулятивный эффект генов в составе сочетания возникает в результате суммирования их малых независимых вкладов. С помощью ROC-анализа оценивали прогностическую значимость аддитивной композитной модели, построенной с использованием генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS* как генетических маркеров. После включения этих маркеров в ранее опубликованную нами композитную модель индивидуального генетического риска ИМ предсказательная эффективность достигла значения $AUC = 0.676$. Однако результаты, полученные в настоящем исследовании, безусловно, нуждаются в воспроизведении на независимой выборке русских.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллельный полиморфизм, генетические маркеры, гены, инфаркт миокарда, мультилокусный анализ, русские.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AUC – площадь под кривой (area under curve) при ROC-анализе; GWAS – полно-геномное ассоциативное исследование (genome-wide association study); NO – оксид азота; ROC – рабочая характеристика приемника (receiver operating characteristic); SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism); ДИ – доверительный интервал; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ИМ – инфаркт миокарда; ОШ – отношение шансов; ПО – программное обеспечение; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-SSP – ПЦР с применением аллель-специфических праймеров; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ср. в. – средний возраст.

ВВЕДЕНИЕ

Инфаркт миокарда (ИМ) – наиболее тяжелая форма ишемической болезни сердца (ИБС). Несмотря на значительный прогресс в предотвращении и лечении сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), достиг-

нутый за последние десятилетия в ведущих странах мира, ИМ остается наиболее частой причиной смерти населения в мировом масштабе.

Как ИМ, так и ИБС представляют собой мультифакториальные полигенные заболевания, и прису-

щий им не-Менделевский характер наследования является следствием взаимодействия вариантов ряда генов. Генетическая предрасположенность к ИБС хорошо изучена с помощью полногеномных ассоциативных исследований (GWAS), тогда как для ИМ как отдельного фенотипа проведено относительно немного полногеномных исследований [1, 2]. Наблюдается довольно плохая воспроизводимость немногочисленных ИМ-ассоциированных локусов, выявленных в отдельных работах, что может быть связано с этническими различиями между выборками. Хотя GWASs направлены на поиск генетических вариантов, которые позволили бы оценивать риск ИМ, отмечается, что пока они не привели к прогрессу в прогнозировании риска этого заболевания [3].

Не удивительно, что традиционный подход «ген-кандидат» сохраняет свою значимость. Накоплены обширные данные по ассоциации отдельных генов-кандидатов с ИМ у жителей России, многие из которых получены российскими участниками международных проектов MONICA [4] и HAPIEE [5]. Особое значение при выявлении факторов генетической предрасположенности придается воспроизведению (репликации) полученных результатов как на независимых выборках представителей того же этноса, так и в других этнических группах. Ранее мы наблюдали, что варианты генов *FGB*, *TGFB1*, *CRP*, *IFNG* и *PTGS1*, продукты которых вовлечены в системы воспаления и коагуляции, ассоциированы с риском развития ИМ у этнических русских, и реплицировали эти результаты на независимой выборке русских [6]. Показана прогностическая значимость найденных маркеров, причем эффективность прогноза существенно повышается при суммировании вкладов отдельных генов. Однако идентифицированные локусы объясняют только незначительную долю риска ИМ. В поисках других генетических маркеров риска ИМ, имеющих прогностическую значимость для русских, в настоящей работе мы расширили круг исследуемых нами генов-кандидатов, включив в него гены системы липидного обмена (*PCSK9*, *LPL* и *APOE*), гены *MTHFR* и *eNOS*, а также локус в области 9p21.

Известно, что продукты выбранных генов липидного обмена вовлечены в развитие ССЗ. Показано, что белок *PCSK9* (пропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9), кодируемый геном *PCSK9*, участвует в деградации рецепторов липопротеинов низкой плотности и служит мишенью при терапии дислипидемией и связанных с ней ССЗ [7]. Продукт гена *APOE*, аполипопротеин Е, участвует в транспорте липидов и играет важную роль в развитии ССЗ [8]. Кодируемая геном *LPL* липопротеинлипаза является ключевым ферментом метаболизма и транспорта липидов и участвует в патогенезе атеросклероза [9].

Хорошо известна также роль продуктов генов *MTHFR* и *eNOS* в патогенезе ССЗ. *MTHFR* кодирует фермент метилентетрагидрофолатредуктазу, участвующую в превращении гомоцистеина в метионин. Гомоцистеинемия может приводить к дисфункции эндотелия, что является фактором риска атеросклероза и связанных с ним ССЗ. [10]. Кодируемая геном *eNOS* эндотелиальная синтаза оксида азота (NO) катализирует образование NO, участвующего в регуляции тонуса и проницаемости сосудистой стенки; нарушения в системе NO могут приводить к атеросклерозу, гипертонии и тромбозу [11].

Ассоциацию rs1333049 в области 9p21 с ИМ наблюдали в нескольких GWAS и валидировали в ряде этносов. В этом локусе находится ген некодирующей регуляторной РНК ANRIL. Эта РНК может влиять на экспрессию ингибиторов циклинзависимых киназ $p15^{INK4a}$ и $p16^{INK4b}$, которые кодируются генами *CDKN2A* и *CDKN2B*, расположенными в той же области. Предполагают, что область 9p21 может участвовать в патогенезе атеросклероза через регуляцию пролиферации и апоптоза гладкомышечных клеток [12].

Целью нашей работы было репликационное исследование ассоциации вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL*, *MTHFR*, *eNOS* и области 9p21 с риском развития ИМ у русских. В табл. 1 представлены характеристики выбранных генов и однонуклеотидных полиморфизмов (SNP). Мы провели также мультилокусный анализ ассоциации сочетаний вариантов этих генов/локусов с ИМ, поскольку такой подход создает возможность выявления кумулятивного эффекта генов [13], и исследовали природу этого эффекта. Мы оценили прогностическую эффективность найденных маркеров как по отдельности, так и совместно с ранее найденными маркерами [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследовании методом «случай-контроль» использовали образцы геномной ДНК больных ИМ, которые проходили лечение в отделе неотложной кардиологии Национального медицинского исследовательского центра кардиологии Минздрава РФ. Группа больных включала 405 человек, этнических русских, средний возраст (ср. в.) \pm стандартное отклонение 57.5 ± 12.8 лет. Из них 271 мужчина (ср. в. 53.4 ± 11.9 лет) и 134 женщины (ср. в. 65.6 ± 10.3 лет). Диагноз ИМ ставился согласно критериям [14]. Контрольная группа состояла из 198 лиц, русских, без ССЗ в анамнезе, ср. в. 59.8 ± 13.3 лет. Из них 112 мужчин (ср. в. 57.1 ± 11.9 лет) и 86 женщин (ср. в. 63.2 ± 14.2 лет). От всех индивидов получено информированное согласие на проведение исследования.

Таблица 1. Включенные в исследование гены и их полиморфные участки

Ген	Хромосомная локализация	Продукт(ы) гена	Полиморфный участок*	
			SNP	rs ID
<i>PCSK9</i>	1p32.3	Пропропротеин-конвертаза субтилизин-кексинового типа 9	1420G > A	rs562556
<i>APOE</i>	19q13.2	Аполипопротеин E	эпсилон-полиморфизм	rs7412, rs429358
<i>LPL</i>	8p22	Липопротеинлипаза	495T > G (HindIII H+>H-)	rs320
<i>MTHFR</i>	1p36.22	5,10-Метилентетрагидрофолатредуктаза	677C > T	rs1801133
<i>eNOS</i> (другое название <i>NOS3</i>)	7q36	Эндотелиальная синтаза оксида азота	-786T > C	rs2070744
кластер генов <i>ANRIL</i> и <i>CDKN2A/2B</i>	9p21.3	Длинная некодирующая РНК (ген <i>ANRIL</i>); ингибиторы 2A и 2B циклинзависимой киназы (гены <i>CDKN2A</i> , <i>CDKN2B</i>)	C > G	rs1333049

*Исследуемый однонуклеотидный полиморфизм (SNP) и его обозначение по референсной нуклеотидной последовательности генома человека (rs ID).

Геномное типирование проводили методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для эпсилон-полиморфизма гена *APOE* (rs7412, rs429358) [15], 495T > G гена *LPL* (rs320) [16], 677C > T *MTHFR* (rs1801133) [17] и -786T>C гена *eNOS* (rs2070744) [18] проводили анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР. Геномное типирование rs562556 *PCSK9*, rs1333049 в области 9p21.3 осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени с применением набора TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems).

Статистический анализ

Анализ отклонения наблюдаемых частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга проводили с использованием программы Haploview 4.2 [19]. Поиск ассоциаций носительства аллелей и генотипов отдельных SNP и их сочетаний с развитием ИМ проводили с помощью программного обеспечения (ПО) APSampler [20]. Значимость найденных ассоциаций оценивали с помощью точного критерия Фишера и по значениям отношения шансов (ОШ). Для величин p по Фишеру вводили поправку на число тестов (множественных сравнений) в соответствии с методом Бонферрони (p_{corr}). Величины p и p_{corr} считали значимыми при уровне < 0.05 при условии, что значения 95% доверительного интервала (ДИ) для ОШ не пересекали 1. Считали SNP ассоциированным с ИМ, если ассоциация была значимой либо в рецессивной, либо в доминантной модели.

Для выявления возможного нелинейного взаимодействия (эпистаза) между аллелями в найден-

ных биаллельных сочетаниях использовали подход, предложенный нами ранее [6], определяя величины p в точном трехфакторном тесте [21] и фактор синергии (SF) [22]. Взаимодействие между аллелями в сочетании рассматривали как эпистатическое, если величина p была менее 0.05, а значение 95% ДИ для SF не пересекало 1.

Для построения предиктивных моделей использовали метод логистической регрессии с пошаговым включением переменных (пакет stats v.3.3.1 for R). Прогностическую эффективность оценивали по площади под кривой (AUC) при ROC (receiver operating characteristic) анализе с использованием пакета rROC v.1.8 for R; парные сравнения проводили по методу [23]. Для оценки чувствительности и специфичности предиктивных моделей рассчитывали пороговый уровень вероятности по методу [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Равновесие Харди-Вайнберга соблюдалось для исследованных полиморфных участков в контрольной группе ($p > 0.05$). На рис. 1 представлены частоты аллелей всех исследованных локусов в контрольной группе в сравнении с частотами минорных аллелей (global MAF) из базы данных SNP [25] по данным проекта «1000 геномов», фаза 3. Абсолютные различия наблюдаемых частот аллелей от данных базы SNP составляют до 10%.

Данные о носительстве аллелей и генотипов генов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) у 405 пациентов, перенесших ИМ, и 198 индивидов контроль-

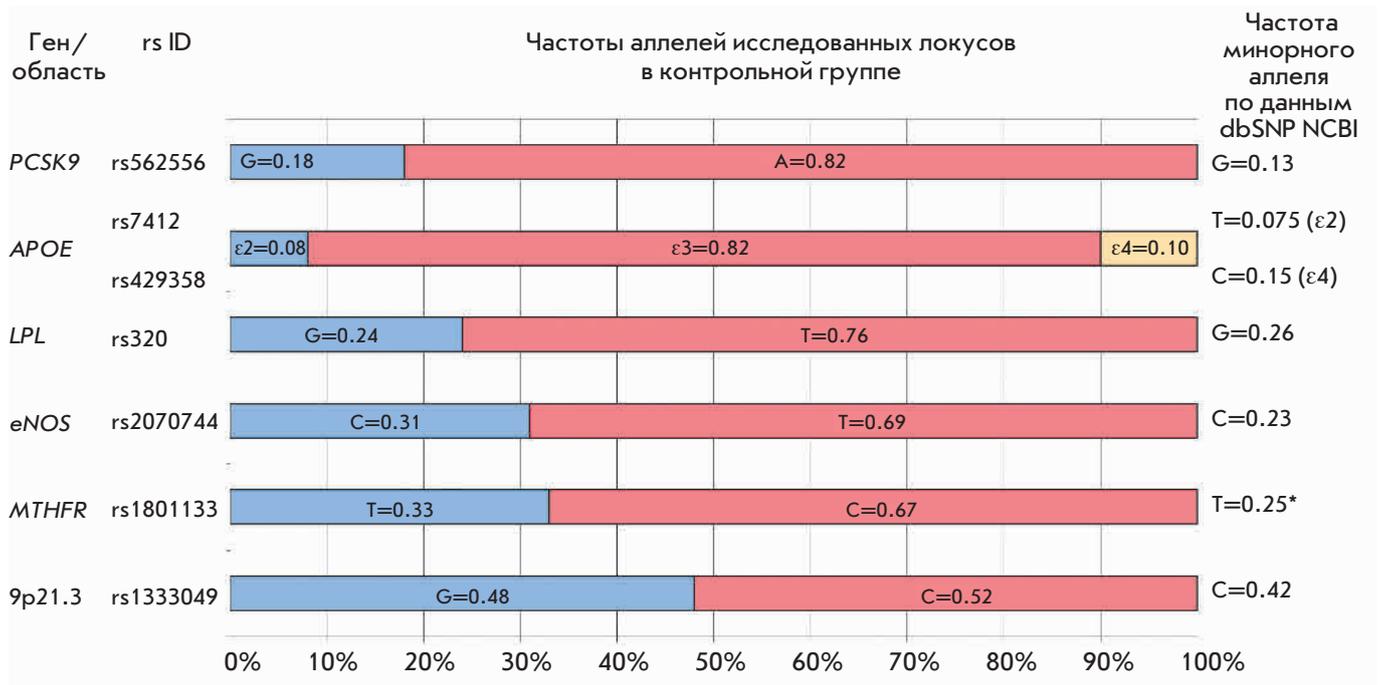


Рис. 1. Частоты аллелей исследованных локусов в контрольной группе (этнические русские) по сравнению с частотами аллелей из базы данных dbSNP NCBI [25].

*В базе данных dbSNP NCBI частота минорного аллеля (MAF) приведена по комплементарной цепи.

ной группы представлены в табл. 2. Наблюдали значимые различия в частотах носительства аллелей и генотипов полиморфных участков всех трех генов липидного обмена: *PCSK9*, *APOE* и *LPL*. Значимые различия выявлены также для гена *eNOS*, но не *MTHFR* и области 9p21. Факторами риска развития ИМ оказались генотипы *PCSK9**A/A ($p = 0.013$, ОШ = 1.45), *APOE**ε3/ε3 ($p = 0.017$, ОШ = 1.52) и *LPL**G/G ($p = 0.032$, ОШ = 1.96), а также носительство аллеля *eNOS**C ($p = 0.0034$, ОШ = 1.63). Следует отметить, однако, что величина p_{corr} , полученная с поправкой Бонферрони на число тестов (множественных сравнений), была значимой только в случае вариантов генов *APOE* и *eNOS*.

С помощью ПО APSampler, использующего динамический метод Монте-Карло, мы провели мультилокусный анализ, направленный на выявление совместного вклада в предрасположенность к ИМ сочетаний аллелей и генотипов исследуемых генов. Обнаружены ассоциированные с риском ИМ би- и триаллельные сочетания, характеризующиеся большим размером эффекта и большим уровнем значимости ассоциации с ИМ, чем компоненты этих сочетаний. В состав сочетаний входят не только варианты генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*, значимо ассоциированные с ИМ поодиночке, но и аллели/генотипы *MTHFR* и rs1333049 в области 9p21. На рис. 2

(A–B) приведены значения ОШ и 95% ДИ для сочетаний, содержащих варианты двух последних локусов: *MTHFR**C, rs1333049*C и rs1333049*C/G. Видно, что во всех случаях перечисленные варианты, представленные в нижней части каждого рисунка, не значимы. Однако сочетание аллеля *MTHFR**C с аллелем *eNOS**C оказывается значимым ($p = 0.0006$; ОШ = 1.80), причем более значимым, чем носительство одного аллеля *eNOS**C (рис. 2А). С риском ИМ ассоциировано также триаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C + rs1333049*C) ($p = 0.018$; ОШ = 2.83) и входящее в его состав биаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C) ($p = 0.021$; ОШ = 2.30), которое ассоциировано слабее, чем это триаллельное сочетание, но более значимо, чем один генотип *LPL**G/G (рис. 2Б). Еще одно триаллельное сочетание (*APOE**ε4 + *eNOS**T + rs1333049*C/G) негативно ассоциировано с риском ИМ ($p = 0.00041$; ОШ = 0.30) (рис. 2В). Слабее с риском ИМ ассоциированы входящие в его состав биаллельные сочетания (*APOE**ε4 + rs1333049*C/G) и (*APOE**ε4 + *eNOS**T). Однако эта ассоциация сильнее, чем у единственного значимого поодиночке компонента сочетания – носительства аллеля *APOE**ε4. Таким образом, с помощью мультилокусного анализа удалось выявить участие в формировании предрасположенности к ИМ в составе нескольких аллельных сочетаний вариантов

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов полиморфных участков исследуемых генов у больных ИМ (405 человек) и в контрольной группе (198 человек)

Носительство аллелей и генотипов	Пациенты, n (%)	Контроль, n (%)	p	p_{corr}^*	ОШ (95% ДИ) для значимых различий**
PCSK9 rs562556					
A	389(96)	193(97)	НЗ	НЗ	
G	102(25)	65(33)	0.013	НЗ	0.69 (0.47–1.00)
A/A	303(75)	133(67)	0.013	НЗ	1.45 (1.00–2.10)
A/G	86(21)	60(30)	0.010	НЗ	0.62 (0.42–0.91)
G/G	16(4)	5(3)	НЗ	НЗ	
APOE rs7412, rs429358 (эпсилон-полиморфизм)					
ε2	63(16)	30(15)	НЗ	НЗ	
ε3	393(98)	194(98)	НЗ	НЗ	
ε4	40(10)	38(19)	0.0013	0.0091	0.46 (0.28–0.75)
ε2/ε2	5(1)	2(1)	НЗ	НЗ	
ε2/ε3	55(14)	26(13)	НЗ	НЗ	
ε2/ε4	3(1)	2(1)	НЗ	НЗ	
ε3/ε3	305(75)	132(67)	0.017	НЗ	1.52 (1.05–2.2)
ε3/ε4	33(8)	36(18)	0.00033	0.0023	0.40 (0.24–0.66)
ε4/ε4	4(1)	0(0)			
LPL rs320					
G	192(47)	85(43)	НЗ	НЗ	
T	363(90)	187(94)	0.032	НЗ	0.51 (0.25–0.99)
G/G	42(10)	11(6)	0.032	НЗ	1.96 (1.00–3.91)
G/T	150(37)	74(37)	НЗ	НЗ	
T/T	213(53)	113(57)	НЗ	НЗ	
MTHFR rs1801133					
C	369(91)	174(87)	НЗ	НЗ	
T	206(51)	106(54)	НЗ	НЗ	
C/C	199(49)	92(46)	НЗ	НЗ	
C/T	170(42)	82(41)	НЗ	НЗ	
T/T	36(9)	24(13)	НЗ	НЗ	
eNOS rs2070744					
C	253(62)	100(50)	0.0034	0.024	1.63 (1.16–2.30)
T	343(85)	174(88)	НЗ	НЗ	
C/C	62(15)	24(12)	НЗ	НЗ	
C/T	191(47)	76(38)	НЗ	НЗ	
T/T	152(38)	98(50)	0.0034	0.024	0.61 (0.43–0.86)
9p21 rs1333049					
C	313(78)	155(78)	НЗ	НЗ	
G	305(75)	146(74)	НЗ	НЗ	
C/C	100(25)	52(26)	НЗ	НЗ	
C/G	213(53)	103(52)	НЗ	НЗ	
G/G	92(22)	43(22)	НЗ	НЗ	

*Приведены значения p с поправкой Бонферрони на число тестов (множественных сравнений).

** $p < 0.05$.

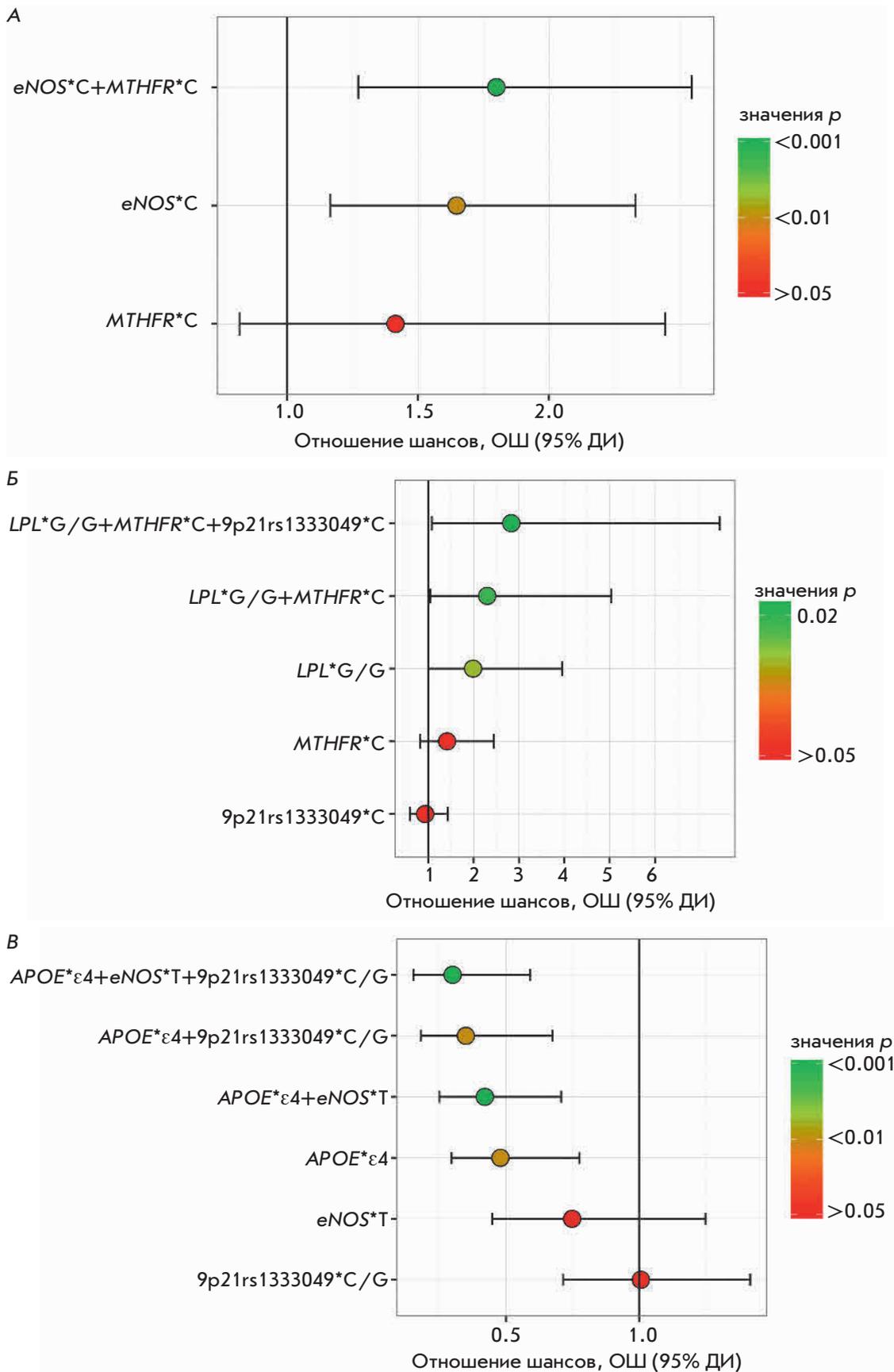


Рис. 2. Мультилокусный анализ, позволивший выявить ассоциацию с ИМ rs1801133 в гене *MTHFR* и rs1333049 в области 9p21, которые поодиночке значимо не ассоциированы с ИМ. Графически представлены значения отношения шансов (ОШ), доверительные интервалы (ДИ) и уровни значимости (качественно, градацией цвета кружка, соответствующего значению ОШ), для ассоциированных с ИМ сочетаний, которые включают варианты гена *MTHFR* и/или rs1333049, а также для компонентов этих сочетаний. А – биаллельное сочетание (*MTHFR**C + *eNOS**C), позитивно ассоциированное с ИМ, и его компоненты. Б – триаллельное сочетание (*LPL**G/G + *MTHFR**C + rs1333049*C), позитивно ассоциированное с ИМ, и его компоненты. В – триаллельное сочетание (*APOE**ε4 + *eNOS**T + rs1333049*C/G), негативно ассоциированное с ИМ, и его компоненты.

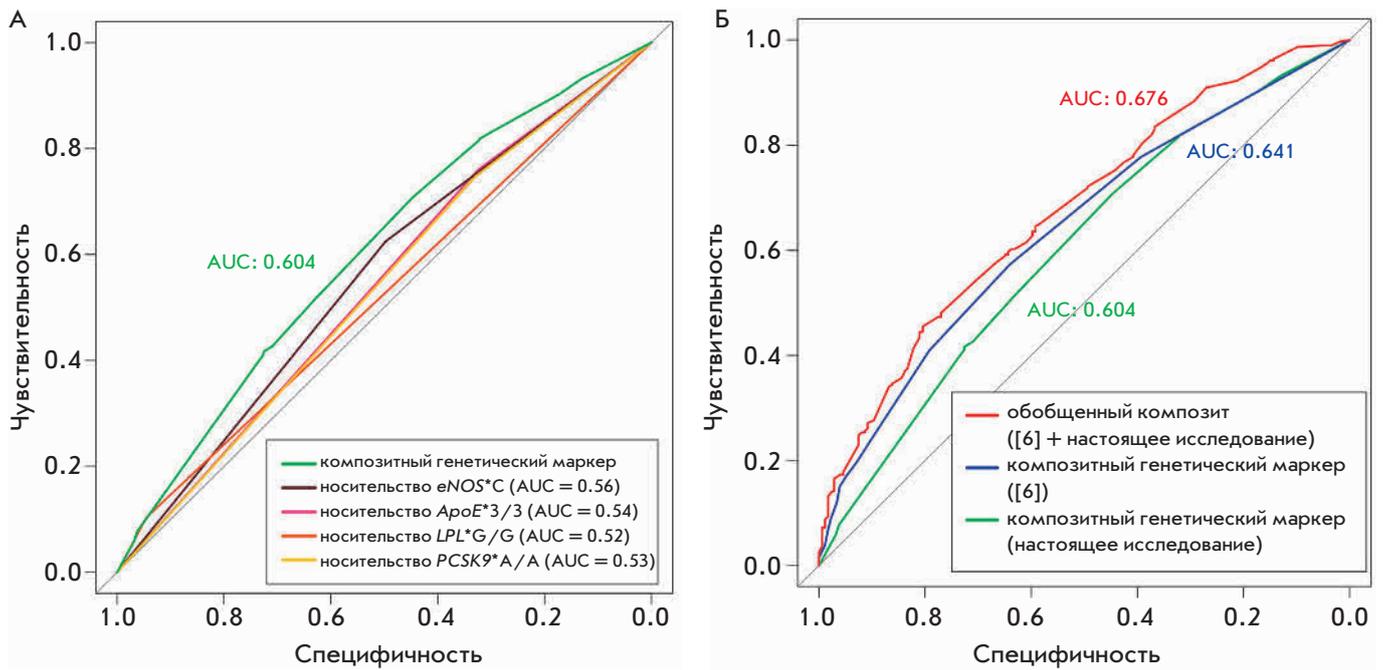


Рис. 3. ROC-анализ эффективности моделей, построенных на основе различных генетических маркеров индивидуального риска возникновения ИМ. А – эффективность классификации индивидов с помощью моделей, построенных на основе носительства отдельных генетических маркеров (вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*), и модели, учитывающей носительство вариантов всех четырех генов (композитный генетический маркер, зеленая линия). Б – прогностическая эффективность обобщенной композитной модели индивидуального генетического риска ИМ (красная линия), полученной при дополнении ранее описанной модели [6] (синяя линия) данными о носительстве вариантов генов *PCSK9*, *LPL*, *eNOS* и *APOE* (зеленая линия). Значения AUC (площади под кривой) для различных моделей представлены на рисунке тем же цветом, что и соответствующая этой модели кривая

гена *MTHFR* (rs1801133) и локуса 9p21 (rs1333049), которые не были значимо ассоциированы с ИМ по одиночке.

Для выяснения вопроса о том, чем объясняется наблюдаемый кумулятивный эффект аллелей разных генов – суммированием малых взаимно независимых вкладов отдельных аллелей или же эпистатическими взаимодействиями между этими аллелями – мы провели анализ трехфакторных взаимодействий с помощью статистического подхода, описанного нами ранее [6]. Полученные при этом значения фактора синергии (SF) с 95% ДИ и величины *p* в точном трехфакторном тесте, аналогичные ОШ с 95% ДИ и величине *p* в тесте Фишера при стандартной оценке ассоциаций между фенотипом и генотипом (т.е. в двухфакторном тесте), оказались незначимыми. Таким образом, мы не выявили значимых эпистатических взаимодействий между компонентами всех найденных сочетаний.

Для оценки прогностической значимости обнаруженных генетических факторов риска с помощью метода логистической регрессии была рассчитана индивидуальная вероятность возникновения ИМ

у каждого индивида в зависимости от носительства вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS*. Оценивали вклад совместного носительства аллелей/генотипов риска этих генов с помощью ROC-анализа (рис. 3А), исходя из эффективности классификации индивидов на больных и здоровых. Видно, что рассматриваемые генетические факторы поодиночке являются плохими классификаторами риска возникновения ИМ (AUC < 0.60). Однако при совместном учете данных о носительстве аллелей/генотипов *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *eNOS* достигается удовлетворительная прогностическая эффективность (AUC = 0.604). Надо отметить, что добавление в модель незначимых по одиночке аллелей гена *MTHFR* и области 9p21, входящих в состав выявленных с помощью APSampler сочетаний, не делает ее более эффективной.

Эти данные использованы для улучшения полученной нами ранее композитной генетической модели риска ИМ, включающей в качестве предикторов варианты генов *TGFB1*, *FGF* и *CRP*, а также эпистатическое сочетание *IFNG* с *PTGS1* [6]. На рис. 3Б показаны три ROC-кривые: ROC-кривая, полученная в исследованной выборке для композитной модели, описанной в [6],

ROC-кривая для совместного носительства найденных новых маркеров, представленная на *рис. 3А*, и ROC-кривая для обобщенной композитной модели, включающей как маркеры из предыдущей, так и из настоящей работы. Видно значимое ($p = 0.014$) повышение прогностической эффективности модели от AUC 0.641 в модели без новых маркеров до 0.676 в обобщенной композитной модели.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный методом «случай-контроль» мультилокусный анализ ассоциации полиморфных вариантов *PCSK9* (rs562556), *APOE* (эпсилон-полиморфизм, rs7412 и rs429358), *LPL* (rs320), *MTHFR* (rs1801133), *eNOS* (rs2070744) и области 9p21 (rs1333049) с риском развития ИМ позволил выявить значимо ассоциированные с ИМ аллели/генотипы *PCSK9*, *APOE*, *LPL* и *NOS*, а также би- и триаллельные сочетания, несущие, помимо вариантов перечисленных генов, еще и аллели/генотипы *MTHFR* и области 9p21.

Каждый из исследованных нами генов системы липидного обмена – *PCSK9*, *LPL* и *APOE* – оказался ассоциированным с риском ИМ; ОШ для генотипов риска лежит в пределах от 1.45 до 1.96, однако уровень значимости невелик (от 0.013 до 0.032). Вовлечение генов системы липидного обмена в развитие ИМ хорошо согласуется с общеизвестным фактом, что нарушения обмена липидов и повышение уровня холестерина и индекса атерогенности приводят к атеросклеротическим поражениям интимы артерий. Однако опубликованные данные об участии изученных нами вариантов генов системы липидного обмена в формировании ССЗ противоречивы.

rs562556 в гене *PCSK9* определяет замену Ile на Val в положении 474 кодируемого белка, что, по всей видимости, не влияет на уровень его продукции [26]. Мы наблюдали ассоциацию генотипа А/А этого SNP с ИМ у русских. Однако у японцев не наблюдали различий в распределении вариантов rs562556 у больных с ИМ и в контрольной группе, хотя этот SNP был ассоциирован с уровнем холестерина [27]. Выявлена связь между полиморфизмом rs562556, присутствием антифосфолипидных антител и развитием у носителей этих антител тромбоза – фактора риска ИМ [28]. Ассоциация с ИМ других вариантов гена *PCSK9*, а именно rs11206510 [29] и rs11591147 [30], показана в различных популяциях. Таким образом, полученные нами данные об ассоциации гена *PCSK9* с возникновением ИМ находятся в соответствии с опубликованными данными.

Отдельные аллельные варианты включенного в наше исследование эпсилон-полиморфизма гена *APOE* практически во всех популяциях ассоциированы с ССЗ и, в частности, с ИМ. Согласно проведен-

ным метаанализам, с риском развития ИМ ассоциирован аллель ε4, а ε2 является протективным [31, 32]. Однако выводы, полученные при метаанализе, включающем различные этносы, нельзя автоматически распространять на отдельные популяции, в которых наблюдается большой разброс в оценке роли отдельных аллелей в предрасположенности к ИМ. Вероятно, основной причиной плохой сходимости результатов отдельных исследований является существенная разница в частотах аллелей в различных популяциях и даже в одной и той же популяции, проживающей на разных территориях [33]. В частности, в нашем исследовании, выполненном для русских из Центральной России, генотипом риска оказался ε3/ε3, а в выборке мужчин из сибирской популяции – генотип ε2/ε3 [34].

rs320, известный также как HindIII-полиморфизм, определяет замену Т на G в интроне 8 гена *LPL*. Предполагают, что он находится в регуляторной области и влияет на экспрессию *LPL* [35]. Мы наблюдали ассоциацию rs320 с ИМ в нашей выборке. Связь этого полиморфизма с развитием ИМ показана и в ряде других исследований [36, 37], в том числе и у русских [38]. Описаны и другие полиморфизмы этого гена, ассоциированные с ИМ в японской популяции [39]. Однако данные об ассоциации отдельных аллелей с ИМ не всегда совпадают.

Еще один локус, вариант которого значимо ассоциирован с ИМ в нашей работе – это rs2070744 гена *eNOS*. Этот полиморфный участок находится в промоторной области гена. Аллель С, ассоциированный с риском ИМ в нашем исследовании, связан с уменьшением экспрессии мРНК и соответственно уровня белка *eNOS* [40]. Наши данные совпадают с результатами других исследований [41].

Замена С на Т в rs1801133 гена *MTHFR* приводит к замещению Ala в положении 222 белка на Val [42] и к почти к 50% снижению ферментативной активности метилентетрагидрофолатредуктазы [43]. В большинстве исследований не наблюдали ассоциации rs1801133 с риском развития ИМ в различных этносах, включая европеоидов [44] и русских [45]. Мы также не выявили ассоциации rs1801133 с риском развития ИМ у русских, однако носительство аллеля С оказалось значимо ассоциированным с риском ИМ в сочетании с носительством аллеля С гена *eNOS* (см. *рис. 2А*) или с носительством генотипа G/G гена *LPL* (см. *рис. 2Б*). Мы полагаем, что эти данные могут быть интерпретированы как аргумент в пользу вовлечения гена *MTHFR* в формирование предрасположенности к ИМ.

Область 9p21 – единственная область генома, вовлеченность которой в формирование ИМ воспроизведена в нескольких GWASs с полногеномным

уровнем значимости ($p < 5 \times 10^{-8}$) [2]. Эти данные подтверждены в ряде валидационных исследований, в том числе для rs10757278 и rs1333049 на выборке больных ИМ и контрольных групп из сибирской популяции (без указания этнической принадлежности) [46]. Мы не наблюдали значимой ассоциации rs1333049 с ИМ у русских, однако мультилокусный анализ позволил выявить ряд сочетаний, содержащих этот SNP. Носительство аллеля rs1333049*С в составе триаллельного сочетания ассоциировано с риском ИМ (см. рис. 2Б), а генотип rs1333049*С/С в составе би- и триаллельного сочетаний оказался протективным (см. рис. 2В), в хорошем соответствии с результатами работы [46].

Проведенный статистический анализ трехфакторных взаимодействий свидетельствует об отсутствии эпистатических взаимодействий между компонентами всех найденных сочетаний. В то же время все биаллельные сочетания, ассоциированные с риском ИМ ($ОШ > 1$), имеют по сравнению с входящими в них отдельными аллелями/генотипами бóльший уровень значимости и бóльшие значения $ОШ$ (соответственно для протективных сочетаний с $ОШ < 1$ – меньшие значения $ОШ$). Аналогичная закономерность проявляется для триаллельных сочетаний при сравнении с биаллельными. Мы приходим к заключению, что наблюдаемые в настоящей работе кумулятивные эффекты возникают в результате аддитивности вкладов отдельных генов. Аддитивность эффекта при этом обусловлена тем, что в сравнительно небольшой выборке статистическая значимость наблюдения ассоциации заболевания с сочетанием слабых генетических факторов, действующих в одном направлении, выше, чем при наблюдении каждого из этих факторов. Следовательно, есть все основания предположить, что локусы *MTHFR* (rs1801133) и 9p21 (rs1333049) являются самостоятельными факторами риска ИМ с малыми эффектами, для выявления значимых ассоциаций с которыми в исследуемой нами выборке оказалось недостаточно статистической мощности, а использование мультилокусного анализа позволило восполнить этот недостаток.

Аналогичным образом, вследствие малых эффектов локусов *MTHFR* (rs1801133) и 9p21 (rs1333049), их добавление в композитную генетическую модель риска ИМ не повышало ее прогностической эффективности. Здесь следует отметить преимущество эпистатических сочетаний перед сочетаниями аддитивными в качестве классификаторов риска. Действительно, в работе [6] одним из предикторов риска ИМ оказалось эпистатическое сочетание

IFNG с *PTGS1*, оба компонента которого поодиночке не были ассоциированы с заболеванием. В то же время выявление генетических вариантов, входящих в состав аддитивных сочетаний, открывает возможность обнаружить их ассоциацию с заболеванием поодиночке на выборках большего объема.

Прогностическая эффективность композитной генетической модели риска ИМ, построенной на основании результатов настоящего исследования, хотя и значима, но невелика. Это справедливо и для модели, полученной нами ранее [6]. При объединении двух моделей удалось достичь величины AUC 0.676, что при пороге вероятности (cut-off) 0.74 соответствует чувствительности 0.80 и специфичности 0.45. В целом, на сегодняшний день ни результаты GWAS, ни данные, полученные с использованием подхода «ген-кандидат», не позволяют эффективно использовать данные генетического анализа для предсказания возникновения ИМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенный анализ ассоциации полиморфных участков шести генов-кандидатов показал их значимую ассоциацию с ИМ или поодиночке, или в составе сочетаний. В целом, мы реплицировали на независимых выборках русских из Центральной России ассоциацию с ИМ полиморфных вариантов генов *PCSK9*, *APOE*, *LPL*, *MTHFR*, *eNOS* и области 9p21. Поскольку варианты одних и тех же генов (rs1801133 гена *MTHFR* или rs1333049 области 9p21), не значимые поодиночке, входили в состав нескольких различных сочетаний, между компонентами которых не выявлено эпистатических взаимодействий, можно заключить, что обнаруженный с помощью мультилокусного анализа кумулятивный эффект генов в составе сочетания возникает в результате суммирования их малых независимых вкладов.

Включение найденных маркеров в ранее опубликованную нами модель индивидуального генетического риска ИМ [6] значительно повышает ее предсказательную эффективность, хотя полученные нами результаты, безусловно, нуждаются в воспроизведении на независимой выборке русских. Для дальнейшего повышения предсказательной способности композитной модели необходимо улучшать ее путем включения других генетических предикторов риска и уточнения значений коэффициентов уравнения регрессии на расширенных выборках. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10251).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dai X., Wiernek S., Evans J.P., Runge M.S. // *World J. Cardiol.* 2016. V. 8. № 1. P. 1–23.
2. <http://www.ebi.ac.uk/gwas>
3. Dehghan A., Bis J.C., White C.C., Smith A.V., Morrison A.C., Cupples L.A., Trompet S., Chasman D.I., Lumley T., Völker U., et al. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 3. e0144997.
4. <http://www.thl.fi/monica/>
5. <http://www.ucl.ac.uk/easteurope/hapiee.html>
6. Barsova R.M., Lvovs D., Titov B.V., Matveeva N.A., Shakhnovich R.M., Sukhinina T.S., Kukava N.G., Ruda M.Y., Karamova I.M., Nasibullin T.R., et al. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 12. e0144190.
7. Catapano A.L., Papadopoulos N. // *Atherosclerosis*. 2013. V. 228. № 1. P. 18–28.
8. Mahley R.W. // *J. Mol. Med. (Berlin)*. 2016. V. 94. № 7. P. 9–46.
9. Li Y., He P.P., Zhang D.W., Zheng X.L., Cayabyab F.S., Yin W.D., Tang C.K. // *Atherosclerosis*. 2014. V. 237. № 2. P. 597–608.
10. Ueland P.M., Refsum H. // *J. Lab. Clin. Med.* 1989. V. 114. № 5. P. 473–501.
11. Liu D., Jiang Z., Dai L., Zhang X., Yan C., Han Y. // *Gene*. 2014. V. 545. № 1. P. 175–183.
12. Holdt L.M., Teupser D. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012. V. 32. № 2. P. 196–206.
13. Lvovs D., Фаворова О.О., Фаворов А.В. // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 3. С. 62–75.
14. Third Universal definition of myocardial infarction // *Eur. Heart J.* 2012. V. 33. P. 2551–2567.
15. Hixson J.E., Vernier D.T. // *J. Lipid. Res.* 1990. V. 31. P. 545–548.
16. Shimo-Nakanishi Y., Urabe T., Hattori N., Watanabe Y., Nagao T., Yokochi M., Hamamoto M., Mizuno Y. // *Stroke*. 2001. V. 32. P. 1481–1486.
17. Genest J., Rozen R. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997. V. 17. № 3. P. 569–573.
18. Augeri A.L., Tsongalis G.J., van Heest J.L., Maresh C.M., Thompson P.D., Pescatello L.S. // *Atherosclerosis*. 2009. V. 204. № 2. e28–34.
19. <http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>
20. <https://sourceforge.net/projects/apsampler/>
21. White D.R., Pesner R., Reitz K.P. // *Behavior Sci. Res.* 1983. V. 18. P. 103–122.
22. Cortina-Borja M., Smith A.D., Combarros O., Lehmann D.J. // *BMC Res. Notes*. 2009. V. 2. P. 105–111.
23. DeLong E.R., DeLong D.M., Clarke-Pearson D.L. // *Biometrics*. 1988. V. 44. P. 837–845.
24. Youden W.J. // *Cancer*. 1950. V. 3. № 1. P. 32–35.
25. www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
26. Астракова (Бенимецкая) К.С., Шахтшнейдер Е.В., Иванов-щук Д.Е., Орлов П.С., Рагино Ю.И., Воевода М.И. // *Атеросклероз*. 2016. Т. 12. № 2. С. 18–24.
27. Shioji K., Mannami T., Kokubo Y., Inamoto N., Takagi S., Goto Y., Nonogi H., Iwai N. // *J. Hum. Genet.* 2004. V. 49. № 2. P. 109–114.
28. Ochoa E., Iriondo M., Manzano C., Fullaondo A., Villar I., Ruiz-Irastorza G., Zubiaga A.M., Estonba A. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 1. e0146990.
29. Myocardial Infarction Genetics Consortium, Kathiresan S., Voight B.F., Purcell S., Musunuru K., Ardissino D., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 3. P. 334–341.
30. Kathiresan S., Myocardial Infarction Genetics Consortium // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 21. P. 2299–2300.
31. Wang Y.L., Sun L.M., Zhang L., Xu H.T., Dong Z., Wang L.Q., Wang M.L. // *FEBS Open Bio*. 2015. V. 5. P. 852–858.
32. Xu H., Li H., Liu J., Zhu D., Wang Z., Chen A., Zhao Q. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. e104608.
33. Боринская С.А., Кальина Н.Р., Санина Е.Д., Кожекбаева Ж.М., Гупало Е.Ю., Гармаш И.В., Огурцов П.П., Паршукова О.Н., Бойко С.Г., Веселовский Е.М. и др. // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 10. С. 1434–1440.
34. Воевода М.И., Шахтшнейдер Е.В., Максимов В. Н., Куликов И.В., Ромащенко А.Г. // *Атеросклероз*. 2008. Т. 4. № 1. С. 11–26.
35. Chen Q., Razzaghi H., Demirci F.Y., Kamboh M.I. // *Atherosclerosis*. 2008. V. 200. № 1. P. 102–108.
36. Tanguturi P.R., Pullareddy B., Rama Krishna B.S., Murthy D.K. // *Indian Heart J.* 2013. V. 65. № 6. P. 653–657.
37. Gigeck Cde O., Chen E.S., Cendoroglo M.S., Ramos L.R., Araujo L.M., Payão S.L., Smith Mde A. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007. V. 45. № 5. P. 599–604.
38. Мальгина Н.А., Мелентьев А.С., Костомарова И.В., Мелентьев И.А., Сайгитов Р.Т., Смирнова Ю.Б., Серова Л.Д. // *Молекуляр. биология*. 2001. Т. 35. № 5. С. 787–791.
39. Matsuoaka R., Abe S., Tokoro F., Arai M., Noda T., Watanabe S., Horibe H., Fujimaki T., Oguri M., Kato K., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2015. V. 35. № 5. P. 1451–1459.
40. Doshi A.A., Ziolo M.T., Wang H., Burke E., Lesinski A., Binkley P. // *J. Card. Fail.* 2010. V. 16. № 4. P. 314–319.
41. Kong X.Z., Zhang Z.Y., Wei L.H., Li R., Yu J. // *Med. Sci. Monit.* 2017. V. 11. № 23. P. 759–766.
42. Dayakar S., Goud K.I., Reddy T.P., Rao S.P., Sesikeran S.B., Sadhnani M. // *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2011. V. 15. № 11. P. 765–769.
43. Xuan C., Bai X.Y., Gao G., Yang Q., He G.W. // *Arch. Med. Res.* 2011. V. 42. № 8. P. 677–685.
44. Alizadeh S., Djafarian K., Moradi S., Shab-Bidar S. // *Int. J. Cardiol.* 2016. V. 217. P. 99–108.
45. Назаренко Г.И., Скворцова В.И., Клейменова Е.Б., Константинова М.В. // *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2009. Т. 109. № 10. Прилож. 2. С. 19–25.
46. Максимов В.Н., Куликов И.В., Орлов П.С., Гафаров В.В., Малютина С.К., Ромащенко А.Г., Воевода М.И. // *Вест. РАМН*. 2012. Т. 67. № 5. С. 24–29.

УДК 577.112.083:571.27

Рекомбинантные антитела к гликопротеину вируса Эбола

А. А. Панина^{1*}, И. Г. Дементьева², Т. К. Алиев³, В. А. Топорова¹, Д. С. Балабашин^{1,4}, М. Н. Боков², Л. П. Позднякова², О. Б. Шемчукова², Д. А. Долгих^{1,4}, П. Г. Свешников², М. П. Кирпичников^{1,4}

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

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский бульвар, 8

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

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: paniann07@yandex.ru, panina@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 27.04.2017

Принята к печати 24.10.2017

РЕФЕРАТ В настоящее время не существует лицензированных препаратов для адресной профилактики и лечения геморрагической лихорадки Эбола. В представленной работе создана эукариотическая система экспрессии для получения трех полноразмерных химерных антител IgG1-каппа изотипа GPE118, GPE325 и GPE534 к рекомбинантному гликопротеину вируса Эбола (GP EBOV), ключевому фактору патогенности этого вируса. Иммунохимические свойства химерных антител изучены методами иммуноблоттинга, непрямого, прямого и конкурентного иммуноферментного анализа с использованием рекомбинантных белков rGPdTM, NP и VP40 вируса Эбола. Доказана подлинность полученных антител и отсутствие перекрестной специфичности по отношению к структурным белкам NP и VP40 вируса Эбола. Эпитопная специфичность рекомбинантных антител исследована с использованием коммерческих нейтрализующих антител к вирусному гликопротеину. Показано, что рекомбинантные антитела GPE118, GPE325 и GPE534 узнают эпитопы гликопротеина, совпадающие или перекрывающиеся с эпитопами трех хорошо изученных нейтрализующих антител против вируса Эбола.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус геморрагической лихорадки Эбола, терапевтические рекомбинантные химерные антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ mAT – моноклональные антитела; EBOV – вирус геморрагической лихорадки Эбола; EBOV GP – гликопротеин вируса геморрагической лихорадки Эбола; rGPdTM – рекомбинантный гликопротеин вируса геморрагической лихорадки Эбола без трансмембранного домена; NP – нуклеопротеин вируса Эбола; VP40 – структурный белок вируса Эбола; SOE-PCR – ПЦР с перекрывающимися областями; IEDB – Международная база данных эпитопов; PBS – фосфатно-солевой буфер.

ВВЕДЕНИЕ

Во время последней эпидемии геморрагической лихорадки Эбола количество зараженных превысило 28 тысяч и зафиксировано более 11 тысяч летальных исходов. Несмотря на прекращение эпидемии, Всемирная организация здравоохранения не исключает возможности новой вспышки заболевания. В связи с этим необходимо активизировать разработку эффективных средств профилактики и терапии заболевания.

За последние 10 лет предложено несколько подходов к терапии лихорадки Эбола. Так, внутривен-

ное введение ингибиторов коагуляции крови, таких, как рекомбинантный активированный белок С человека, повышает выживаемость больных на 18% [1]. Внутривенное введение малых интерферирующих РНК приводит к повышению выживаемости от 66 до 100% в зависимости от количества инъекций [2]. Однако необходимо подчеркнуть, что лечение необходимо начинать в течение первых 30–60 мин от момента заражения.

Разработка терапевтических антител против вируса лихорадки Эбола проводится начиная с 1990-х годов. Из восьми белков вируса ключевой мишенью

для иммунотерапии считается главный фактор патогенности – гликопротеин GP. Нестабильные результаты получены при использовании отдельных моноклональных антител (мАТ) или антител из крови больных, перенесших лихорадку Эбола [3]. Вместе с тем, в опытах на приматах показано, что, в отличие от неспецифических средств антивирусной терапии, пассивная иммунизация антителами, введенными через 24 ч после инфицирования, позволяет добиться терапевтического эффекта [4]. С целью создания средств монотерапии продолжают попытки поиска источников нейтрализующих антител в крови пациентов, перенесших заболевание [5]. Однако в процессе получения и исследования мАТ против GP было установлено, что наиболее значительный защитный эффект и существенное снижение летальности на модельных животных обеспечивал «коктейль» антител ZMapp – комбинация антител, специфичных к различным эпитопам GP [6]. На морских свинках и макаках резус были испытаны различные комбинации трех химерных антител, специфичных к GP. Животных (18 обезьян) инфицировали летальными дозами вируса и на 3-и, 4-е и 5-е сут после этого вводили препарат ZMapp в дозе 50 мг/кг веса. Оказалось, что ZMapp обеспечил выживаемость всех 18 обезьян, в том числе и животных с выраженными признаками заболевания. Антитела, составляющие комбинацию ZMapp, были экспрессированы в листьях табака и применены в период эпидемии 2014 г. в Западной Африке [7]. В сравнении с группой пациентов, получавшей только паллиативную терапию, уровень смертности в группе, получавшей также исследуемый препарат, был снижен с 37% (13 из 35) до 22% (8 из 36). Применение препарата на большем количестве пациентов было ограничено возможностью привлечения носителей вируса, так как проводилось на финальной стадии эпидемии, когда регистрировалось уже незначительное число новых инфицированных пациентов.

Ранее нами были получены мышинные мАТ к рекомбинантному гликопротеину вируса геморрагической лихорадки Эбола штамма Заир без трансмембранного домена (rGPdTM), отобраны три мАТ GPE118, GPE325 и GPE534, различающиеся по эпитопной специфичности. Определены нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных доменов. Установлены каркасные и гипервариабельные участки тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов [8, 9].

Цель настоящей работы состояла в создании на основе мышинных мАТ полноразмерных рекомбинантных химерных антител к EBOV GP, а также в изучении их иммунохимических свойств: установлении подлинности, специфичности и иммунореактивности

полноразмерных химерных антител, определении констант диссоциации и эпитопной специфичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рекомбинантный белок EBOV rGPdTM (IBT Bioservices, США); рекомбинантные белки NP и VP40 (Fitzgerald Industries International, США); мАТ 4G7 против каппа-цепи Ig человека и мАТ 2C11 против гамма-1-цепи IgG человека (Hytest, Турку, Финляндия); мАТ против EBOV GP h13F6, c13C6FR1, c6D8, KZ52 и 4F3 (IBT Bioservices, США); конъюгат ЭкстрАвидин-пероксидаза (E2886, Sigma-Aldrich, США); ТМБ-субстрат (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, «БиотестСистемы», Россия); биотинил-N-гидроксисукцинимид (H1759, Sigma-Aldrich); нитроцеллюлозную мембрану (Membrane filters, cellulose nitrate, pore size 0.45 μ m, S045A330R, Advantec MFS, Inc., США); мембрану Vivaflow 200 (Sartorius Stedim Biotech, Германия); 96-луночные планшеты с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды); Tween-20.

Конструирование системы экспрессии химерных мАТ в клетках млекопитающих

Конструирование химерных последовательностей легких (L) или тяжелых цепей (H) мАТ проводили последовательным присоединением к ДНК, кодирующей переменный домен антитела, константного домена легкой цепи человека каппа-подкласса для L-цепи либо константные домены C_H1-C_H3 тяжелой цепи человека IgG1-подкласса для H-цепи. Также к перечисленным последовательностям присоединяли фрагменты ДНК, кодирующие 5'-нетранслируемую область и содержащие последовательность Козак, последовательности «родных» лидерных пептидов, обеспечивающих секрецию иммуноглобулинов в культуральную среду, 3'-нетранслируемый фрагмент ДНК, содержащий сайт полиаденилирования.

На матрице плазмид, полученных ранее [8] и кодирующих переменные домены тяжелой цепи антител GPE118, GPE534 и GPE325, с помощью ПЦР синтезировали фрагменты ДНК, содержащие последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи, параллельно на 3'-конец вводили сайты узнавания рестриктаз SacI и AраI. В случае легких цепей мАТ фрагменты, составляющие единицу транскрипции, объединяли посредством ПЦР с перекрыванием амплифицируемых фрагментов (SOE-PCR), как и присоединение 5'-нетранслируемой области и лидерного пептида тяжелых цепей. Константные домены C_H1-C_H3 тяжелой цепи человека IgG1-подкласса и 3'-нетранслируемой области, содержащей сайт полиаденилирования, лигировали

по Ара I-сайту, присутствующему на 5'-конце человеческого $C_{\alpha}1$ -домена и введенному на 3'-конец варибельного домена методом ПЦР. Бипромоторный (hEF1-НТЛV-промотор для тяжелой цепи и CMV-промотор для легкой цепи антитела) вектор экспрессии конструировали согласно [10].

Получение клеточных линий-продуцентов рекомбинантных антител

Полноразмерные рекомбинантные антитела получали в клетках CHO линии DG44. Клетки культивировали в среде CD DG44 (Invitrogen) с добавлением 8 мМ L-глутамина и 0.18% Pluronic F-68 (Invitrogen). В колбы Эрленмейера общим объемом 125 мл помещали 30 мл клеточной суспензии в концентрации 3×10^5 клеток/мл и культивировали при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с частотой 130 об/мин в CO_2 -инкубаторе Sanyo MCO-18AIC (Sanyo, Япония) при температуре 37°C, 8% CO_2 и максимальной влажности. Трансфекцию проводили через 1 сут после начала культивирования с использованием реагента Freestyle MAX (Invitrogen). Для трансфекции использовали 15 мкл Freestyle MAX и 18 мкг плазмиды, содержащей легкую и тяжелую цепи антител под контролем промоторов CMV и EF1-альфа соответственно и общий селективный маркер DHFR. Через 48 ч после трансфекции проводили селекцию культуры клеток. Для этого культуру клеток высевали в среду CD OptiCHO (Invitrogen), не содержащую нуклеотиды. Клетки высевали во флаконы Эрленмейера объемом 125 мл в 30 мл среды OptiCHO с добавлением 8 мМ L-глутамина и культивировали в условиях, описанных выше. Первый этап селекции на данной среде считали завершенным, когда жизнеспособность культуры становилась равной 95% или выше, а скорость удвоения популяции клеток – 1 сут. На следующем этапе селекции линий в ту же среду культивирования добавляли 10 нМ метотрексата (MTX). После прохождения культурой клеток данного этапа селекции начинали наработку экспериментальных образцов рекомбинантных антител.

После проведения селекции с использованием MTX для увеличения специфической продукции рекомбинантных антител и стабилизации продуцентов линии-продуценты подвергали клонированию на клеточном сортере ClonePIX FL (Genetix, Великобритания). Клеточную суспензию высевали в полную полутвердую среду CloneMedia-CHO (Genetix, Великобритания), дополненную 8 мМ L-глутамина и 10 мг/мл вторичных антител к IgG человека, меченных FITC (Genetix, Великобритания). Клоны отбирали согласно рекомендациям производителей клеточного сортировщика и культивиро-

вали на среде XP Media (Genetix, Великобритания) с добавлением 8 мМ L-глутамина. Клетки, после увеличения их количества в каждом клоне, переводили на среду CD OptiCHO (Invitrogen, США) для дальнейшего роста, криоконсервирования и проверки экспрессионных и ростовых свойств.

Наработка рекомбинантных антител

Культуры высевали в колбы Эрленмейера объемом 125 мл в 30 мл среды OptiCHO с добавлением L-глутамина до 8 мМ. Культивирование начинали с концентрации 3×10^5 клеток/мл при условиях, описанных выше. Культивирование прекращали при снижении жизнеспособности культуры клеток до 50%. Кондиционированную среду (0.5 л) с подтвержденным содержанием антител, полученную после культивирования клеточной линии CHO, центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин, после чего фильтровали через фильтр с диаметром пор 0.45 мкм. Кондиционированную среду концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации на установке Vivaflow (Sartorius, Германия) с уровнем отсечения молекулярной массы 50 кДа. Антитела выделяли из концентрированного супернатанта с помощью аффинной хроматографии на колонках с белок А-агарозой (GE Healthcare, США) согласно рекомендациям производителя.

Содержание рекомбинантных антител в элюатах после аффинной хроматографии оценивали с помощью метода непрямого ИФА.

Иммуноблоттинг рекомбинантных антител с мАТ 4G7 и 2C11

Электрофоретическое разделение рекомбинантных антител (6 мкг на дорожку) проводили в 12% ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Затем осуществляли электрофоретический перенос (электроблоттинг) белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм (Advantec MFS, Inc., США). Мембрану блокировали раствором 5% казеина в PBS в течение ночи при 4°C и трижды промывали PBS-T (10 мМ K_2HPO_4 , pH 7.5, 0.145 М NaCl, 0.05% Tween-20). Затем мембрану разрезали на полоски и инкубировали в растворе антител (мАТ 4G7 или мАТ 2C11, 10 мкг/мл, PBS) в течение 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки в буфере PBS-T проводили инкубацию с конъюгатом пероксидазы хрена и антител козы против IgG мыши в разведении 1 : 15000 в течение 1 ч при 37°C. После повторной трехкратной промывки в PBS-T добавляли субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол, H_2O_2) и инкубировали в течение 4–10 мин. Реакцию останавливали, промывая полоски водой.

Иммуноблоттинг рекомбинантного EBOV rGPdTM с рекомбинантными антителами

После электрофоретического разделения EBOV rGPdTM (12 мкг) в 12% ПААГ в восстанавливающих условиях, электроблоттинга белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану и блокировки по методике, описанной выше, перенесенные белки выявляли на нитроцеллюлозной мембране с помощью непрямого ИФА (иммуноблоттинг). Для этого мембрану разрезали на полоски, помещали в раствор рекомбинантных антител GPE118, GPE325, GPE534 с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После инкубации полоски выдерживали с конъюгатом МАТ 4G7-пероксидаза хрена в течение 1 ч при 37°C в разведении 1 : 25000. Последнюю отмывку и проявление реакции проводили как описано выше.

Непрямой ИФА с иммобилизованными рекомбинантными белками вируса Эбола rGPdTM, NP и VP40

В лунки 96-луночного планшета с высокой связывающей способностью сорбировали антиген (1 мкг/мл, PBS) при 4°C в течение ночи. Планшеты 5 раз промывали PBS с 0.05% Tween-20. Затем вносили раствор исследуемых рекомбинантных антител (PBS, 2% BSA) серией трехкратных разведений, начиная с концентрации 3 мкг/мл, инкубировали 1 ч при 37°C, промывали 5 раз PBS, 0.05% Tween-20. Инкубировали с конъюгатом МАТ 4G7-пероксидаза хрена против каппа-цепи Ig человека в рабочем разведении 1 : 50000 (PBS, 2% BSA) в течение 1 ч при 37°C. Для проявления реакции лунки промывали 5 раз PBS, 0.05% Tween-20, вносили по 100 мкл ТМВ-субстрата, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Реакцию останавливали 0.5 М H₂SO₄, и измеряли поглощение при длине волны 450 нм.

Определение K_d комплекса рекомбинантных антител и EBOV GP

На первом этапе рекомбинантные антитела в постоянной концентрации 7 пМ (1 нг/мл) инкубировали с антигеном EBOV GP в диапазоне концентраций 0.1–10 нМ (10–1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием для достижения термодинамического равновесия в трехкомпонентной системе: свободный антиген, свободное антитело и комплекс антиген-антитело. На втором этапе концентрацию свободных рекомбинантных антител измеряли методом твердофазного ИФА с иммобилизованным на планшет EBOV GP. На заключительном этапе рассчитывали K_d по уравнению Клотца с использованием значений общей

концентрации антигена и концентрации свободных рекомбинантных антител [11].

Конкурентный ИФА для эпитопного картирования рекомбинантных химерных антител

Исходные МАТ мыши, контрольные коммерческие МАТ и изучаемые полноразмерные химерные антитела в концентрации 5 мкг/мл сорбировали при 4°C в течение ночи в PBS, pH 7.2 в лунки 96-луночных планшетов с высокой связывающей способностью (по 100 мкл в лунку). Планшет промывали 5 раз PBS-T (200 мкл в лунку). Контрольные МАТ KZ52, h13F6, c13C6FR1, c6D8, 4F3 титровали, начиная с концентрации 6 мкг/мл, трехкратными серийными разведениями в PBS-T (0.01 М KH₂PO₄, 0.1 М NaCl, 0.2% BSA, 0.1% Tween-20), 50 мкл в лунку. Рекомбинантный вирусный белок биотинилировали с использованием пятикратного избытка NHS-эфира биотина ((+)-Biotin N-hydroxysuccinimide ester, H1759 Sigma). Биотинилированный EBOV rGPdTM в концентрации 800 нг/мл в PBS-T вносили по 50 мкл в лунку. Инкубировали в течение 1 ч при 37°C с перемешиванием. Планшет промывали 5 раз PBS-T (по 200 мкл в лунку). Конъюгат ЭкстрАвидин-пероксидаза в концентрации 500 нг/мл вносили в каждую лунку в объеме 100 мкл и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшет промывали 5 раз PBS-T по 200 мкл в лунку. В каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМВ-субстрата, инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на шейкере. Реакцию останавливали, добавляя 0.5 М H₂SO₄ по 100 мкл в лунку. Поглощение измеряли при длине волны 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные антитела получали, используя линию клеток яичника китайского хомячка CHO DG44 с дефицитом гена дигидрофолатредуктазы, растущую в виде суспензии. С этой целью предварительно конструировали систему экспрессии и получали клеточные линии-продуценты рекомбинантных антител. В качестве системы экспрессии в эукариотических клеточных линиях использовали бипромоторную систему [10] на основе коммерческого вектора рOptiVEC-ТОРО, содержащего цитомегаловирусный промотор (CMV) и гибридный промотор hEF1-HTLV для трансляции клонированных генов, а также ген устойчивости к генетицину. Вектор также содержит ген дигидрофолатредуктазы (ДФР), уровень экспрессии которой регулируется CMV-промотором через независимый сайт связывания рибосом IRES. ДФР при условии коэкспрессии целевого гена антител может быть использована в качестве селективного маркера в процессе создания стабиль-

ной клеточной линии. Экспрессия ДГФР позволяет нейтрализовать эффект присутствия потенциально вредного для клеток метотрексата (МТХ) и поддерживать тем самым клеточную пролиферацию. При этом при повышении концентрации МТХ происходит амплификация гена ДГФР, в свою очередь, способствующая увеличению числа копий генов антител. При селективном давлении метотрексатом геномная амплификация генов тяжелой и легкой цепей происходит синхронно. Для каждого из антител были получены соответствующие бипромоторные конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие легкую цепь каппа-изотипа и тяжелую цепь IgG1-изотипа.

Полученные клеточные линии СНО использовали для наработки рекомбинантных антител в режиме суспензионного культивирования в бессывороточной среде. Качество экспериментальных образцов рекомбинантных антител анти-Эбола контролировали электрофоретическим и хроматографическим методами.

Подлинность полученных антител подтверждали в формате иммуноблотинга моноклональные антитела, специфичные к характерным участкам тяжелой и легкой цепей, – мышинные МАТ 4G7 против капсацепи Ig человека и МАТ 2C11 против гамма-1-цепи IgG человека. Иммуноблотинг проводили в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Результаты приведены на рис. 1.

Результаты иммуноблотинга свидетельствуют о том, что все препараты рекомбинантных химерных антител в невосстанавливающих условиях имеют ос-

новную полосу, соответствующую по подвижности молекулярной массе около 150 кДа и практически одинаково окрашиваются МАТ 4G7 и 2C11, что соответствует составу и ожидаемой молекулярной массе молекулы IgG. Все образцы антител также имеют три-четыре дополнительных минорных полосы, которые окрашиваются обоими МАТ и содержат фрагменты тяжелой и легкой цепей, что указывает на возможную протеолитическую деградацию антител, неполную сборку (отсутствие замыкания дисульфидных связей в шарнирной области), наличие свободных легких цепей. В восстанавливающих условиях антитело 4G7 окрашивает исключительно свободную легкую цепь изотипа каппа с электрофоретической подвижностью на уровне 25 кДа. Антитело 2C11 против тяжелой цепи IgG1 человека в восстанавливающих условиях не окрашивает полос в образцах антител, что указывает на зависимость связывания этого антитела от замыкания внутрицепочечных дисульфидных связей в исследуемых антителах. Подвижность и характер окрашивания полос, выявленные с помощью иммуноблотинга с использованием антител 2C11 и 4G7, однозначно доказывают подлинность образцов рекомбинантных полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534 против EBOV GP.

Иммунореактивность рекомбинантных химерных IgG против EBOV GP определяли методом непрямого ИФА с иммобилизованными вирусными белками EBOV rGPdTM, NP и VP40 (рис. 2).

Результаты непрямого ИФА полноразмерных химерных антител с иммобилизованными структурны-

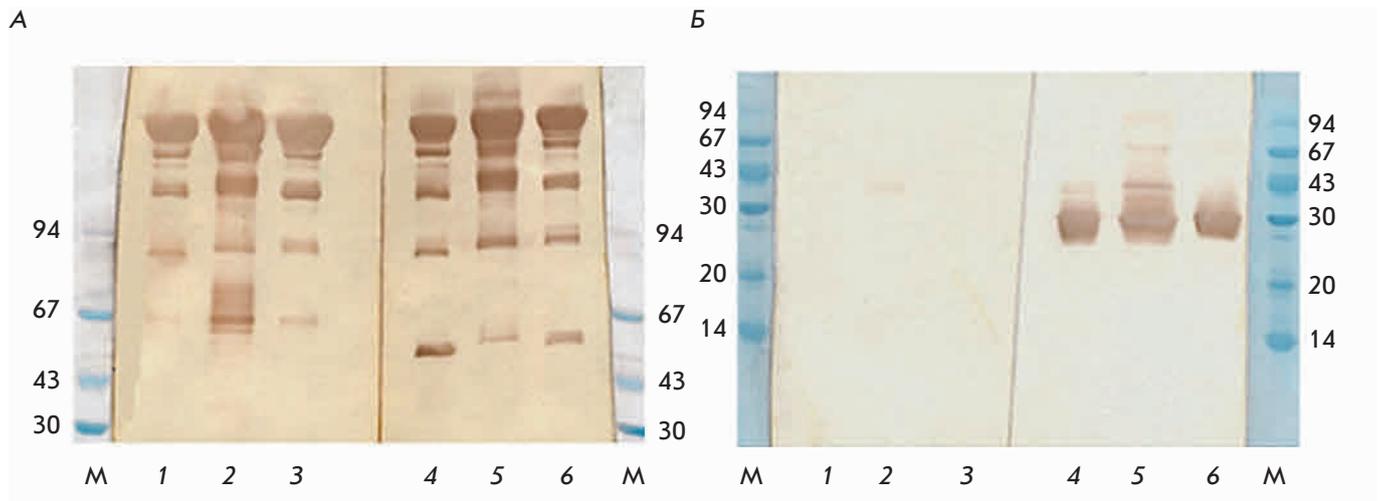


Рис. 1. Иммуноблотинг рекомбинантных химерных антител в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б) условиях после 7% SDS-ПААГ с конъюгатами на основе МАТ 2С11 (1–3) и МАТ 4G7 (4–6). 1, 4 – GPE118, 2, 5 – GPE325, 3, 6 – GPE534. М – стандарты молекулярной массы, кДа

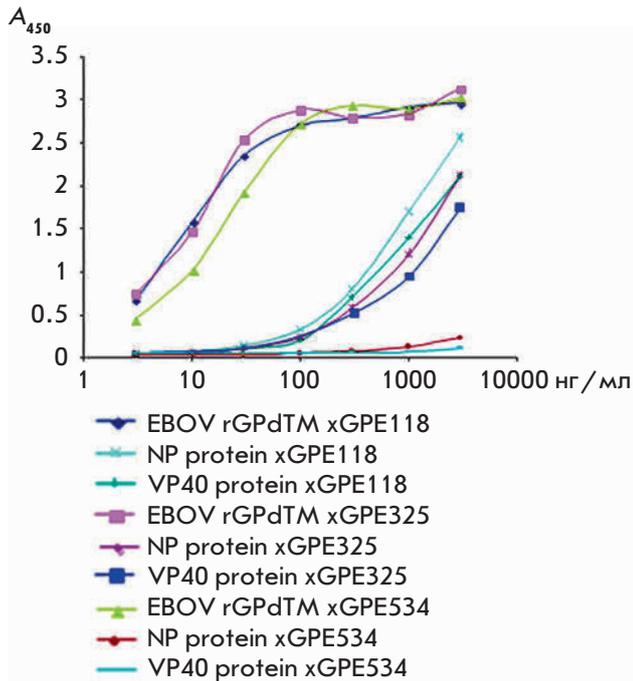


Рис. 2. Кривые титрования полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА (ОД = 450 нм) с иммобилизованными белками EBOV rGPdTM, NP и VP40. xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM, NP – нуклеопротеин, VP40 – структурный белок, rGPdTM – гликопротеин вируса Эбола

ми белками EBOV rGPdTM, NP и VP40 показывают, что все антитела направлены исключительно против вирусного гликопротеина.

Иммунореактивность (определение конечной точки кривой титрования, end point titer – EPT) полноразмерных химерных антител оценивали методом непрямого ИФА с сорбцией EBOV rGPdTM на твердую фазу. Результаты титрования (рис. 3) полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА с иммобилизованным EBOV rGPdTM свидетельствуют о высокой аффинности экспериментальных образцов к целевому белку: EPT для xGPE118, xGPE325 и xGPE534 соответствует концентрации 0.3 нг/мл (2 пМ).

Специфичность трех экспериментальных образцов рекомбинантных полноразмерных химерных антител против EBOV GP анализировали методом иммуноблотинга (рис. 4) с рекомбинантным EBOV rGPdTM, который представляет собой внеклеточную часть вирусного гликопротеина с удаленным трансмембранным доменом, экспрессированную в клетках насекомых и имеющую природный характер гликозирования.

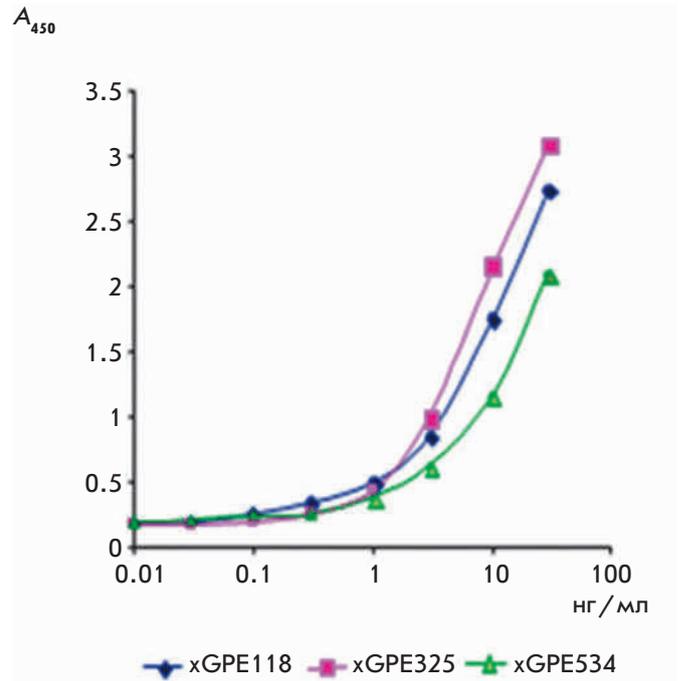


Рис. 3. Зависимость поглощения при 450 нм от концентрации полноразмерных химерных антител в непрямом ИФА с иммобилизованным EBOV rGPdTM. xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM

Результаты иммуноблотинга показывают, что рекомбинантные полноразмерные антитела GPE118, GPE325 и GPE534 в невозстанавливающих условиях окрашивают одну мажорную полосу с молекулярной массой около 95 кДа, что соответствует полноразмерному гликопротеину GP. В восстанавливающих условиях эти антитела окрашивают две полосы, соответствующие субъединицам GP1 и GP2, что однозначно доказывает специфичность полученных антител по отношению к EBOV rGPdTM.

Значения констант диссоциации комплекса антиген-антитело определяли в координатах Клотца по методу Фриге [11]. В табл. 1 приведено сравнение констант диссоциации исходных МАТ мыши [9] и рекомбинантных полноразмерных химерных антител, полученных нами.

Сравнение аффинностей исходных МАТ мыши и рекомбинантных химерных антител свидетельствует о неизменности этого параметра при переходе от природных полноразмерных МАТ к рекомбинантным полноразмерным химерным антителам, несмотря на модификацию константных частей антител, что указывает на корректное определение аминокис-

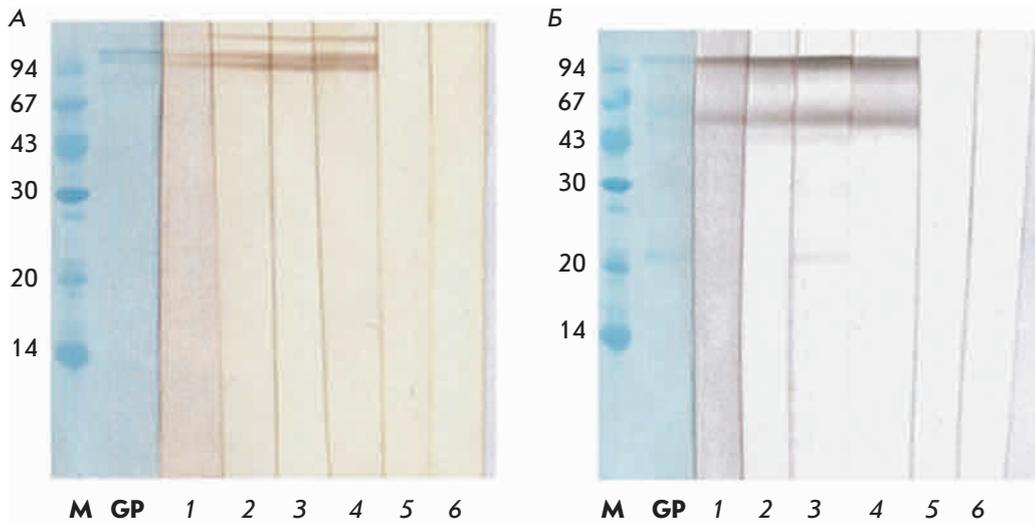


Рис. 4. Иммуноблоттинг рекомбинантных химерных антител против EBOV GP после 12% SDS-ПААГ в невосстанавливающих (А) и восстанавливающих (Б) условиях. После переноса на мембрану каждую полоску инкубировали с отдельным антителом. 1 – GPE118, 2 – GPE325, 3 – GPE534, 4 – мАТ с6D8 (положительный контроль), 5 – h13F6 (отрицательный контроль), дорожка 6 – Fl6v3, М – стандарты молекулярной массы, кДа

лотных последовательностей мАТ мыши и правильный фолдинг рекомбинантных белков в выбранной системе экспрессии. Следует отметить, что аффинность антитела xGPE325 IgG1-изотипа была даже несколько выше, чем у родительских мышинных мАТ IgM-изотипа.

Полноразмерные рекомбинантные антитела использовали для проведения эпитопного картирования методами конкурентного ИФА с использованием коммерческих антител с известной эпитопной специфичностью (табл. 2). Этот анализ необходим для теоретической оценки возможной протективной активности. Для подтверждения правильного выбора трех и более моноклональных антител против EBOV GP, в первую очередь, требуется показать, что мАТ связываются или взаимодействуют с тремя неперекрывающимися эпитопами GP, и эти эпитопы близки к эпитопам известных нейтрализующих антител.

При проведении твердофазного конкурентного ИФА с использованием мономерного антигена биотинилированного EBOV rGPdTM исследуемое антитело захвата иммобилизовали на твердую фазу, затем одновременно добавляли биотинилированный антиген и контрольное мАТ с известной эпитопной специфичностью. Если каждое мАТ в паре направлено против разных (неперекрывающихся) сайтов узнавания (эпитопов), то образуется тройной комплекс: антитело захвата–антиген–контрольное мАТ; если оба антитела направлены против одного эпитопа, то тройной комплекс на твердой фазе не образуется.

Каждое из коммерческих антител иммобилизовали на твердую фазу. Конкурентный ИФА проводили с использованием рекомбинантных химерных антител GPE118, GPE325, GPE534, а также коммерческих антител с известной эпитопной специфичностью [12].

Таблица 1. Сравнение K_d для исходных мАТ мыши и полноразмерных химерных антител

Образец	Субизотипы	K_d , нМ
GPE118	IgG1-каппа, мышь	1.7–2.0
xGPE118	IgG1-каппа, человек	2.5–4.0
GPE325	IgM-каппа, мышь	1.8–3.4
xGPE325	IgG1-каппа, человек	1.2–2.5
GPE534	IgG2b-каппа, мышь	0.8–1.0
xGPE534	IgG1-каппа, человек	1.3–1.9

Примечание. xGPE118, xGPE325, xGPE534 – химерные рекомбинантные антитела к rGPdTM.

Результаты конкурентного ИФА для полученных нами рекомбинантных полноразмерных химерных и коммерческих антител при связывании с биотинилированным EBOV rGPdTM позволяют качественно охарактеризовать эпитопы экспериментальных антител. Антитело GPE534 конкурирует с нейтрализующим антителом KZ52, антитела GPE118, GPE325, GPE534 достаточно сильно, хотя и в разной степени, конкурируют с нейтрализующим антителом h13F6. Антитела GPE118 и GPE534 весьма слабо конкурируют с нейтрализующим антителом c13C6 и слабо конкурируют с нейтрализующим антителом с6D8. Ни одно из экспериментальных антител не конкурирует с ненейтрализующим мышинным мАТ 4F3. Данные конкурентного ИФА (не приведены) позволяют рассчитать коэффициент ингибирования (КИ) связывания рекомбинантных полноразмерных антител с биотинилированным EBOV rGPdTM в присутствии контрольных коммерческих антител в разных концентрациях (табл. 3). КИ представляет собой от-

Таблица 2. Свойства коммерческих антител против EBOV GP

Антитело	Видовая принадлежность	Эпитоп	Полипептид	Компонент коктейля антител	Нейтрализующая активность	Ссылка
KZ52	Человек	конформационный	GP1-GP2	нет	+	[11]
h13F6	Мышь/человек	404-412	GP1	MB-003	+	[4]
c13C6FR1	Мышь/человек	33-295	GP1	MB-003, ZMapp	+	[4, 5]
c6D8	Мышь/человек	393-401	GP1	MB-003	+	[4]
4F3	Мышь	н/д		нет	-	

Таблица 3. Коэффициент ингибирования экспериментальных образцов полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534 контрольными мАТ по данным конкурентного ИФА с биотинилированным EBOV rGPdTM

Контрольные мАТ	КИ контр. мАТ	GPE118 IgG/Fab*/мАТ	GPE325 IgG/Fab*/мАТ	GPE534 IgG/Fab*/мАТ	Эпитоп, а.о.	Полипептид
h13F6	0.39	0.35/0.69/0.31	0.41/0.57/0.30	0.96/1.00/0.97	404-412	GP1
c13C6FR1	0.20	0.86/0.93/0.94	1.13/0.94/1.18	0.96/1.01/0.88	33-295	GP1
c6D8	0.39	0.76/0.99/0.77	0.60/0.64/0.70	0.67/0.99/0.97	393-401	GP1
KZ52	0.17	1.09/1.02/1.03	1.04/1.10/1.11	0.63/0.92/0.86	Конф.	GP1-GP2
4F3	0.43	1.05/0.90/1.23	1.31/1.10/1.44	1.0/0.87/0.96	н.д.	н.д.

* Из данных работы [13].

Примечание. контр. мАТ – контрольные мАТ; IgG – химерные полноразмерные антитела; конф. – конформационный; н.д. – нет данных.

ношение поглощения в конкурентном ИФА при концентрации контрольного мАТ 3 мкг/мл и отсутствии контрольного мАТ. При значениях КИ, больших или равных 1, конкуренция между контрольным мАТ и исследуемыми полноразмерными антителами отсутствует, т.е. антитела направлены против разных эпитопов. Если КИ меньше 1, то контрольное мАТ и исследуемые полноразмерные антитела взаимодействуют с одним и тем же или близко расположенными эпитопами. Чем меньше значение КИ, тем ближе расположены эпитопы.

Анализ значений КИ позволяет сделать вывод о совпадении эпитопов рекомбинантных полноразмерных антител GPE118, GPE325 и GPE534, химерных Fab-фрагментов [13] и исходных мышинных мАТ. Также все три кандидатных антитела против EBOV GP действительно направлены против разных эпитопов. Ни одно из них не конкурирует с нейтрализующим мАТ 4F3. Эпитоп антител GPE118 и GPE325 перекрывается с эпитопом мАТ h13F6, локализованным в муциновом домене GP между аминокислотными остатками 404-412 субъединицы GP1 гликопротеина,

причем GPE118 конкурирует за связывание с антигеном сильнее, чем антитело h13F6 само с собой. Эпитоп антитела GPE325 перекрывается с эпитопом мАТ c6D8, локализованным между аминокислотными остатками 393-401 субъединицы GP1, и немного смещен в направлении N-конца субъединицы GP1 относительно эпитопа GPE118. Эпитоп GPE534, который по данным иммуноблотинга имеет линейную природу, расположен вблизи конформационного эпитопа мАТ KZ52, в формировании которого принимают участие многочисленные аминокислотные остатки субъединиц GP1 и GP2 вирусного гликопротеина. Таким образом, все три полноразмерных химерных антитела против EBOV GP имеют эпитопы, совпадающие или перекрывающиеся с эпитопами трех хорошо исследованных нейтрализующих мАТ против вируса Эбола.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено конструирование и осуществлена наработка в клетках CHO рекомбинантных полноразмерных химерных антител GPE118, GPE325 и GPE534

к гликопротеину вируса Эбола. Иммунохимические свойства рекомбинантных химерных полноразмерных антител изучены методами иммуноблоттинга, непрямого, прямого и конкурентного ИФА с использованием рекомбинантных белков EBOV rGPdTM, NP и VP40. Подлинность рекомбинантных химерных полноразмерных антител изотипа IgG1 доказана методом иммуноблоттинга с применением мАТ 4G7 против легкой цепи каппа Ig человека и мАТ 2C11 против тяжелой цепи IgG1 человека, а также их специфичность по отношению к EBOV GP. Результаты непрямого ИФА свидетельствуют об отсутствии перекрестного иммунологического взаимодействия с белками NP и VP40 вируса Эбола. Аффинность полноразмерных антител указывает на высокое сродство экспериментальных образцов к EBOV GP.

Анализ значений коэффициента ингибирования, полученных в результате конкурентного ИФА с использованием панели коммерческих нейтрализую-

щих антител, позволяет сделать вывод о том, что все исследуемые антитела направлены против разных участков гликопротеина. При этом эпитопы рекомбинантных антител совпадают или частично перекрываются с эпитопами трех коммерческих нейтрализующих антител против вируса Эбола. Этот результат свидетельствует о потенциально высокой нейтрализующей активности полученных рекомбинантных антител. ●

Работа выполнена с использованием средств субсидии (соглашение № 14.607.21.0096), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта – RFMEFI60714X0096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Geisbert T.W., Young H.A., Jahrling P.B., Davis K.J., Kagan E., Hensley L.E. // J. Infect. Dis. 2003. V. 188. № 11. P. 1618–1629.
- Warren T.K., Warfield K.L., Wells J., Swenson D.L., Donner K.S., van Tongeren S.A., Garza N.L., Dong L., Mourich D.V., Crumley S., et al. // Nat. Med. 2010. V. 16. № 9. P. 991–994.
- Oswald W.B., Geisbert T.W., Davis K.J., Geisbert J.B., Sullivan N.J., Jahrling P.B., Parren P.W., Burton D.R. // PLoS Pathog. 2007. V. 3. № 1. e9.
- Olinger G.G. Jr., Pettitt J., Do Kim, Working C., Bohorov O., Bratcher B., Hiatt E., Hume S., Johnson A., Morton J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. № 44. P. 18030–18035.
- Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D.A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N.A., Staupe R.P., Bailey M., et al. // Science. 2016. V. 351. № 6279. P. 1339–1342.
- Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., Fausther-Bovendo H., Wei H., Aviles J., Hiatt E., et al. // Nature. 2014. V. 514. № 7520. P. 47–53.
- PREVAIL II Writing Group; Multi-National PREVAIL II Study Team, Davey R.T. Jr., Dodd L., Proschan M.A., Neaton J., Neuhaus Nordwall J., Koopmeiners J.S., Beigel J., Tierney J., Lane H.C., Fauci A.S., et al. // N. Engl. J. Med. 2016. V. 375. № 15. P. 1448–1456.
- Панина А.А., Алиев Т.К., Шемчукова О.Б., Дементьева И.Г., Варламов Н.Е., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // ДАН. 2016. Т. 467. № 4. С. 477.
- Шемчукова О.Б., Дементьева И.Г., Варламов Н.Е., Позднякова Л.П., Боков М.Н., Алиев Т.К., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Свешников П.Г. // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2016. № 1. С. 29–34.
- Балабашин Д.С., Алиев Т.К., Топорова В.А., Панина А.А., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. Патент РФ на изобретение № 2555533.
- Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // J. Immunol. Meth. 1985. V. 77. № 2. P. 305–319.
- Lee J.E., Fusco M.L., Hessel A.J., Oswald W.B., Burton D.R., Saphire E.O. // Nature. 2008. V. 454. P. 177–182.
- Панина А.А., Дементьева И.Г., Алиев Т.К., Топорова В.А., Боков М.Н., Позднякова Л.П., Шемчукова О.Б., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // Биоорг. химия. 2017. Т. 43. № 4. С. 389–401.

УДК 577.112

Прямой молекулярный фишинг новых белков-партнеров тромбосансинтазы человека

А. В. Свирид¹, П. В. Ершов², Е. О. Яблоков², Л. А. Калужский², Ю. В. Мезенцев^{2*},
А. В. Флоринская², Т. А. Сушко^{1,3}, Н. В. Струшкевич¹, А. А. Гилеп¹, С. А. Усанов¹,
А. Е. Медведев², А. С. Иванов²

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, 220141, Беларусь, Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5, корп. 2

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8

³Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

*E-mail: yu.mezentsev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2017

Принята к печати 11.10.2017

РЕФЕРАТ Тромбосансинтаза (TBXAS1) катализирует реакцию изомеризации простагландина H₂ с образованием тромбосана A₂ – аутокринного и паракринного фактора многих клеток. Высокая активность и метастабильность этих производных арахидоновой кислоты позволяют предположить существование надмолекулярных структур, участвующих в регуляции биосинтеза и адресной транслокации тромбосана к рецептору. Целью настоящей работы была идентификация белков-партнеров TBXAS1 из лизата ткани печени человека с использованием комплексного подхода, основанного на применении технологии прямого молекулярного фишинга, LC-MS/MS-идентификации белков и валидации белок-белкового взаимодействия с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1, в том числе компоненты, регулирующие организацию цитоскелета (BBIP1 и ANKMY1), компоненты коагуляционного каскада крови (SERPINA1, SERPINA3, APOH, FGA и FN1) и фермент метаболизма ксенобиотиков и эндогенных биорегуляторов (CYP2E1). SPR-валидация на биосенсоре Biacore 3000 подтвердила эффективность взаимодействия CYP2E1 (фермент метаболизма простагландина H₂ до 12-ННТ/проантагониста тромбосана A₂) с TBXAS1 ($K_d = (4.3 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ М). Показательно, что аффинность комплексообразования TBXAS1 · CYP2E1 пятикратно возрастает в присутствии изатина (индол-2,3-дион, низкомолекулярный непептидный эндогенный биорегулятор, продукт CYP2E1). Полученные нами результаты позволяют предположить важность взаимодействия данных гемопротеинов в регуляции биосинтеза эйкозаноидов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки-партнеры, изатин, поверхностный плазмонный резонанс, прямой молекулярный фишинг, тромбосансинтаза (CYP5A1, TBXAS1), цитохром P450.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ББВ – белок-белковые взаимодействия; SPR (surface plasmon resonance) – поверхностный плазмонный резонанс; k_{on} – константа скорости ассоциации; k_{off} – константа скорости диссоциации; K_d – равновесная константа диссоциации.

ВВЕДЕНИЕ

Тромбосансинтаза человека (TBXAS1) входит в суперсемейство цитохромов P450 (CYP5A1), однако, по своей функции она отличается от «классических» цитохромов P450, которые катализируют разнообразные монооксигеназные реакции при участии редокс-партнеров в качестве донора электронов [1]. TBXAS1 катализирует реакцию изомеризации простагландина H₂ (PGH₂), не требующую редокс-парт-

неров и приводящую к образованию тромбосана A₂ (TXA₂) [2]. Последний, выступая в качестве паракринного регулятора, является важным медиатором агрегации тромбоцитов и сокращения стенок кровеносных сосудов, который способствует повышению артериального давления.

Помимо изомеризации PGH₂ TBXAS1 катализирует альтернативную реакцию превращения PGH₂, осуществляя его расщепление на 12-гидрокси-

5,8,10-гептатриеновую кислоту (12-ННТ) и малоновый диальдегид (MDA) [3]. В настоящее время нет точных сведений о функциональной роли MDA и 12-ННТ. MDA может образовывать аддукты с аминокислотными группами белков или полярных групп фосфолипидов и таким образом играть определенную роль в молекулярных механизмах возникновения атеросклероза, рака и ряда генетических заболеваний [4, 5]. 12-ННТ и ее метаболиты могут блокировать действие лейкотриеновых рецепторов и выступать в качестве частичного антагониста ТХА₂ за счет увеличения синтеза простаглицина и антагонистического воздействия на рецептор тромбоспандина (ТХАР) [6, 7]. Нельзя исключить, что ТВХАС1 способна выполнять и другие функции, катализируя типичные для цитохромов Р450 монооксигеназные реакции с участием редокс-партнеров.

Первоначально ТВХАС1 выделили из тромбоцитов человека [3] и легких свиньи [8]. ТВХАС1 преимущественно синтезируется в протромбоцитах и стволовых гемопоэтических клетках-предшественниках моноцитов, лейкоцитов и макрофагов, где ТХА₂ участвует в регуляции дифференцировки [9]. Синтез ТВХАС1 обнаружен также в клетках легких, почек, желудка, кишечника, селезенки, тимуса, поджелудочной железы и печени [10]. ТХАР, относящийся к классу сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), представлен в большом количестве тканей (в легком, селезенке, печени, матке, плаценте, аорте, сердечной мышце, кишечнике, тимусе, почках, спинном и головном мозге) [11]. Это может свидетельствовать о других возможных функциях ТВХАС1 или об универсальности механизмов реализации его основной функции.

Один из подходов к выяснению неизвестных функций белка основан на изучении его взаимодействия с другими белками, функции которых уже известны [12]. В основе этого подхода лежит концепция о том, что функции взаимодействующих белков-партнеров должны либо быть взаимосвязаны, либо образовывать единый белковый комплекс, выполняющий последовательные взаимосвязанные функции. Субстрат и продукт реакции ТВХАС1 – крайне короткоживущие и активные липофильные молекулы, диффузный транспорт которых затруднен, а рецептор к ТХА₂ находится на внешней стороне плазматической мембраны. Это предполагает существование специфического транспортного механизма, или, вероятнее всего, взаимодействия с взаимосвязанными белковыми комплексами, ответственными за перенос этих короткоживущих соединений.

На сегодняшний день имеется крайне скудная информация об экспериментально подтвержденных белок-белковых взаимодействиях (ББВ) с уча-

ствием ТВХАС1. В базе данных BioGRID есть только две записи о зарегистрированных ББВ с участием ТВХАС1 (<https://thebiogrid.org/112778/summary/homo-sapiens/tbxas1.html?sort=bait>): (1) взаимодействие с эукариотическим фактором элонгации 1 α -2 (EEF1A2) со ссылкой на неопубликованные данные [13]; (2) взаимодействие с убиквитином С (UBC) [14]. Наиболее вероятно, что оба этих взаимодействия неспецифические, так как в той же базе BioGRID зарегистрировано 132 возможных взаимодействия EEF1A2 со 124 партнерами и 2332 взаимодействия UBC с 1440 партнерами. В 2016 году Meling D.D. в реферате своей диссертации (Protein-protein interactions and mechanistic insights for CYP2J2 and ТВХАС1) привел неопубликованные данные о взаимодействии ТВХАС1 с цитохромом-Р450-редуктазой (CPR) (<http://hdl.handle.net/2142/90774>), что, несомненно, может быть функционально значимым, так как CPR является известным белком-партнером микросомальных цитохромов Р450.

Ранее для поиска новых белков-партнеров, взаимодействующих с целевым белком, мы разработали комплексный подход, основанный на применении технологии прямого молекулярного фишинга на аффинном сорбенте с иммобилизованным целевым белком (или пептидом) в качестве лиганда, масс-спектрометрической идентификации выделенных белков и валидации потенциальных ББВ с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [15–17].

Цель настоящей работы состояла в поиске возможных новых белков-партнеров ТВХАС1 в лизате ткани печени человека с использованием данного подхода. В результате на аффинной колонке с иммобилизованной ТВХАС1 с помощью LC-MS/MS-анализа были выделены и идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров ТВХАС1, один из которых оказался цитохромом Р450 (CYP2E1). Валидация методом SPR подтвердила его взаимодействие с иммобилизованной на оптическом чипе ТВХАС1 и выявила еще один потенциальный белок-партнер (CYP11B2). Контрольные SPR-эксперименты с пятью другими цитохромами Р450 (CYP2C19, CYP11A1, CYP11B1, CYP3A4, CYP3A5) дали отрицательный результат, что говорит о высокой специфичности выявленных ББВ. Поскольку CYP2E1 участвует в метаболизме различных производных индола [18], то дополнительно исследовали возможное влияние известного эндогенного биорегулятора изатина (индол-2,3-диона) [19–22] на взаимодействие CYP2E1 и CYP11B2 с ТВХАС1. Обнаружили, что изатин в 5 раз увеличивает аффинность взаимодействия ТВХАС1 · CYP2E1 и не влияет на взаимодействие ТВХАС1 · CYP11B2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоматериалы

В работе использовали образцы ткани печени человека, полученные от фирмы ILSbio, LLC (www.ilsbio.com). Высокоочищенные (> 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE)) препараты рекомбинантных белков: TBXAS1, цитохромы P450 – лимонен-6-монооксигеназа (CYP2C19), стероид-20,22-лиаза (CYP11A1), стероид-11 β -гидроксилаза (CYP11B1), альдостеронсинтаза (CYP11B2), таурохенодезоксихолат-6 α -монооксигеназа (CYP3A4), гидроксилаза циклических углеводов (CYP3A5), 4-нитрофенол-2-гидроксилаза (CYP2E1), микросомальный цитохром b₅ (CYP5A), NADPH-цитохром-P450-редуктаза (CPR), NADPH-аденодоксинредуктаза (ADR), аденодоксин (ADX), феррохелатаза (FECH), SMAD4, RAB27B – получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси путем молекулярного клонирования и гетерологической экспрессии в бактериальной системе (*E. coli*) с последующей очисткой с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии [23, 24]. Препарат ретинолсвязывающего белка 4 (RBP4) получен от Cayman chemical (США).

Лизат ткани печени человека

Лизат получали путем гомогенизации 100 мг образца в ступке Поттера с добавлением 1 мл лизирующего буфера CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (Sigma, США) и 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США). После центрифугирования при 13400 *g* и 4°C в течение 25 мин собирали супернатант, добавляли 25% глицерина и хранили при температуре –80°C. Содержание общего белка в пробах лизата, определенное спектрофотометрически по методу Бредфорда, составляло 10–20 мг/мл.

Прямой молекулярный фишинг

Аффинный сорбент с иммобилизованной TBXAS1 в качестве белка-наживки получали путем ковалентного связывания белка на CNBr-сефарозе 4B (GE Healthcare, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Установлено, что оптимальным для связывания используемого препарата тромбосансинтазы с сорбентом было соотношение 0.5 мг белка/1 г сорбента. Инактивацию оставшихся активных групп сорбента выполняли путем его инкубации в буфере, содержащем 100 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl. Прямой молекулярный фишинг осуществляли в оригинальной микроколонке (объем 200 мкл), заполненной аффинным сорбентом. В контрольных экспериментах использовали аналогич-

ную микроколонку, заполненную «пустой» (без белка-наживки) инактивированной CNBr-сефарозой 4B. В качестве рабочего буфера использовали буфер HBS-EP+ (10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.05% Tween 20), пропускаемый через микроколонку со скоростью потока 50 мкл/мин при температуре 15°C. Хроматографическое разделение проводили с использованием системы АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США). Аффинное выделение белков-партнеров тромбосансинтазы выполняли, пропуская через колонку 2 мл лизата (0.5 мг/мл белка), разбавленного в 2 раза рабочим буфером, в течение 80 мин. Связавшиеся на сорбенте белки элюировали 4% раствором HCOOH (pH 2.5) при скорости потока 50 мкл/мин в течение 100 мин. Содержание общего белка в элюатах, определенное по методу Бредфорда, составляло 25–35 мкг/мл (среднее 30 мкг/мл). Эксперименты по аффинному выделению потенциальных белков-партнеров TBXAS1 повторяли 3 раза.

LC-MS/MS-анализ

Для масс-спектрометрической идентификации белков выполняли специальную пробоподготовку. Из каждой хроматографической фракции отбирали аликвоту, содержащую 30 мкг общего белка, и подвергали стандартной процедуре трипсинолиза с предварительным алкилированием и восстановлением сульфгидрильных групп белков. Все процедуры выполняли в концентраторах Vivaspin 500 Centrifugal Concentrator, 10 кДа MWCO (GE Healthcare, США) по методу FASP [25]. Для трипсинолиза белков использовали лиофилизированный препарат трипсина из поджелудочной железы свиньи (активность 15600 Ед/мг, кат. номер V5111, Promega, США). Масс-спектрометрический анализ образцов выполняли в трех технических повторях с использованием хроматографа Agilent 1200 и масс-детектора Agilent серии 6300 с ионной ловушкой Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, США). Разделение пептидов выполняли на обращенно-фазовой HPLC-колонке ZORBAX Extend-C18 (2.1 × 150 мм, 1.8 мкм) (Agilent Technologies, США), в градиенте растворителя А (0.2% раствор муравьиной кислоты в воде) и растворителя В (0.2% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) в течение 55 мин при скорости тока 350 мкл/мин. Объем образца, наносимого на колонку, составлял 15 мкл (~ 7–8 мкг материала). Характер градиента был следующим: от 0 до 20% растворителя В за 5 мин, от 20 до 80% за 40 мин, от 80 до 95% за 5 мин и 95%, 5 мин. Температура колонки – 50°C. Масс-спектры получали в режиме положительной ионизации (APESI-ионизация) со сле-

дующими параметрами: температура газа 400°C, скорость тока газа 9 л/мин, напряжение на капилляре 2 кВ, напряжение на фрагментаторе 360 В. Масс-анализатор работал в авто-MS/MS-режиме со следующими параметрами: диапазон m/z от 50 до 2200 m/z , энергию фрагментации рассчитывали по следующим формулам $(3.1(m/z)/100 + 1.0)V$ для $z = 2$ и $(3.6(m/z)/100 - 4.8)V$ для $z \geq 3$. Белки идентифицировали с помощью программы Mascot (www.matrixscience.com) с использованием базы данных SwissProt (www.uniprot.org). Использовали следующие параметры поиска: протеолитический фермент трипсин, допустимые отклонения по массе монозотопных пептидов ± 2.6 Да, допустимые отклонения MS/MS ± 0.6 Да, число допустимых пропусков сайтов расщепления трипсином – 2, вариабельные модификации – «окисленный метионин», фиксированные модификации – «карбамидометил». В результирующий список достоверно обнаруженных белков включали только те белки, идентифицируемые при трех технических повторах со значимостью 0.01 и Mascot Score > 50.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Анализ ББВ выполняли на четырехканальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE Healthcare, США), работающем на эффекте поверхностного плазмонного резонанса под управлением компьютерной программы Biacore Control Software v. 1.0. Сигналы биосенсора регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Значения равновесных констант диссоциации (K_d), констант скорости образования (k_{on}) и распада (k_{off}) комплексов рассчитывали с помощью программного комплекса BiaEvaluation v. 4.1.

Иммобилизацию TBXAS1 осуществляли путем формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5 и свободными аминоклассами белка. С этой целью использовали набор Amine Coupling Kit (GE Healthcare, США), а инъекцию образца TBXAS1 (50 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5.0) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 20 мин. Уровень иммобилизации TBXAS1 в рабочем канале оптического биосенсора в среднем составлял 7500 RU (7.5 нг/мм²).

Регистрацию взаимодействий тестовых белков с иммобилизованной TBXAS1 осуществляли в режиме реального времени путем инъекций образцов белков в диапазоне концентраций от 50 нМ до 5 мкМ сначала через контрольный (без белка) и рабочий (с иммобилизованной TBXAS1) каналы оптического биосенсора в течение 10 мин при скорости по-

тока 5 мкл/мин. После каждого измерения выполняли регенерацию поверхности оптического чипа путем инъекции буфера, содержавшего 2 М NaCl и 0.4% CHAPS, в течение 30 с при скорости потока 20 мкл/мин. Все измерения выполняли не менее 4 раз, что обеспечивало достаточную точность и воспроизводимость результатов (значение CV было менее 10%). В экспериментах по оценке возможного влияния непептидного низкомолекулярного эндогенного биорегулятора изатина (2,3-диоксоиндола) на ББВ с участием TBXAS1 к образцам белков-аналитов добавляли изатин в конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали смесь в течение 15 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления новых белков-партнеров TBXAS1 использовали образцы ткани печени, поскольку в них экспрессируется как целевой белок, так и рецептор к ТХА₂. Комплексный подход, основанный на технологии прямого молекулярного фишинга на аффинном сорбенте с иммобилизованным на CNBr-сефарозе 4В целевым белком, масс-спектрометрической идентификации выделенных белков и валидации ББВ с SPR, позволил выделить и идентифицировать 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1 из лизата ткани печени человека (таблица).

На сегодняшний день в научной литературе отсутствует какая-либо информация о взаимодействии этих белков с TBXAS1. Однако можно сделать некоторые предположения об их возможной функциональной взаимосвязи с TBXAS1.

Например, белок BBIP1 (компонент BBSome, транспортного белкового комплекса ресничек) принимает участие в регуляции стабильности клеточно-цитоскелета [26, 27].

Информация о ANKMY1 существует только на уровне транскрипта. Тем не менее, в его структуре выделяют анкириновые повторы, которые образуют один из наиболее распространенных интерфейсов для ББВ. Эти повторы обнаружены в белках, которым свойственны разнообразные функции [28]. Исходя из этого мы предполагаем, что анкириновые повторы ANKMY1 могут специфически узнавать определенные структурные мотивы TBXAS1, обеспечивая взаимодействия этих белков.

Вместе с тем, необходимо отметить, что белки, идентифицированные в результате прямого молекулярного фишинга, могут рассматриваться только в качестве потенциальных партнеров TBXAS1, так как из-за особенностей данной технологии из лизата могут быть выделены не только реальные белки-партнеры, но и «выловленные» вместе с ними посторонние белки, находящиеся в составе сложных надмолекулярных комплексов или мицелл [17]. В по-

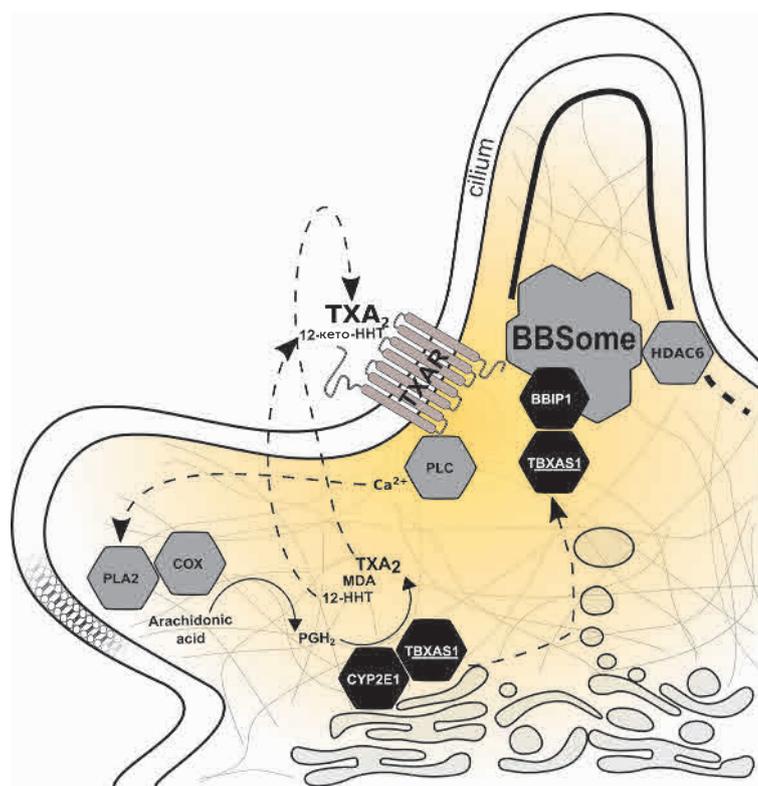


Рис. 1. Схематическое представление системы биосинтеза TXA_2 , дополненное полученными нами экспериментальными данными. PLC – фосфолипаза C, PLA2 – фосфолипаза A2, COX – циклооксигеназа. Биосинтез TXA_2 начинается с высвобождения арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембраны с помощью PLA2. Затем COX катализирует реакцию превращения арахидоновой кислоты в простагландин H_2 , который затем метаболизируется TBXAS1 с образованием TXA_2 , 12-ННТ и MDA. Параллельно с этим простагландин H_2 превращается CYP2E1 в 12-ННТ и MDA. TXA_2 , связываясь с TXAR, вызывает передачу сигнала по инозитолфосфатному пути с активацией PLC и мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} , что оказывает стимулирующее действие на PLA2. 12-ННТ под действием 15-гидроксипростагландина дегидрогеназы образует 12-кето-ННТ, оказывающий частичный антагонистический эффект на TXAR. TBXAS1 предположительно взаимодействует с BBIP1, который является компонентом белкового транспортного комплекса ресничек (BBSome). BBIP1, в свою очередь, способен влиять на стабильность микротубулинового цитоскелета, опосредованно ингибируя HDAC6 (гистондеацетилазу 6)

лученном нами «улове» (таблица) к подобным белкам можно отнести SERPINA1, SERPINA3, APOH, FGA и FN1, которые входят в каскад свертывания крови [29, 30], а также сывороточные белки HP, SAA1, CP, которые могут иметь высокий уровень неспецифической сорбции.

Особый интерес представляет присутствие в списке «улова» белка, CYP2E1, относящегося к классу цитохромов P450. Функциональная связь CYP2E1 с TBXAS1 может иметь важное значение в контексте взаимодополняющих ферментативных реакций превращения общих субстратов. Как известно, для CYP2E1 характерны широкая субстратная специфичность и широкий профиль тканевой локализации, включая печень [31]. Например, CYP2E1 способен окислять арахидоновую кислоту (посредством ω -1-гидроксилирования), а также простагландин H_2 [32] до побочных метаболитов, которые, в свою очередь, образуются в реакциях изомеризации простагландина H_2 в тромбоксан A_2 . Дальнейший метаболит одного из продуктов реакции – 12-кето-ННТ – способен влиять на эффекты TXA_2 за счет увеличения продукции простагландина и антагонистического действия на TXAR [4, 5]. Таким образом, совместная локализация TBXAS1, осуществляющей синтез тромбоксана A_2 , и CYP2E1, могла бы служить

дополнительным механизмом регуляции эффективности ферментативных реакций превращения общих субстратов. С другой стороны, следствием олигомеризации разных цитохромов P450 может быть также изменение каталитических параметров ферментативных реакций, например, средства ферментов к субстрату [33]. Схематическое представление системы биосинтеза TXA_2 , дополненное полученными нами экспериментальными данными, представлено на рис. 1.

Возможность образования гетеромерного комплекса TBXAS1/CYP2E1 подтверждена в прямых экспериментах с использованием технологии SPR и иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1 (рис. 2). Для проверки специфичности взаимодействий TBXAS1 и CYP2E1 проведены контрольные SPR-эксперименты по регистрации возможных взаимодействий с тромбоксансинтазой других белков-аналитов: микросомальных (CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5) и митохондриальных (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) цитохромов P450, известных белков-партнеров цитохромов P450 (CYB5A, CPR, ADR, ADX), а также ряда белков, не имеющих отношения к монооксигеназным системам цитохромов P450 (FECH, SMAD4, RAB27B, RBP4) (рис. 3). Все остальные белки, за исключением CYP11B2, даже в микро-

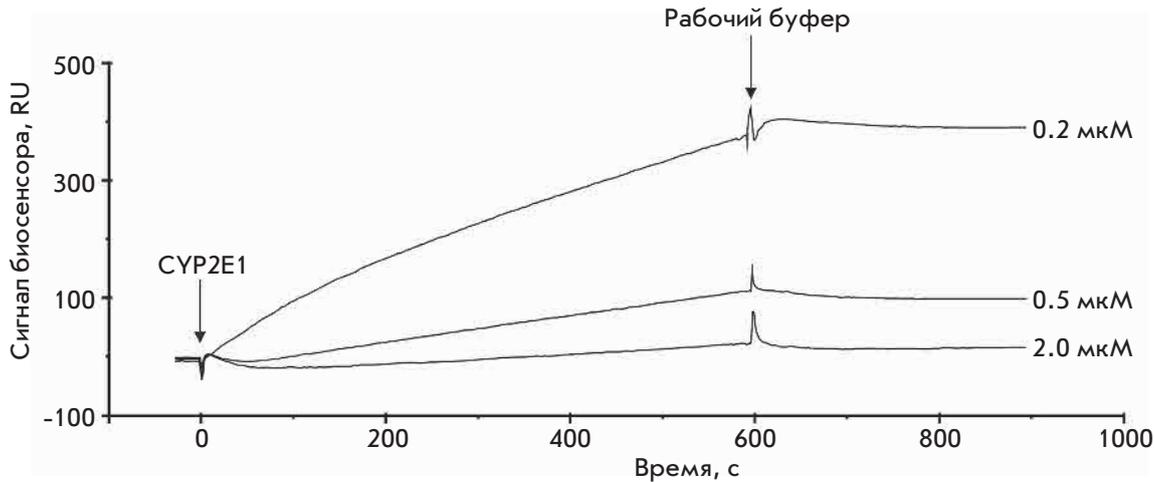


Рис. 2. Типичные серии сенсограмм взаимодействия CYP2E1 в разных концентрациях с иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1

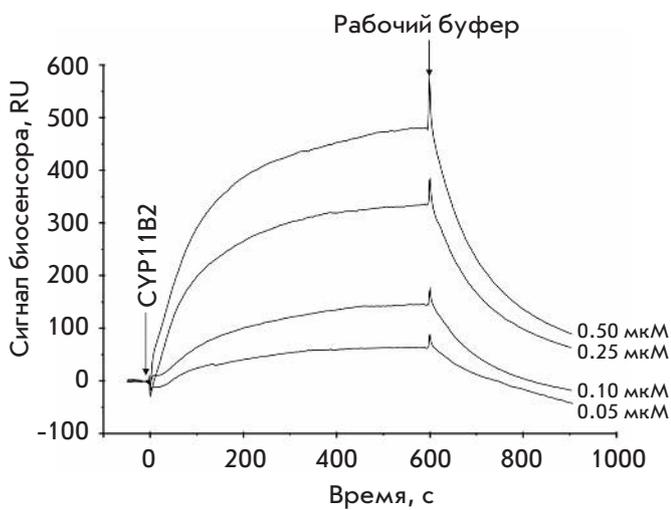


Рис. 3. Типичные серии сенсограмм взаимодействия CYP11B2 в разных концентрациях с иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1

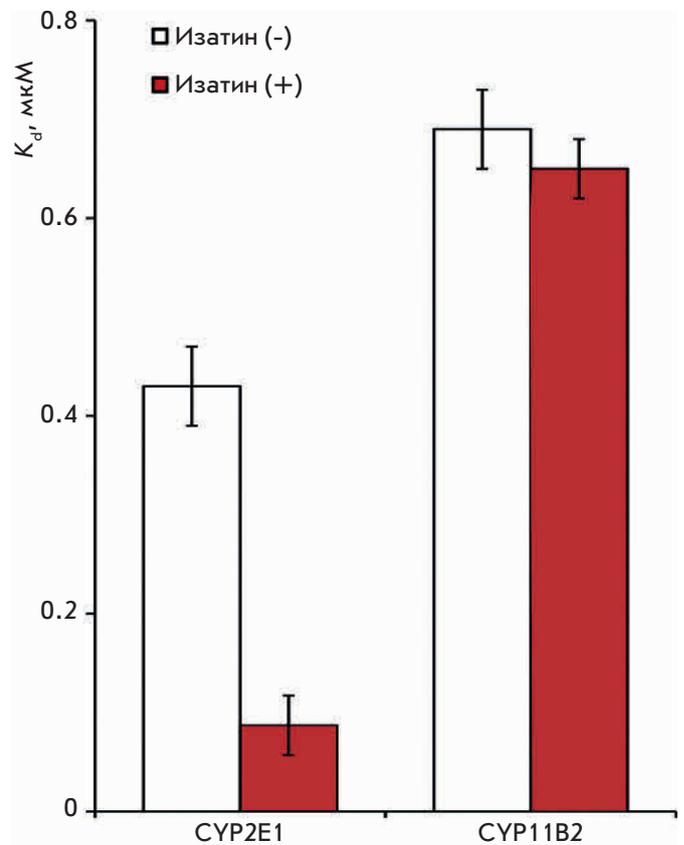


Рис. 4. Диаграмма значений равновесных констант диссоциации комплексов (K_d) TBXAS1 · CYP2E1 и TBXAS1 · CYP11B2 в отсутствие и в присутствии 100 мкМ изатина; $M \pm m$, $n = 3$

молярных концентрациях не связывались с иммобилизованной на оптическом чипе TBXAS1.

Аналогичный контрольный эксперимент с использованием TBXAS1 в качестве белка-аналита показал отсутствие процесса ее димеризации или олигомеризации. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что взаимодействие CYP2E1 и CYP11B2 с TBXAS1 является высокоспецифичным.

Вычисленные значения K_d образования комплексов TBXAS1 · CYP11B2 и TBXAS1 · CYP2E1 составили $(6.9 \pm 0.3) \times 10^{-7}$ М и $(4.3 \pm 0.4) \times 10^{-7}$ М соответственно. Эти значения сопоставимы с K_d комплексов различных цитохромов P450 с их функциональными партнерами (CPR, CYP5A, ADX) [23, 34–37]. Важно отметить, что при небольшом различии в аффинности комплексообразования (K_d различаются при-

мерно в 2 раза) взаимодействия TBXAS1 · CYP11B2 и TBXAS1 · CYP2E1 сильно отличаются по кинетическим параметрам: образование и распад комплекса TBXAS1 · CYP2E1 происходят примерно на порядок медленнее, чем TBXAS1 · CYP11B2. Константы скорости образования комплекса (k_{on}) отличаются в 10

Масс-спектрометрическая идентификация белков в элюатах с хроматографических микроколонок, наполненных аффинным сорбентом

№	Ген	Белок	М.м., Да	Входной номер ^а	Score ^б	Пептиды ^в	emPAI ^г
Сорбент с иммобилизованной тромбоксансинтазой (только опыт). Потенциальные белки-партнеры тромбоксансинтазы (TBXAS1)							
1	FGA	Fibrinogen alpha chain	95656	P02671	97	19 (2)	0.04
2	FN1	Fibronectin	266052	P02751	95	14 (2)	0.01
3	CP	Ceruloplasmin	122983	Q24478	85	10 (5)	0.03
4	SERPINA3	Alpha1-antichymotrypsin	47792	P01011	67	9 (3)	0.08
5	SAA1	Serum amyloid A1 protein	13581	P0DJI8	67	7 (3)	0.29
6	CYP2E1	Cytochrome P450 2E1	56849	P05181	61	11 (4)	0.12
7	ANKMY1	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 1	107101	Q9P2S6	59	25 (7)	0.03
8	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	42052	P60709	56	17 (2)	0.13
9	BBIP1	BBSome-interacting protein 1	10557	A8MTZ0	54	10 (4)	0.38
10	SERPINA1	Alpha 1-antitrypsin	46878	P01009	50	3 (3)	0.13
11	APOH	Beta2-glycoprotein 1	39584	P02749	52	3 (3)	0.09
12	HP	Haptoglobin	45861	Q61687	50	42 (6)	0.21
Сорбент без иммобилизации белка (только контроль)							
1	ACY1	Aminoacylase-1	46084	Q03154	59	17 (3)	0.08
2	ADH1A	Alcohol dehydrogenase 1A	40745	P07327	189	85 (19)	0.42
3	SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	33271	P12235	59	16 (5)	0.24
4	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	33059	P05141	71	27 (5)	0.11
5	MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B	59238	P27338	147	31 (8)	0.20
6	ASL	Argininosuccinate lyase	51910	P04424	89	9 (3)	0.07
7	ASS1	Argininosuccinate synthase	46786	P00966	59	48 (6)	0.17
8	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56525	P25705	108	27 (4)	0.07
9	ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	33032	P36542	95	16 (4)	0.24
10	CALR	Calreticulin	48283	P27797	68	10 (4)	0.25
11	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61187	P10809	126	28 (7)	0.13
12	CPS1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	165975	P31327	249	119 (27)	0.17
13	DEFA1	Neutrophil defensin 1	10536	P59665	58	8 (5)	0.38
14	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	37218	P09467	78	4 (3)	0.10
15	FABP1	Fatty acid-binding protein, liver	14256	P07148	184	29 (17)	1.08
16	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	P04406	169	23 (5)	0.22
17	AGL	Glycogen debranching enzyme	176819	P35573	77	18 (7)	0.06
18	SHMT1	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	53619	P34896	88	16 (5)	0.14
19	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	72402	P11021	75	19 (4)	0.11
20	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	25672	P08263	94	74 (13)	1.29
21	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46915	O75874	274	15 (9)	0.17
22	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	51333	Q8IQA7	105	10 (4)	0.15
23	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	36950	P00338	240	9 (8)	0.21
24	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54311	Q15233	102	27 (6)	0.14
25	PGM1	Phosphoglucomutase-1	61696	P36871	120	10 (6)	0.12
26	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	76216	P23246	106	27 (7)	0.10
27	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45456	P24752	60	11 (4)	0.17
28	TPI1	Triosephosphate isomerase	31057	P60174	150	12 (4)	0.26

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

29	UGT2B10	UDP-glucuronosyltransferase 2B10	61190	P36537	55	8 (3)	0.06
30	UGP2	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	57076	Q16851	72	15 (4)	0.13
Контроль (К) и опыт (О)							
1	UGP2	Alcohol dehydrogenase 1B	40684	P00325	408	117 (34)	1.02
					90	53 (6)	0.30
2	ADH4	Alcohol dehydrogenase 4	41108	P08319	222	36 (16)	0.42
					85	13 (8)	0.30
3	ALB	Serum albumin	71317	P02768	2790	360 (150)	1.90
					959	186 (50)	0.66
4	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	56859	P05091	400	33 (15)	0.29
					94	7 (3)	0.07
5	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	39961	P05062	167	25 (8)	0.31
					220	28 (8)	0.09
6	APOA1	Apolipoprotein A-I	30759	P02647	98	12 (6)	0.42
					53	25 (6)	0.59
7	ATP5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	28947	P24539	192	17 (10)	0.45
					97	13 (5)	0.28
8	ATP5L	ATP synthase subunit g, mitochondrial	11421	O75964	265	7 (6)	0.35
					157	5 (5)	0.35
9	DCXR	L-xylulose reductase	26182	Q7Z4W1	194	27 (6)	0.15
					161	8 (5)	0.15
10	DECR1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	36330	Q16698	250	24 (11)	0.22
					222	13 (8)	0.10
11	HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	80092	P51659	1754	179 (87)	1.26
					112	16 (5)	0.09
12	SORB	Sorbitol dehydrogenase	38927	Q00796	171	17 (13)	0.44
					73	7 (4)	0.10
13	CES1	Liver carboxylesterase 1	62766	P23141	88	28 (4)	0.06
					83	20 (4)	0.06
14	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	15305	P69905	70	48 (10)	2.90
					82	16 (6)	0.25
15	HBB	Hemoglobin subunit beta	16102	P68871	153	30 (11)	0.54
					222	29 (14)	0.54
16	HMGCS2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	57113	P22791	249	26 (13)	0.37
					98	10 (3)	0.07
17	HRG	Histidine-rich glycoprotein	60510	P04196	60	14 (6)	0.13
					52	9 (5)	0.13
18	PHB2	Prohibitin-2	33276	Q99623	107	11 (4)	0.11
					99	7 (3)	0.11
19	ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	42354	P42765	82	20 (6)	0.18
					71	15 (3)	0.18
20	TF	Serotransferrin	79294	P02787	138	20 (6)	0.15
					142	22 (7)	0.20
21	SLC25A1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	34333	P53007	70	9 (4)	0.23
					54	10 (3)	0.23

^a – Входящие номера в базе данных Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

^b – Показатель надежности определения пептидов масс-спектрометрией (MASCOT score).

^c – Число пептидов MASCOT; число уникальных пептидов (в скобках).

^d – emPAI – Exponentially Modified Protein Abundance Index.

Названия идентифицированных белков приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных Uniprot, использованной для их идентификации.

раз, а константы скорости распада комплекса (k_{off}) – в 15 раз.

Обнаружение специфического комплексообразования ТВХАС1 · СУР11В2 оказалось действительно новым и неожиданным результатом, ибо СУР11В2 отсутствовал в качестве идентифицированного белка-партнера как в контроле, так и в опыте при молекулярном фишинге из лизата ткани печени (таблица). Эти данные вполне сопоставимы, не обусловлены появлением ложноотрицательного результата молекулярного фишинга и могут быть объяснены с точки зрения тканеспецифичного профиля экспрессии СУР11В2 (преимущественная экспрессия в ткани надпочечников), что следует из информации в открытых интернет-ресурсах Proteinatlas (<http://www.proteinatlas.org>) и Genecards (<http://www.genecards.org>) и публикации [38]. О функциональных последствиях данного ББВ и его причинах пока говорить затруднительно, поэтому в настоящей работе приведен только сам факт экспериментального подтверждения прямого взаимодействия ТВХАС1 с СУР11В2.

Известно, что одним из субстратов ряда цитохромов Р450 (СУР2А6, СУР2С19 и СУР2Е1), ответственных за метаболизм разнообразных ксенобиотиков, является индол, который окисляется до изатина [18]. Изатин – эндогенный биорегулятор с широким спектром биологических и фармакологических активностей, которые реализуются при его взаимодействии с многочисленными внутриклеточными изатинсвязывающими белками [19–22, 39–41]. Поскольку среди белков, взаимодействующих с ТВХАС1, оказался цитохром Р450 СУР2Е1, мы предположили, что изатин может влиять на образование комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1. Для проверки данной гипотезы проведен SPR-анализ взаимодействия СУР2Е1 с иммобилизованной на оптическом чипе ТВХАС1 в отсутствие и в присутствии изатина. В качестве контроля использовали другую пару белков – ТВХАС1 · СУР11В2. Обнаружили, что изатин действительно влияет на формирование комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1, увеличивая аффинность взаи-

модействия в 5 раз, и при этом не действует на взаимодействие ТВХАС1 · СУР11В2 (рис. 4). Эффект пятикратного увеличения аффинности комплексообразования ТВХАС1 · СУР2Е1 в присутствии изатина обусловлен как увеличением скорости образования комплекса (величина k_{on} выросла в 2 раза), так и снижением скорости его распада (k_{off} уменьшилась 2.5 раза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием комплексного прямого молекулярного фишинга с последующей масс-спектрометрической идентификацией из лизата ткани печени человека выделены 12 потенциальных белков-партнеров тромбосансинтазы, относящихся к белкам цитоскелета, коагуляционного каскада крови и цитохромов Р450. С помощью SPR-технологии впервые показано прямое взаимодействие двух цитохромов Р450 (СУР2Е1 и СУР11В2) с тромбосансинтазой. Впервые показано, что аффинность образования комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1 пятикратно увеличивается в присутствии низкомолекулярного непептидного эндогенного биорегулятора изатина (2,3-диоксоиндола). Полученные результаты дают основание предполагать наличие у ТВХАС1 других функций, таких, как участие в функционировании цитоскелета и регуляции биосинтеза биологически активных молекул. ●

Работы по получению рекомбинантных белков выполнены в ИБОХ НАН Беларуси при поддержке БРФФИ (грант № X16P–062). Работы по молекулярному фишингу и идентификации потенциальных белков-партнеров тромбосансинтазы были выполнены в ИБМХ при поддержке РФФИ (грант № 16–54–00097 Бел_а), а работы по исследованию влияния изатина на ББВ с участием ТВХАС1 – при поддержке РНФ (грант № 16-14-10327). LC-MS/MS-идентификация белков выполнена в ЦКП «Протеом человека» при ИБМХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waterman M.R., Pikuleva I.A. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, Weinheim, Germany: Wiley-VCH., 2006. 716 p.
2. Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 8. P. 2994–2998.
3. Haurand M., Ullrich V. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 15059–15067.
4. Uchida K. // Trends Cardiovasc. Med. 1999. V. 9. № 5. P. 109–113.
5. Chaudhary A.K., Nokubo M., Reddy G.R., Yeola S.N., Morrow J.D., Blair I.A., Marnett L.J. // Science. 1994. V. 265. № 5178. P. 1580–1582.

6. Sadowitz P.D., Setty B.N., Stuart M. // Prostaglandins. 1987. V. 34. № 5. P. 749–763.
7. Ruf A., Mundkowski R., Siegle I., Hofmann U., Patscheke H., Meese C.O. // Br. J. Haematol. 1998. V. 101. № 1. P. 59–65.
8. Shen R.F., Tai H.H. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 25. P. 11592–11599.
9. Ullrich V., Nüsing R. // Stroke. 1990. V. 21. № 12 Suppl. P. IV 134–138.
10. Nüsing R., Sauter G., Fehr P., Dürmüller U., Kasper M., Gudat F., Ullrich V. // Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 1992. V. 421. № 3. P. 249–254.
11. Huang J.-S., Ramamurthy S.K., Lin X., Le Breton G.C. // Cell. Signal. 2004. V. 16. № 5. P. 521–533.

12. Ivanov A.S., Zgoda V.G., Archakov A.I. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2011. V. 37. № 1. P. 4–16.
13. Huttlin E.L., Ting L., Bruckner R.J., Gebreab F., Gygi M.P., Szpyt J., Tam S., Zarraga G., Colby G., Baltier K., et al. // *Cell.* 2015. V. 162. № 2. P. 425–440.
14. Nathan J.A., Kim H.T., Ting L., Gygi S.P., Goldberg A.L. // *EMBO J.* 2013. V. 32. № 4. P. 552–565.
15. Ershov P., Mezentsev Y., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., et al. // *Proteomics.* 2012. V. 12. № 22. P. 3295–3298.
16. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., et al. // *Proteomics.* 2014. V. 14. № 20. P. 2261–2274.
17. Ivanov A.S., Ershov P.V., Molnar A.A., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Medvedev A.E., Kozin S.A., et al. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2016. V. 42. № 1. P. 14–21.
18. Gillam E.M., Notley L.M., Cai H., De Voss J.J., Guengerich F.P. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. № 45. P. 13817–13824.
19. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. // *Biochem. Pharmacol.* 1996. V. 52. № 3. P. 385–391.
20. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. // *Stress.* 2005. V. 8. № 3. P. 175–183.
21. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. // *Biologics.* 2007. V. 1. № 2. P. 151–162.
22. Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K. // *Acta Pharm.* 2005. V. 55. № 1. P. 27–46.
23. Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 5. С. 520–531.
24. Дормешкин Д.О., Свирид А.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* 2015. Т. 59. № 2. С. 53–60.
25. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 359–362.
26. Loktev A.V., Zhang Q., Beck J.S., Searby C.C., Scheetz T.E., Bazan J.F., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Jackson P.K., Nachury M.V. // *Dev. Cell.* 2008. V. 15. № 6. P. 854–865.
27. Cerecedo D. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2013. V. 24. P. 798–808.
28. Mosavi L.K., Cammett T.J., Desrosiers D.C., Peng Z. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 6. P. 1435–1448.
29. Moussavi-Harami S.F., Annis D.S., Ma W., Berry S.M., Coughlin E.E., Strotman L.N., Maurer L.M., Westphall M.S., Coon J.J., Mosher D.F., et al. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 7. P. 3393–3404.
30. Pankov R., Yamada K.M. // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. Pt 20. P. 3861–3863.
31. Lu Y., Cederbaum A.I. // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 44. № 5. P. 723–738.
32. Arnold C., Konkel A., Fischer R., Schunck W.-H. // *Pharmacol. Rep.* 2010. V. 62. № 3. P. 536–547.
33. Davydov D.R., Davydova N.Y., Sineva E. V., Halpert J.R. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 6. P. 3850–3864.
34. Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S., et al. // *Chem. Phys. Lett.* 2014. V. 593. P. 40–44.
35. Bridges A., Gruenke L., Chang Y.T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 27. P. 17036–17049.
36. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10139–10143.
37. Lewis D.F., Hlavica P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1460. № 2–3. P. 353–374.
38. Fallo F., Pezzil V., Barzon L., Mulatero P., Veglio F., Sonino N., Mathis J. M. // *Eur. J. Endocrinol.* 2002. V. 147. P. 795–802.
39. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 11. С. 1584–1599.
40. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. // *Proteomics.* 2010. V. 10. № 1. P. 23–37.
41. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 16. № 1. P. 476–495.

УДК 577.212.3:575.113.12

YABBY3-ортологи дикорастущих видов томата: структура, полиморфизм и экспрессия

М. А. Филюшин^{1*}, М. А. Слугина^{1,2}, А. В. Щенникова¹, Е. З. Кочиева^{1,2}¹Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биотехнологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: michel7753@mail.ru

Поступила в редакцию 24.04.2017

Принята к печати 17.10.2017

РЕФЕРАТ Эволюция генов, кодирующих факторы транскрипции семейства YABBY, считается одной из основных причин возникновения плоского листа из радиально-симметричного стебля и многообразия форм гинцея. Показано, что гены YABBY определяют идентичность абаксиальной поверхности всех наземных латеральных органов семенных растений. В настоящей работе клонированы и охарактеризованы полно-размерные последовательности генов, ортологичных YABBY3, у 13 образцов дикорастущих и культивируемых видов томата, отличающихся морфофизиологическими характеристиками листьев, цветков и плодов. Сравнительный анализ выявил высокую гомологию этих последовательностей с известным геном YABBY3 томата (95–99%). Гены-ортологи имели идентичную экзон-интронную структуру и содержали участки, кодирующие консервативные домены HMG-YABBY и Cys2Cys2-цинкового пальца. В этих генах выявлены 317 переменных сайтов, при этом 8 из 24 экзонспецифичных SNP приводили к аминокислотным заменам. Сравнительный анализ экспрессии генов YABBY3 в вегетативных и репродуктивных органах одного красноплодного и трех зеленоплодных видов томата выявил некоторые межвидовые отличия в интенсивности экспрессии в листьях, бутонах и цветках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА YABBY3, полиморфизм, РВ-ПЦР, *Solanum* секция *Lycopersicon*, адаксиально-абаксиальная асимметрия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CRC – CRABS CLAW gene; INO – INNER NO OUTER gene; FIL – FILAMENTOUS FLOWER gene; РВ-ПЦР – ПЦР в реальном времени.

ВВЕДЕНИЕ

Все процессы роста и развития растений контролируются факторами транскрипции, эволюция которых является одной из основных причин морфологического многообразия в растительном царстве [1–4]. В то время как происхождение цветка и репродуктивных органов связывают с дубликацией и изменениями генов семейства MADS-факторов транскрипции [5, 6], возникновение плоского листа из радиально-симметричного стебля и разнообразие форм гинцея считают следствием эволюции генов, кодирующих факторы транскрипции семейства YABBY [7]. Присутствие этих генов у покрытосеменных и голосеменных растений и их отсутствие у мхов и плаунов [8–10] предполагает происхождение генов YABBY от одного или двух предшественников в последнем общем предке семенных растений [10–12]. Диверсификация генов YABBY привела к возникно-

ванию отдельных членов семейства с уникальными функциями в развитии листьев, плодolistиков и семязачатков [8, 11, 13, 14]. Среди них гены YABBY2 и YABBY5, которые предположительно участвовали в эволюционной диверсификации морфологии столбика и тычиночной нити [15, 16]. Другие гены YABBY-семейства, INNER NO OUTER (INO) и CRABS CLAW (CRC), возникали, по-видимому, параллельно эволюции плодolistика и семязачатка в процессе модификации листоподобного репродуктивного спорофилла [11, 17].

У двудольных и однодольных растений гены YABBY играют сходные роли в развитии листа и подобных ему органов, обуславливая их абаксиально-адаксиальную асимметрию, разрастание пластинки и определение границ листа [4, 10, 18]. Помимо этого, гены YABBY вовлечены в процессы образования таких органов цветка, как нектарники, плодolistики

и др. [19–21]. К настоящему времени механизм работы некоторых белков YABBY описан только у модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Так показано, что YABBY1 (или FILAMENTOUS FLOWER, FIL), YABBY3 и YABBY5 совместно с другими компонентами транскрипционного комплекса поддерживают идентичность клеток адаксиальной поверхности листа, а также участвуют в инициации эмбриональной апикальной меристемы побега и ее постэмбриональном поддержании [22]. В активации экспрессии некоторых генов YABBY в нектарниках и плодолистиках принимают участие белки семейства MADS совместно с другими факторами [23]. В свою очередь, YABBY1 вместе с другими транскрипционными факторами контролирует пространственную активность MADS-генов и таким образом участвует в инициации закладки цветковых органов в правильном месте и количестве, определяя судьбу соответствующих клеток [24–26].

Гены YABBY кодируют небольшие белки (180–250 а.о.), состоящие из двух консервативных доменов [27, 28]. В N-концевой части белка находится мотив цинкового пальца Cys2Cys2-типа, а на C-конце расположен домен YABBY.

Число генов YABBY в геномах растений варьирует. В геноме *A. thaliana* таких генов шесть, из которых четыре (YABBY1, YABBY2, YABBY3 и YABBY5) экспрессируются преимущественно в листьях и листовидных органах (семядоли, чашелистики, лепестки, тычинки и плодолистки), а два других (CRC и INO) – в отдельных репродуктивных органах цветка [10, 23, 27]. У риса *Oryza sativa* идентифицировано восемь генов, при этом у двух из них (*OsYABBY2* и *OsYABBY7*) выявлено по два транскрипта, обра-

зованных в результате альтернативного сплайсинга [29].

У томата овощного (*Solanum lycopersicum*), одной из основных овощных культур, идентифицировано девять генов семейства YABBY (YABBY1, YABBY2, YABBY3, YABBY5a, YABBY5b, CRCa, CRCb, FAS, INO) [30, 31]. *S. lycopersicum* вместе с 12 дикорастущими родственными видами составляют секцию Lycopersicon рода *Solanum* [32]. Виды томата сильно различаются по морфофизиологическим характеристикам, включая морфологию листа и цветка. В зависимости от строения репродуктивной системы виды томата делятся на само- и перекрестноопыляемые, при этом последние отличаются большим полиморфизмом, крупными цветками и выступающим рыльцем пестика [32]. Известно, что система репродукции, находящаяся в зависимости от морфофизиологии цветка, а также различия в структуре листа могут быть следствием различной активности факторов транскрипции YABBY [7]. В первую очередь, это касается белков группы YABBY1/YABBY3, которые экспрессируются практически во всех асимметричных наземных органах растения.

Идентификация генов, ортологичных YABBY3, у дикорастущих видов томатов и оценка их полиморфизма стали целью данной работы. К настоящему времени полные последовательности гена YABBY3 известны только у двух видов томатов – *S. lycopersicum* и *S. pennellii*, а паттерны экспрессии этого гена определены только у *S. lycopersicum* [31] и *S. pimpinellifolium* [30]. Поэтому полученные нами данные, основанные на анализе большего количества видов томата, дополняют знания о генах YABBY и их возможных функциях.

Таблица 1. Образцы культивируемых и дикорастущих видов томата, использованных в работе

Вид/подвид/сорт	Кат. № ВИР	Система скрещивания	Цвет зрелого плода
<i>S. cheesmaniae</i> (Riley) Fosberg	3969	Самоопыляемый	Красный
<i>S. galapagense</i> Darwin & Peralta	3970	Самоопыляемый	Красный
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>humboldtii</i> (Willd.) Dunal	2912	Самоопыляемый	Красный
<i>S. lycopersicum</i> L., cv. <i>Silvestre recordo</i>	1580	Самоопыляемый	Красный
<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i> (Lange) Brezhnev	1018	Самоопыляемый	Красный
<i>S. chmielewskii</i> (Rick, Kesicki, Fobes & Holle) Spooner, Anderson & Jansen	13725	Самоопыляемый	Зеленый
<i>S. neorickii</i> Spooner, Anderson & Jansen	5033	Самоопыляемый	Зеленый
<i>S. arcanum</i> Peralta	13958	Перекрестноопыляемый	Зеленый
<i>S. chilense</i> (Dunal) Reiche	4300	Перекрестноопыляемый	Зеленый
<i>S. corneliomulleri</i> Macbr.	4367	Перекрестноопыляемый	Зеленый
<i>S. habrochaites</i> Knapp & Spooner	13964	Перекрестноопыляемый	Зеленый
<i>S. peruvianum</i> L.	4361	Перекрестноопыляемый	Зеленый
<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (Dunal) Dunal	3966	Перекрестноопыляемый	Зеленый

Таблица 2. Характеристика экзон-интронной структуры гена YABBY3 у исследуемых образцов

Вид/подвид/сорт	Номер в NCBI	Экзон-интронная структура YABBY3												Общая длина, п.н.	МРНК, п.н.	Белок, а.о.	
		экзон I	интрон I	экзон II	интрон II	экзон III	интрон III	экзон IV	интрон IV	экзон V	интрон V	экзон VI	интрон VI				экзон VII
<i>S. cheesmaniae</i>	KY952537	102	546	150	223	127	314	49	374	76	425	75	180	72	2713	651	216
<i>S. galapagense</i>	KY952538	102	531	150	222	127	316	49	373	76	426	75	180	72	2699	651	216
<i>S. lycopersicum</i> cv. Heinz*	ID:101247051	102	536	150	222	127	316	49	373	76	426	75	179	72	2703	651	216
<i>S. lycopersicum</i> var. <i>humboldtii</i>	KY952544	102	538	150	221	127	313	49	373	76	427	75	180	72	2703	651	216
<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Silvestre recordo</i>	KY952543	102	537	150	222	127	316	49	372	76	426	75	180	72	2704	651	216
<i>S. pimpinellifolium</i> var. <i>racemigerum</i>	KY952549	102	537	150	222	127	316	49	373	76	426	75	180	72	2705	651	216
<i>S. chmielewskii</i>	KY952540	102	537	150	222	127	314	49	371	76	426	75	180	72	2701	651	216
<i>S. neorickii</i>	KY952545	102	469	153	218	127	313	49	376	76	426	75	166	72	2622	654	217
<i>S. arcanum</i>	KY952547	111	530	150	228	127	316	49	374	76	426	75	166	72	2700	660	219
<i>S. chilense</i>	KY952539	102	533	150	224	127	311	49	374	76	426	75	165	72	2684	651	216
<i>S. corneliomulleri</i>	KY952541	111	535	150	227	127	314	49	361	76	425	75	166	72	2688	660	219
<i>S. habrochaites</i>	KY952542	102	545	150	222	127	274	49	361	76	421	75	178	72	2652	651	216
<i>S. pennellii</i> *	ID:107026918	102	522	144	222	127	312	49	372	76	414	75	179	72	2666	645	214
<i>S. peruvianum</i>	KY952546	111	539	150	228	127	316	49	365	76	427	75	169	72	2704	660	219
<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>	KY952548	111	485	150	221	127	312	49	374	76	426	75	180	72	2658	660	219
<i>S. tuberosum</i> *	ID:102577797	114	552	147	271	127	314	49	398	76	417	75	175	72	2787	660	219
<i>A. thaliana</i> *	ID:827914	102	97	138	101	151	93	49	119	76	136	99	440	81	1682	696	231

*Последовательности из базы данных NCBI.

(род *Solanum* секция *Lycopersicon*). Сравнительный анализ этих последовательностей выявил их высокую гомологию (идентичность 95–99%) с известным геном *YABBY3* томата (ID: 101247051). Общая длина гена варьировала от 2622 п.н. у *S. neorickii* до 2713 п.н. у *S. cheesmaniae*. Гены состояли из семи экзонов и шести интронов (табл. 2) и содержали участки, кодирующие консервативные НМГ-подобный домен *YABBY* (125–176 а.о.) и домен цинкового пальца *Cys2Cys2*-типа (18–62 а.о.) (рис. 1).

Размер кДНК *YABBY3* в девяти анализируемых образцах, включая все красноплодные и три зеленоплодных (*S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. habrochaites*) вида, составил 651 п.н. (табл. 2). У *S. neorickii* размер кДНК составил 654 п.н., что обусловлено дубликацией ТСА во втором экзоне (вставка в аминокислотной последовательности N66_H67insH). У *S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum* и *S. peruvianum* var. *dentatum* – 660 п.н., благодаря вставке 9 п.н. в первом экзоне (P17_S18insPPP). У *S. pennellii*, который считается наиболее древним видом [32], размер кДНК 645 п.н. обусловлен делецией 6 п.н. во втором экзоне (H67del, H68del). В соответствии с этим длина аминокислотных последовательностей ортологов *YABBY3* составила 217 а.о. (*S. neorickii*), 219 а.о. (*S. arcanum*, *S. corneliomulleri*, *S. peruvianum* и *S. peruvianum* var. *dentatum*) и 216 а.о. (остальные образцы). Интересно, что из ранее описанных консервативных мотивов, характерных для белков *YABBY1/3*, у ортологов *YABBY3* видов рода *Solanum* присутствуют кладоспецифичные мотивы FIL-A, -D, -E, -F и -G, но отсутствуют FIL-B и -C, обычно локализованные в междоменной области [12] (рис. 1).

В сравнении с ранее охарактеризованным *YABBY3* сорта Heinz *S. lycopersicum* (ID: 101247051) в генах *YABBY3* исследуемых образцов выявлено 317 переменных сайтов, большей частью локализованных в интронах. В экзонах выявлены 24 замены, из которых восемь несинонимичные. Обнаруженные в кДНК замены локализуются преимущественно в последовательности, кодирующей междоменную область, и на 3'-конце. В области, кодирующей домен цинкового пальца, идентифицирована единственная замена – транзигция A59G у *S. galapagense*, которая приводит к замещению глутамина на аргинин Q20R (рис. 1). В последовательности, кодирующей *YABBY*-домен, выявлено пять нуклеотидных замен, из которых только транзигция A434G у *S. peruvianum* var. *dentatum* (3966) приводит к замещению глутаминовой кислоты на глицин E145G (рис. 1).

В белках *YABBY3* из 11 замещений аминокислотных остатков (рис. 1) четыре (S64C, Y76C, D116G, E145G) признаны радикальными (значения физико-химической дистанции по матрице Грэнтсема

Таблица 3. Результаты оценки статистической значимости различий в уровне экспрессии гена *YABBY3* в различных органах у каждого из четырех исследуемых видов томата

<i>S. lycopersicum</i> cv. <i>Silvestre recordo</i>			
	лист	бутон	цветок
Бутон	0.0012		
Цветок	0.6189	0.0007	
Плод	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>S. chmielewskii</i>			
	лист	бутон	цветок
Бутон	0.0242		
Цветок	0.1117	0.5025	
Плод	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<i>S. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>			
	лист	бутон	цветок
Бутон	<0.0001		
Цветок	0.1014	<0.0001	
Плод	<0.0001	0.3049	<0.0001
<i>S. habrochaites</i>			
	лист	бутон	цветок
Бутон	<0.0001		
Цветок	<0.0001	<0.0001	
Плод	<0.0001	<0.0001	<0.0001

*Значения *p*-value < 0.05 считаются значимыми и выделены жирным шрифтом.

< 57.9). В то же время оценка, проведенная в программе PROVEAN, обобщающей известные алгоритмы оценки аминокислотных замен и инделей, определила как радикальную только одну замену (E145G в *YABBY*-домене у *S. peruvianum* var. *dentatum*), тогда как остальные замены, делеции и вставки определены как нейтральные. Исследование влияния замен на функцию белков нуждается в дополнительном экспериментальном анализе.

Моделирование (Phyre2) трехмерной структуры ортологов *YABBY3* выявило неупорядоченную организацию более 60% последовательности, в то время как 29% было предсказано с достоверностью более 90% на основе известных структур белков, содержащих НМГ-домен (PDB: d1qrva, d1k99a и др.). Достоверно предсказанная последовательность представляла собой домен *YABBY*, гомологичный домену НМГ [10], состоящий из двух α -спиралей, соединенных петлей (helix-loop-helix) (рис. 2). НМГ-домен предположительно связывается с малой бороздкой ДНК и изгибает двойную спираль в этой точке [38].

Проведенный филогенетический анализ показал, что все известные гены семейства *YABBY* *S. lycopersicum* кластеризуются с соответствующи-

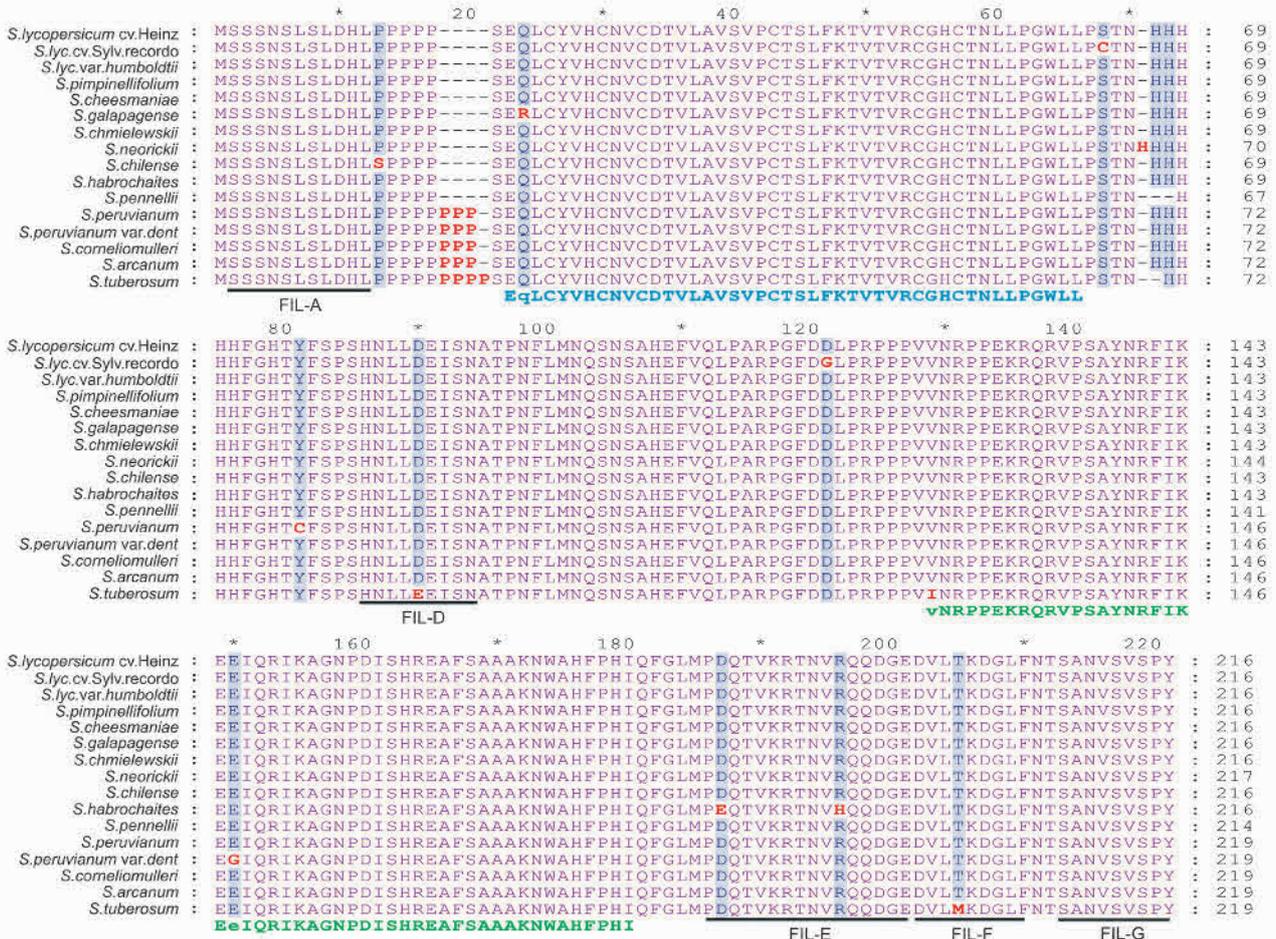


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей ортологов YABBY3 у образцов видов томата и картофеля (*S. tuberosum*). Домен цинкового пальца подписан синим шрифтом, домен YABBY – зеленым. Замены, делеции и вставки выделены красным. Консервативные мотивы, специфичные для клады YABBY1/YABBY3, подчеркнуты и подписаны

ми ортологами *A. thaliana* (рис. 3). На дендрограмме, построенной по кДНК, гены YABBY формировали четыре субкластера: YAB1/3 (гены YABBY1 и YABBY3); YAB2/5 (YABBY2, YABBY5 и FAS); CRC (гены CRC); INO (гены INO) (рис. 3А). Кластеры, образованные в результате анализа аминокислотных последовательностей (рис. 3Б), были аналогичны вышеописанным, за исключением YABBY2 и YABBY5, которые формировали отдельные субкластеры, что соответствует предложенному ранее разделению семейства YABBY на пять подсемейств [10, 23]. Филогенетический анализ, основанный на геномных последовательностях YABBY3, разделил анализируемые образцы видов томата на два кластера с ответвлением наиболее древнего вида *S. pennellii* и картофеля *S. tuberosum* (рис. 4). Результаты в целом находятся в согласии с разделе-

нием томатов как на зеленоплодные и красноплодные, так и на само- и перекрестноопыляемые виды. При этом два зеленоплодных самоопыляемых вида *S. chmielewskii* и *S. neorickii* попадают в противоположные кластеры, соответствуя, видимо, эволюционно-пограничной точке происхождения красноплодных самоопыляемых видов из зеленоплодных перекрестноопыляемых.

Данные экспрессии генов YABBY покрытосеменных предполагают, что гены YABBY1/3 сохранили древний паттерн экспрессии [12], транскрибируясь в абаксиальной части примордиев всех наземных боковых органов (за исключением семязачатков) [25, 41]. Это подтверждается и полученными данными, отражающими экспрессию гена YABBY3 в вегетативных и генеративных органах *S. chmielewskii*, *S. lycopersicum* cv. Silvestre recordo, *S. habrochaites*

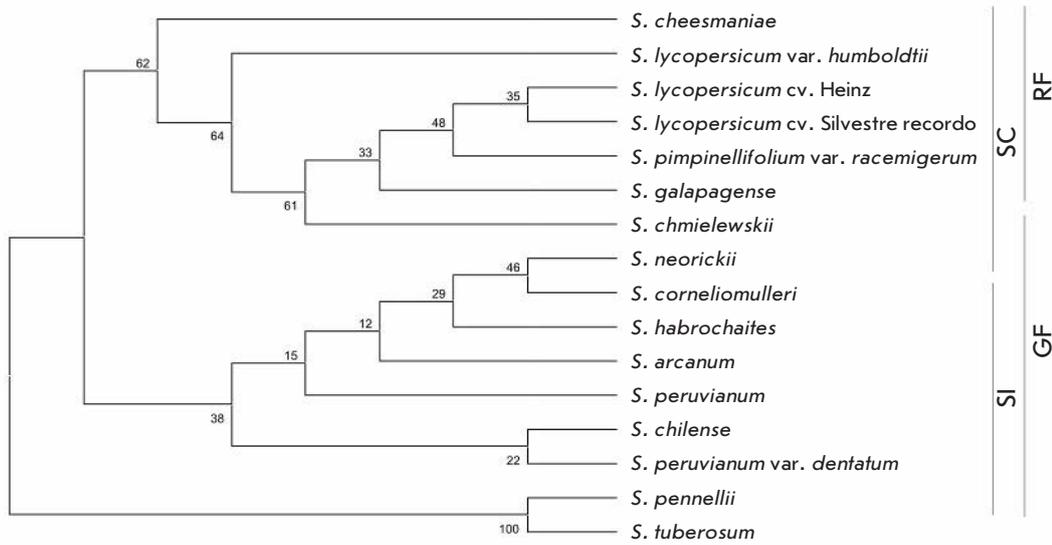


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основании геномных последовательностей YABBY3 образцов культивируемых и дикорастущих видов томата в сравнении с YABBY3 картофеля *S. tuberosum* (MEGA7.0, метод ML; модель НКУ + G+I). RF – красноплодные образцы; GF – зеленоплодные образцы; SC – самоопыляемые образцы; SI – перекрестноопыляемые образцы

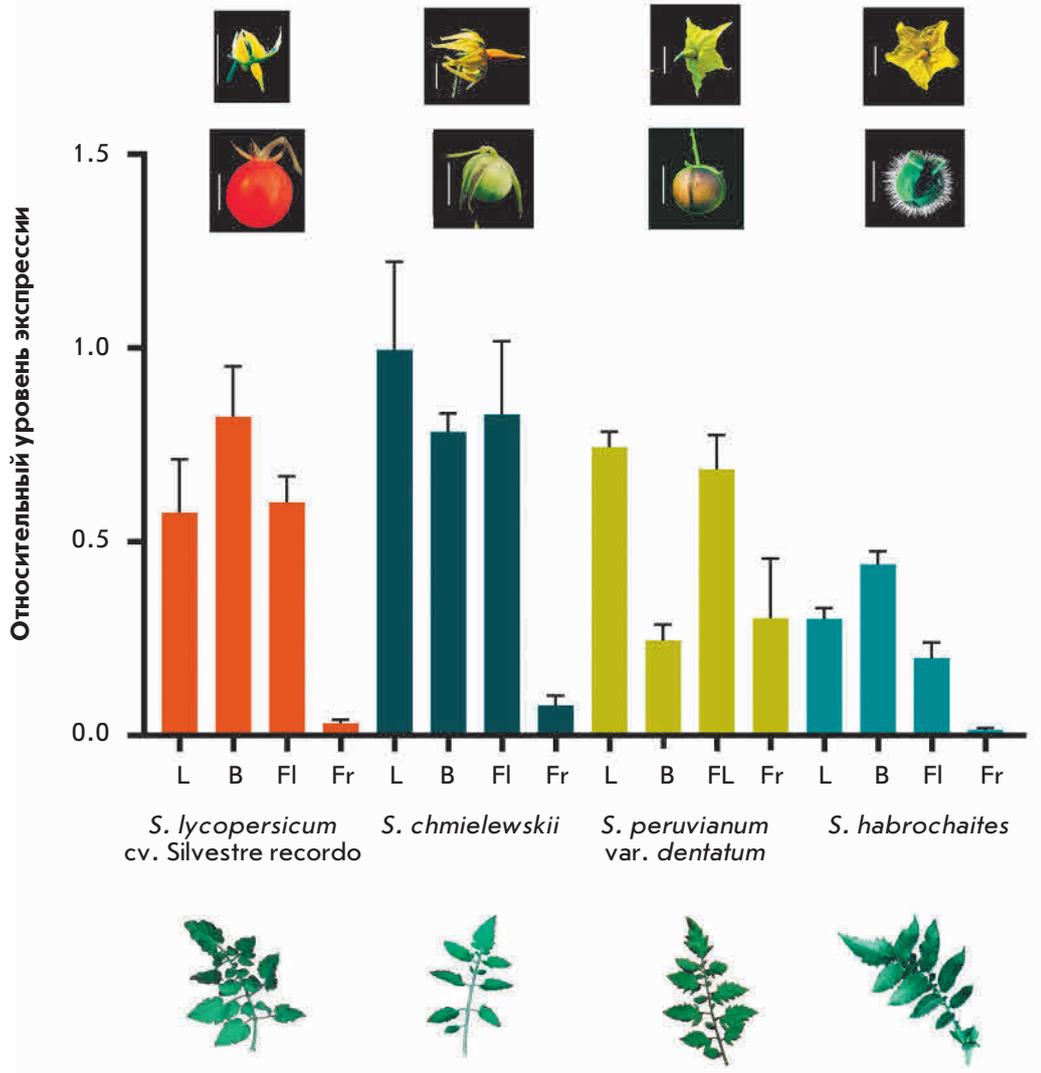


Рис. 5. Относительные уровни экспрессии гена YABBY3 в листьях (L), молодых бутонах (B), открытых цветках (FI) и зеленых незрелых плодах (Fr) четырех образцов томатов

и *S. peruvianum* var. *dentatum*. У *S. habrochaites* экспрессия гена в листьях несколько выше, чем в цветках, а у остальных трех видов отсутствуют статистически значимые различия в уровнях экспрессии в цветках и листьях (рис. 5, табл. 3). При этом у исследуемых видов, кроме *S. peruvianum* var. *dentatum*, ген *YABBY3* в плодах практически не экспрессируется (рис. 5). Данные четыре вида были выбраны для анализа экспрессии в силу их принадлежности к четырем эволюционно отдаленным друг от друга группам. *S. lycopersicum* является красноплодным, самоопыляемым видом относительно недавнего происхождения; *S. chmielewskii* – зеленоплодный, но самоопыляемый – на эволюционной лестнице стоит между красноплодными самоопыляемыми и зеленоплодными перекрестноопыляемыми видами; *S. peruvianum* – представитель зеленоплодных перекрестноопыляемых видов; и, наконец, *S. habrochaites* (зеленоплодный перекрестноопыляемый) считается одним из наиболее древних видов томата [32]. Паттерн экспрессии *YABBY3* *S. peruvianum* var. *dentatum* несколько отличался от паттерна у остальных анализируемых образцов, хотя причина низкого уровня экспрессии в бутоне не совсем ясна (рис. 5). У *S. habrochaites* динамика экспрессии аналогична динамике у *S. lycopersicum* и *S. chmielewskii*, однако уровень транскрипции во всех анализируемых органах почти в 2 раза ниже. В целом, выявленные паттерны экспрессии *YABBY3* у *S. lycopersicum*, *S. chmielewskii* и *S. habrochaites* совпадают с таковыми у *S. pimpinellifolium*, где максимальный уровень экспрессии *YABBY3* наблюдается в молодых бутонках и снижается по мере развития цветка и плода [30].

Показано, что у *A. thaliana* как конститутивная экспрессия гена *YABBY3*, так и ее выключение приводят к аномальному развитию листьев и цветков из-за потери полярной дифференцировки органов [18]. Вариабельность уровня экспрессии этого гена также может отражаться на строении и морфофизиологии органов, в частности, листьев, цветков и плодов анализируемых образцов томата. Значимый уровень экспрессии гена в плодах *S. peruvianum* var. *dentatum* может указывать на вероятное сохранение идентичности абаксиальной ткани в оболочке плода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе в 13 образцах культивируемых и дикорастущих видов томата идентифицированы гены, ортологичные *YABBY3*. Эти гены кодируют факторы транскрипции, которые играют одну из ключевых ролей в определении абаксиально-адаксиальной асимметрии всех наземных латеральных органов растения. Структура генов *YABBY3* и кодируемых ими белков сходна с ранее охарактеризованными членами семейства *YABBY*. Филогенетический и экспрессионный анализ подтвердил, что идентифицированные гены относятся к подсемейству *YABBY1/3* и, возможно, имеют консервативные функции в различных видах томата. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-16-10022 с использованием экспериментальной установки искусственного климата ЭУИК и ЦКП Биоинженерия (ФИЦ Биотехнологии РАН).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альберт Е.В., Ежова Т.А. // Генетика. 2013. Т. 49. № 2. С. 149–163.
2. Лутова Л.А., Додуева И.Е., Лебедева М.А., Творогова В.Е. // Генетика. 2015. Т. 51. № 5. С. 539–557.
3. Castrillo G., Turck F., Leveugle M., Lecharny A., Carbonero P., Coupland G., Paz-Ares J., Oñate-Sánchez L. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. e21524.
4. Yang C., Ma Y., Li J. // J. Exp. Bot. 2016. V. 67. № 18. P. 5545–5556.
5. Gramzow L., Ritz M.S., Theissen G. // Trends Genet. 2010. V. 26. № 4. P. 149–153.
6. Melzer R., Theissen G. // Methods Mol. Biol. 2011. V. 754. P. 3–18.
7. Sarojam R., Sapp P.J., Goldshmidt A., Efroni I., Floyd S.K., Eshed Y., Bowman J.L. // Plant Cell. 2010. V. 22. № 7. P. 2113–2130.
8. Floyd S.K., Bowman J.L. // Int. J. Plant Sci. 2007. V. 168. № 1. P. 1–35.
9. Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., et al. // Science. 2008. V. 319. № 5859. P. 64–69.
10. Finet C., Floyd S.K., Conway S.J., Zhong B., Scutt C.P., Bowman J.L. // Evol. Dev. 2016. V. 18. № 2. P. 116–126.
11. Yamada T., Yokota S., Hirayama Y., Imaichi R., Kato M., Gasser C.S. // Plant J. 2011. V. 67. № 1. P. 26–36.
12. Bartholmes C., Hidalgo O., Gleissberg S. // Plant Biol (Stuttg). 2012. V. 14. № 1. P. 11–23.
13. Meyerowitz E.M. // Cell. 1997. V. 88. № 3. P. 299–308.
14. Bowman J.L., Eshed Y., Baum S.F. // Trends Genet. 2002. V. 18. № 3. P. 134–141.
15. de Almeida A.M.R., Yockteng R., Schnable J., Alvarez-Buylla E.R., Freeling M., Specht C.D. // Sci. Rep. 2014. V. 4. Article number 6194.
16. Morioka K., Yockteng R., Almeida A.M., Specht C.D. // Front Plant Sci. 2015. V. 6. Article 1106.
17. Kelley D.R., Skinner D.J., Gasser C.S. // Plant J. 2009. V. 57. № 6. P. 1054–1064.
18. Siegfried K.R., Eshed Y., Baum S.F., Otsuga D., Drews G.N., Bowman J.L. // Development. 1999. № 126. P. 4117–4128.
19. Villanueva J.M., Broadhvest J., Hauser B.A., Meister R.J., Schneitz K., Gasser C.S. // Genes Dev. 1999. V. 13. № 23. P. 3160–3169.
20. Fourquin C., Vinauger-Douard M., Fogliani B., Dumas C.,

- Scutt C.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 12. P. 4649–4654.
21. Lee J.Y., Baum S.F., Alvarez J., Patel A., Chitwood D.H., Bowman J.L. // *Plant Cell*. 2005. V. 17. № 1. P. 25–36.
22. Stahle M.I., Kuehlich J., Staron L., von Arnim A.G., Golz J.F. // *Plant Cell*. 2009. V. 21. № 10. P. 3105–3118.
23. Lee J.Y., Baum S.F., Oh S.H., Jiang C.Z., Chen J.C., Bowman J.L. // *Development*. 2005. № 132. P. 5021–5032.
24. Sawa S., Ito T., Shimura Y., Okada K. // *Plant Cell*. 1999. V. 11. № 1. P. 69–86.
25. Sawa S., Watanabe K., Goto K., Kanaya E., Morita E.H., Okada K. // *Genes Dev*. 1999. V. 13. № 9. P. 1079–1088.
26. Chen Q., Atkinson A., Otsuga D., Christensen T., Reynolds L., Drews G.N. // *Development*. 1999. № 126. P. 2715–2726.
27. Bowman J.L. // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2000. V. 3. P. 17–22.
28. Kanaya E., Nakajima N., Okada K. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. № 14. P. 11957–11964.
29. Toriba T., Harada K., Takamura A., Nakamura H., Ichikawa H., Suzaki T., Hirano H.Y. // *Mol. Genet. Genomics*. 2007. V. 277. № 5. P. 457–468.
30. Huang Z., van Houten J., Gonzalez G., Xiao H., van der Knaap E. // *Mol. Genet. Genomics*. 2013. V. 288. № 3–4. P. 111–129.
31. Han H.Q., Liu Y., Jiang M.M., Ge H.Y., Chen H.Y. // *Genet. Mol. Res*. 2015. V. 14. № 2. P. 7079–7091.
32. Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S. // *Systematic Botany Monographs Am. Soc. Plant Taxonomists, USA*. 2008. V. 84. 186 p.
33. Kumar S., Stecher G., Tamura K. // *Mol. Biol. Evol*. 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
34. Grantham R. // *Science*. 1974. V. 185. P. 862–864.
35. Choi Y., Sims G.E., Murphy S., Miller J.R., Chan A.P. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. e46688.
36. Kelley L.A., Mezulis S., Yates C.M., Wass M.N., Sternberg M.J. // *Nat. Protoc*. 2015. V. 10. № 6. P. 845–858.
37. Expósito-Rodríguez M., Borges A.A., Borges-Pérez A., Pérez J.A. // *BMC Plant Biol*. 2008. V. 8. № 131. P. 1–12.
38. Bowman J.L., Smyth D.R. // *Development*. 1999. № 126. P. 2387–2396.
39. Hasegawa M., Kishino H., Yano T. // *J. Mol. Evol*. 1985. V. 22. № 2. P. 160–174.
40. Dayhoff M.O., Schwartz R.M., Orcutt B.C. // *Atlas Protein Sequence and Structure*. 1978. V. 5. P. 345–352.
41. Golz J.F., Roccaro M., Kuzoff R., Hudson A. // *Development*. 2004. № 131. P. 3661–3670.

УДК 612.816

CaMKII участвует в вызванном холином торможении секреции ацетилхолина в моторных синапсах мышцы

А. Е. Гайдуков*, О. П. Балезина

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

*E-mail: gaydukov@gmail.com

Поступило в редакцию 07.07.2016

Принято к печати 03.10.2017

РЕФЕРАТ Исследовали участие кальций-зависимых ферментов – протеинкиназы С (РКС) и кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы типа II (CaMKII) – в каскаде реакций, запускаемых воздействием на пресинаптические никотиновые холинорецепторы альфа7-типа экзогенного холина, вызывающего подавление вызванного выброса ацетилхолина (АХ) в моторных синапсах мышцы. В присутствии блокатора РКС хелеритрина вызванная секреция АХ не изменялась, и сохранялась способность холина тормозить вызванный выброс АХ. Блокатор CaMKII KN-62 не влиял на активность синапсов, но полностью предотвращал торможение секреции АХ, вызванное холином.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, нервно-мышечный синапс, никотиновые холинорецепторы альфа7-типа, холин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; альфа7-нХР – никотиновые холинорецепторы альфа7-типа; МПКП – миниатюрные потенциалы концевой пластинки; ПКП – потенциалы концевой пластинки; РКС – протеинкиназа С; CaMKII – кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II.

ВВЕДЕНИЕ

Холин образуется в холинергических синапсах в результате гидролиза медиатора ацетилхолина (АХ) с помощью фермента ацетилхолинэстеразы. Наряду с обратным захватом в нервную терминаль для восполнения там синтеза АХ, холин играет важную роль в ауторегуляции секреции АХ по механизму обратной связи. Этот механизм реализуется благодаря способности холина избирательно активировать пресинаптические никотиновые холинорецепторы альфа7-типа (альфа7-нХР) [1]. Эти рецепторы широко представлены в центральных и периферических синапсах и известны не только своей способностью пропускать внутрь ионы натрия и кальция при активации холином и другими агонистами, деполяризуя мембрану, но и запускать разнообразные внутриклеточные каскады с участием ферментов и каналов [2]. Кроме того, недавно в молекуле альфа7-нХР нашли аминокислотный кластер, обеспечивающий их функциональное взаимодействие с G-белками. Это расширяет возможность работы альфа7-нХР не только как быстро десенситизируемых ионотропных рецепторов, но и как особых метаболитных рецепторов, осуществляющих длительную сигнализацию, приводящую к долговременным эффектам [3]. Таким образом, неоднозначность последствий активации пре-

синаптических альфа7-нХР в разных типах синапсов представляет малоизученную и актуальную проблему. Недавно мы установили, что в нервно-мышечных синапсах мышцы холин (0.1 мМ) подавляет вызванный выброс АХ, и этот тормозной эффект сопровождается Ca^{2+} -зависимым выбросом депонированного Ca^{2+} через риаодиновые рецепторы и далее – активацией Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов SK-типа терминалей, что и приводит к торможению секреции АХ [4]. При этом оставалось не ясным, может ли в данном каскаде участвовать активность Ca^{2+} -зависимых ферментов, таких, как протеинкиназа С (РКС) и/или кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II (CaMKII). В связи с этим целью данной работы было тестирование изменений секреции АХ в моторных синапсах мышцы, вызываемых холином в сочетании с действием блокаторов кальмодулина и Ca^{2+} -зависимых ферментов – CaMKII и РКС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмальной мышцы (*m. diaphragma* – *n. phrenicus*) взрослых (P30) самцов мышей 129/Sv, полученных из Института нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН,

Москва, Россия. Всего было использовано 16 животных. Мышей умерщвляли посредством быстрого обезглавливания. Животных содержали в соответствии с Директивой 86/609/ЕЕС по обращению человека с лабораторными животными, протокол был одобрен комиссией по биоэтике биологического факультета МГУ. Все эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°C. Использовали стандартный, ранее описанный нами протокол приготовления рассеченного нервно-мышечного препарата левой полудиафрагмы с диафрагмальным нервом [4]. Миниатюрные потенциалы концевой пластинки (МПКП) и вызванные раздражением диафрагмального нерва многоквантовые потенциалы концевой пластинки (ПКП) регистрировали с помощью внутриклеточных стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.5 М КСl (сопротивление кончика микроэлектрода 15–20 МОм). Регистрации ПКП в каждом синапсе предшествовала регистрация МПКП в течение 100 с, затем стимулировали диафрагмальный нерв в режиме короткого ритмического залпа (50 стимулов длительностью 0.1 мс с частотой 50 Гц). Сигналы регистрировали с использованием усилителя Neuroprobe Amplifier Model 1600 (A-M Systems), сигналы на жесткий диск компьютера записывали с помощью аналого-цифрового преобразователя E-154 с интерфейсом PowerGraph (L-Card). Данные затем обрабатывали в программе MiniAnalysis (Synaptosoft). В контроле регистрировали МПКП и ПКП от пяти и более разных синапсов, после чего в перфузионный раствор в определенном порядке добавляли исследуемые вещества, далее регистрировали активность разных синапсов на протяжении 1–1.5 ч. В каждой серии экспериментов использовали не менее трех нервно-мышечных препаратов. В работе использовали холин, хелеритрин (Sigma, США), W-7, KN-62 (Enzo Life Sciences, США). Оценивали амплитуду, временной ход МПКП и ПКП, частоту МПКП и квантовый состав ПКП (его рассчитывали как отношение средней скорректированной на нелинейную сумму амплитуды ПКП [5] к средней амплитуде МПКП). Статистическую значимость различий между выборками оценивали по *t*-критерию Стьюдента и критерию Манна–Уитни. Уровень значимости отличий между двумя выборками составлял 0.05 (*n* – количество исследованных синапсов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Пресинаптическое действие холина, как и в предыдущей нашей работе [4], изучали при его концентрации 100 мкМ, близкой к имеющейся в синаптической щели при расщеплении АХ и незначительно превышающей EC_{50} для активации альфа7-нХР [6].

Холин не вызывал значимых изменений мембранного потенциала мышечных волокон, а также частоты генерации спонтанных МПКП. Средняя амплитуда МПКП на фоне действия холина (1.08 ± 0.09 мВ ($n = 17$)) также не изменялась значимо по сравнению с контролем (1.05 ± 0.08 мВ ($n = 15$), $p > 0.05$). При запуске коротких ритмических залпов (50 Гц, 1 с) наблюдали характерные изменения амплитуды и квантового состава ПКП по ходу залпа. Вслед за кратковременным облегчением передачи развивалась депрессия в виде снижения амплитуды ПКП по сравнению с первым в залпе, после чего амплитуда ПКП (и квантовый состав) устанавливается на постоянном сниженном уровне по сравнению с первым ПКП (рис. 1). При перерыве между залпами порядка 2 мин и более картина повторных залпов в отдельном синапсе или других тестируемых синапсах устойчиво воспроизводилась. Аппликация холина приводила к снижению амплитуды ПКП в залпе за счет снижения их квантового состава. Значения квантового состава ПКП под действием холина статистически значимо снижались по всему ходу залпа по сравнению с контролем до 64–71% ($p < 0.05$). При этом рисунок залпа в целом остался неизменным (рис. 1). Уменьшение амплитуды и квантового состава ПКП наблюдалось, начиная с 15–20 мин от начала воздействия холина, и сохранялось на сниженном уровне на протяжении всего времени аппликации холина (в течение 45–60 мин).

Эффекты блокатора РКС хелеритрина

Аппликация на мышцу блокатора РКС хелеритрина (4 мкМ) в течение 30–40 мин не вызывала значимых изменений характера залповой синаптической активности – ни квантовый состав ПКП по ходу залпа, ни сам рисунок залпа (начальное облегчение, последующая депрессия, фаза «плато») достоверно не изменялись под действием хелеритрина ($p > 0.05$). Более того, хелеритрин никак не повлиял и на тормозные эффекты холина в отношении квантового состава ПКП при залповой активности синапсов (рис. 2А). Отсюда следует, что и Ca^{2+} -сигналы, поступающие в терминаль при активации холином альфа7-нХР с последующим выбросом депонированного кальция, и возможная метаботропная сигнализация альфа7-нХР с участием G_q -белка, как показано на других объектах [3], не способны активировать РКС и вовлечь ее в торможение секреции АХ в моторных синапсах. Это согласуется с нашими и опубликованными данными, где показано, что в моторных терминалях активация РКС может запускаться входом кальция в терминаль через другие Ca^{2+} -входы, в частности, при работе Ca^{2+} -каналов L-типа, и соучаствовать в облегчении секреции АХ [7].

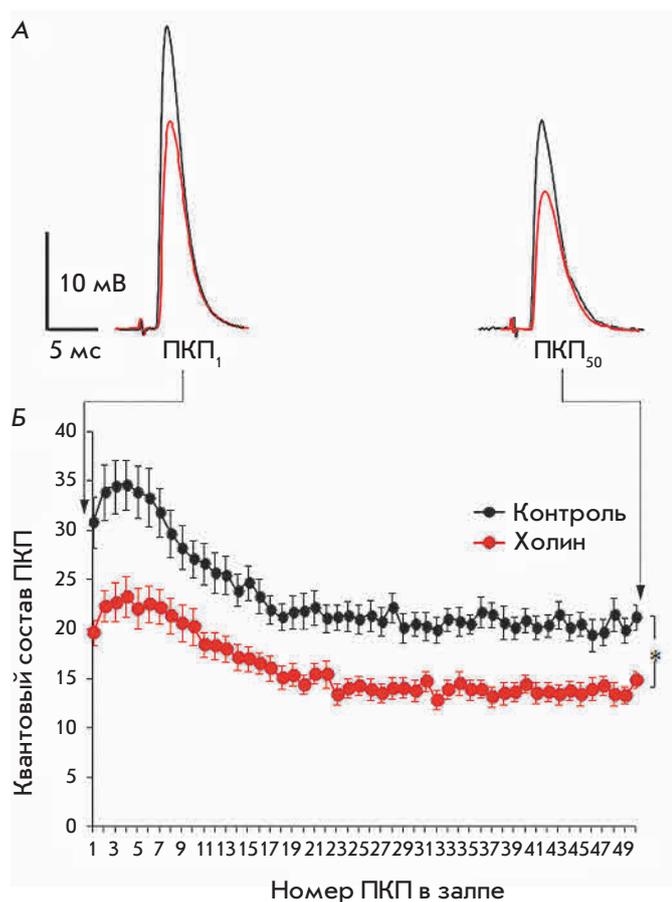


Рис. 1. Тормозное влияние экзогенного холина (100 мкМ) на вызванную секрецию АХ при ритмической активности синапсов с частотой 50 Гц (1 с). А – усредненные записи первых ПКП (ПКП₁) и последних ПКП (ПКП₅₀) в залпах – в контроле (черный) и в присутствии холина (красный). Б – изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа ПКП в контроле и в присутствии холина. По оси ординат – квантовый состав ПКП, по оси абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Эффекты блокатора кальмодулина W-7

Следующим шагом работы было исследование эффектов холина на фоне предварительного выключения регуляторной активности кальмодулина с помощью его ингибитора W-7 (10 мкМ). Блокатор кальмодулина не оказывал собственного действия на передачу и не влиял значимо на тормозной эффект холина в отношении вызванной секреции АХ, хотя тормозное действие холина в условиях ингибирования кальмодулина было менее выражено, чем при действии только холина (рис. 2Б).

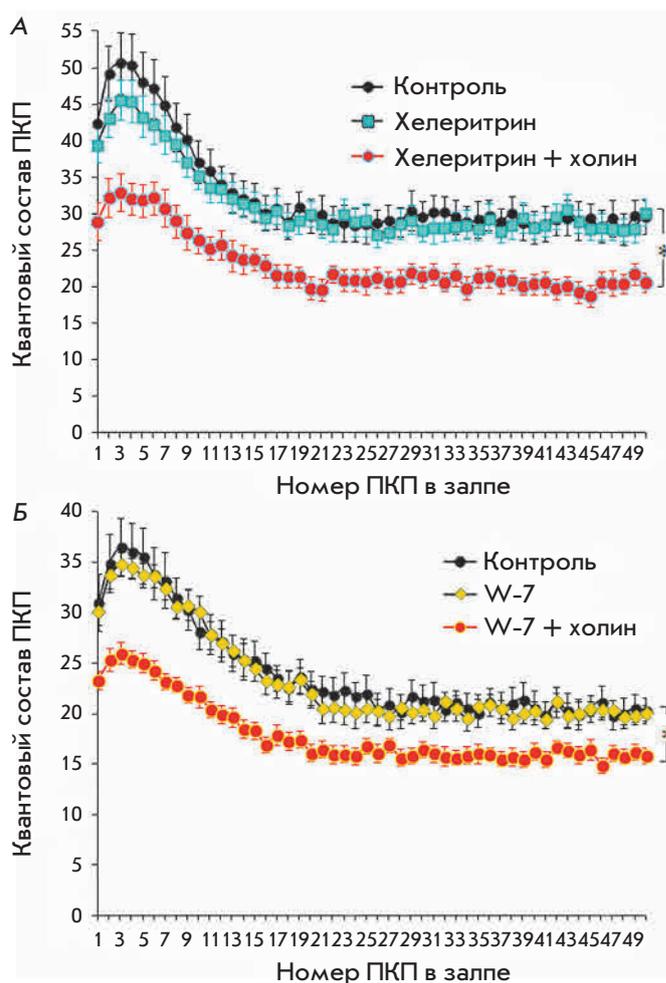


Рис. 2. Изменение квантового состава ПКП по ходу короткого ритмического залпа ПКП при ритмической активности синапсов с частотой 50 Гц. А – в контроле, в присутствии 4 мкМ хелеритрина и при действии 100 мкМ холина на фоне хелеритрина. Б – в контроле ($n = 17$), при действии 10 мкМ W-7 ($n = 15$) и под действием холина (100 мкМ) на фоне W-7 ($n = 18$). По осям ординат – квантовый состав ПКП, по осям абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем

Эффекты блокатора СаМКП KN-62

В последней серии изучали возможную активацию и участие собственно СаМКП в тормозных эффектах холина. Для этого использовали избирательный блокатор СаМКП – KN-62 (3 мкМ). При перфузии нервно-мышечного препарата раствором, содержащим KN-62, в течение 30–40 мин мы не обнаружили значимых сдвигов ни амплитуды МПКП, ни изменений квантового состава ПКП по ходу коротких залпов. Так, амплитуда МПКП в контроле составляет 0.91 ± 0.05 мВ ($n = 20$), при действии KN-62

0.85 ± 0.04 мВ ($n = 23$, $p > 0.05$), а на фоне холина в присутствии KN-62 – 0.83 ± 0.06 мВ ($n = 25$). Однако на фоне действия KN-62 на моторные синапсы аппликация холина не вызвала достоверного снижения амплитуды и квантового состава ПКП в залпе по сравнению с контролем (рис. 3).

Это показывает, что обнаруженное нами ранее подавление выброса АХ при действии холина на пресинаптические альфа7-нХР предполагает, наряду с другими процессами [4], активацию СаМКII и ее участие в торможении секреции медиатора.

В настоящее время в терминалях центральных и периферических синапсов выявлена активация пресинаптической СаМКII как за счет входов наружного [8], так и выброса внутриклеточного кальция [9], и возможность ее разнонаправленного влияния на секрецию медиаторов и комедиаторов [9, 10]. При активации альфа7-нХР эндогенным либо экзогенным холином в синапсах ЦНС наблюдается модуляция вызванного выброса медиатора. Недавно в синапсах гиппокампа описана генерация кальциевого сигнала при воздействии холина на пресинаптические альфа7-нХР, приводящая к возрастанию амплитуды возбуждающих постсинаптических потенциалов, однако эти эффекты не сопровождалась активацией СаМКII и сохранялись в присутствии блокатора KN-62 [11]. Ранее нами впервые было показано, что в периферических синапсах мышцы активация альфа7-нХР холином приводит к торможению вызванной секреции медиатора АХ, и это торможение можно полностью предотвратить блокированием рианодиновых рецепторов или SK-каналов [4]. Настоящая работа существенно дополняет эти представления. Оказалось, что в механизмах ауторегуляции секреции АХ с участием холина и альфа7-нХР участвует также и СаМКII. Выявленная нами вовлеченность СаМКII в ауторегуляцию секреции АХ позволяет добавить эту киназу к уже описанной совокупности ферментов, способных по-разному участвовать в передаче сигнала при активации альфа7-нХР в разных типах клеток [3, 11]. Таким образом, при исследовании роли альфа7-нХР в регуляции клеточных процессов необходимо учитывать возможность активации СаМКII.

До сих пор единственным примером участия СаМКII в работе нервно-мышечных синапсов грызунов была обнаруженная нами недавно активация

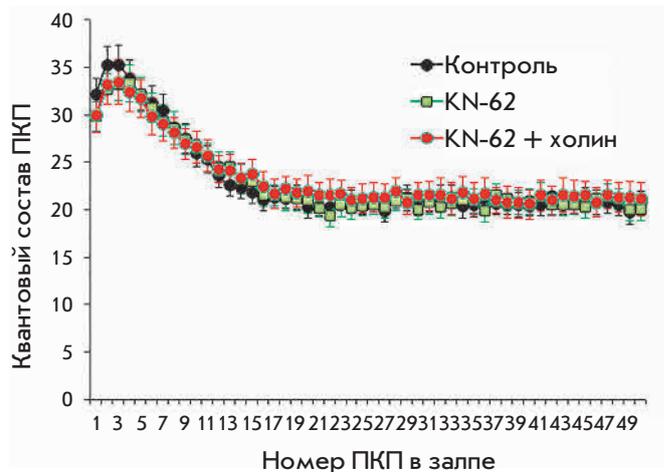


Рис. 3. Изменение квантового состава по ходу короткого ритмического залпа ПКП с частотой 50 Гц в контроле, при действии 3 мкМ KN-62 и под действием холина (100 мкМ) на фоне KN-62. По оси ординат – квантовый состав ПКП, по оси абсцисс – порядковый номер ПКП в коротком залпе

и вклад фермента в усиление секреции АХ при входе кальция по L-типу кальциевых каналов [12]. В данной работе впервые описан качественно отличный способ активации и участия СаМКII в работе терминалей, когда активация альфа7-нХР сопровождается вовлечением СаМКII в торможение секреции АХ. Роль популяции СаМКII, расположенной в непосредственной близости от альфа7-нХР и внутри-терминальных кальциевых депо, может заключаться в усилении и продлении обеспечиваемого работой рианодиновых рецепторов кальциевого сигнала, необходимого для активации калиевых каналов SK-типа.

Таким образом, в моторных нервных терминалях мышцы впервые выявлен каскад реакций, запускаемый действием холина на пресинаптические альфа7-нХР, приводящий к подавлению секреции АХ. Показано, что в этом каскаде задействованы не только выброс депонированного кальция и кальций-активируемые K^+ -каналы SK-типа, но и активность Ca^{2+} -зависимого фермента СаМКII. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 13-04-00413а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albuquerque E.X., Pereira E.F., Alkondon M., Rogers S.W. // *Physiol. Rev.* 2009. V. 89. № 1. P. 73–120.
2. Cheng Q., Yakel J.L. // *Biochem. Pharmacol.* 2015. V. 97. № 4. P. 439–444.

3. King J.R., Nordman J.C., Bridges S.P., Lin M.K., Kabbani N. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 33. P. 20060–20070.
4. Гайдуков А.Е., Богачева П.О., Тарасова Е.О., Балезина О.П. // *Acta Naturae.* 2014. Т. 6. № 4. С. 117–122.
5. McLachlan E.M., Martin A.R. // *J. Physiol.* 1981. V. 311. P. 307–324.

6. Papke R.L., Porter Papke J.K. // Br. J. Pharmacol. 2002. V. 137. № 1. P. 49–61.
7. Гайдуков А.Е., Марченкова А.А., Балезина О.П. // Бюл. эксп. биол. мед. 2012. Т. 153. № 4. С. 400–405.
8. Zhong C., Talmage D.A., Role L.W. // PLoS One. 2013. V. 8. № 12. e82719.
9. de Jong A.P., Verhage M. // Curr. Opin. Neurobiol. 2009 V. 19. № 3. P. 245–253.
10. Shakiryanova D., Klose M.K., Zhou Y., Gu T., Deitcher D.L., Atwood H.L., Hewes R.S., Levitan E.S. // J. Neurosci. 2007. V. 27. № 29. P. 7799–7806.
11. Cheng Q., Yakel J.L. // J. Neurosci. 2014. V. 34. № 1. P. 123–144.
12. Тарасова Е.О., Гайдуков А.Е., Балезина О.П. // Нейрохимия. 2015. Т. 32. № 2. С. 123–130.

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 (АТР, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, 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.