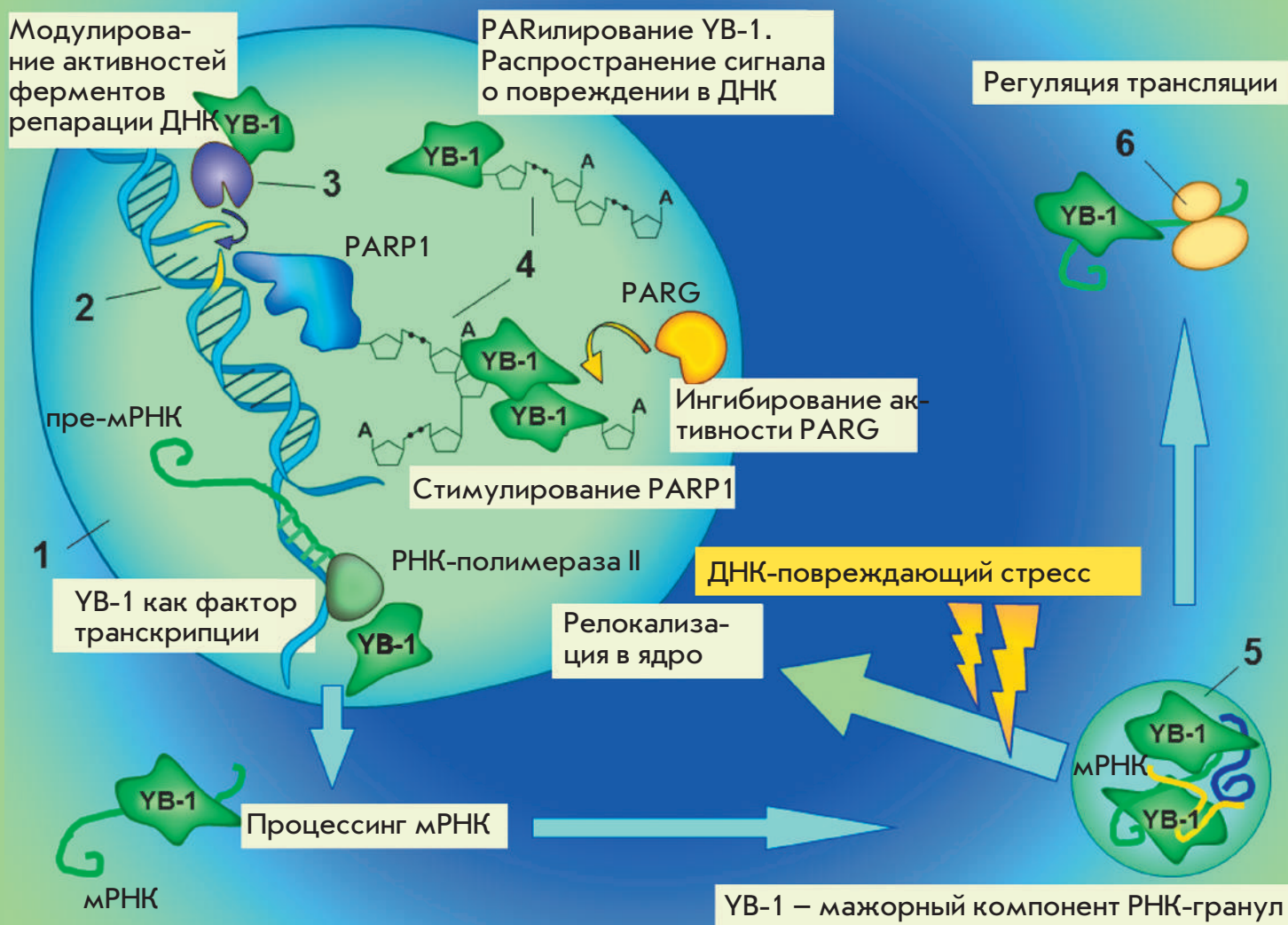


Acta Naturae

На стыке трех нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли(ADP-рибозы) в репарации ДНК



ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ:
ЗАГАДКА СУБСТРАТНОЙ
СПЕЦИФИЧНОСТИ
СТР. 18

БОЛЕЗНЬ ХАНТИНГТОНА: НАРУШЕНИЯ
КАЛЬЦИЕВОЙ СИГНАЛИЗАЦИИ И МОДЕЛИ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ РАЗВИТИЯ ПАТОЛОГИИ
СТР. 35

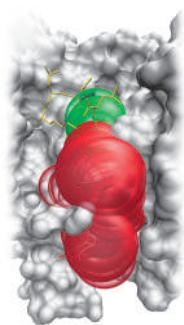
Белки с цинковыми пальцами типа C2H2 – самый многочисленный и наименее изученный класс транскрипционных факторов высших эукариот

А. А. Федотова, А. Н. Бончук, В. А. Могила, П. Г. Георгиев

В обзоре обобщены данные, которые касаются обширного класса белков, имеющих кластеры доменов цинковых пальцев C2H2-типа (C2H2-белки). Отличительными особенностями C2H2-белков являются специфичное и эффективное связывание с уникальными длинными последовательностями ДНК и быстрое распространение в процессе эволюции в пределах таксонов.



Модель специфичного связывания C2H2-доменов с ДНК



Субстратсвязывающая бороздка в модели Tdp1 человека

Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека

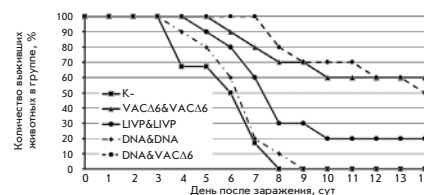
И. В. Гущина, Д. К. Нилов, А. Л. Захаренко, О. И. Лаврик, В. К. Швядас

Фермент репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является потенциальной молекулярной мишенью для противоопухолевой терапии. С использованием методов квантовой и молекулярной механики создана модель Tdp1 человека, учитывающая ионизационные состояния аминокислотных остатков активного центра и их взаимодействие с субстратом и конкурентными ингибиторами. При помощи разработанной молекулярной модели обнаружены новые ингибиторы Tdp1.

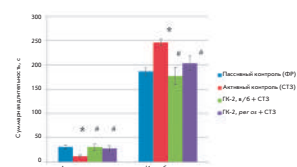
Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека

Р. А. Максютов, С. Н. Якубицкий, И. В. Колосова, С. Н. Щелкунов

Отсутствие у населения противооспенного иммунитета, участвовавшие случаи поражения человека ортопоксвирусами и увеличивающиеся риски применения вируса натуральной оспы в качестве агента биотерроризма требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций. Предложены схемы иммунизации, которые могут быть использованы для разработки стратегии безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.



Динамика гибели мышей, иммунизированных ДНК-вакциной, штаммами VACΔ6 и LVP VACV, после заражения ECTV



Показатели депрессивно-подобного состояния мышей C57Bl/6

Низкомолекулярный миметик NGF корригирует когнитивный дефицит и депрессивные проявления при экспериментальном диабете

Р. У. Островская, С. С. Ягубова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

Изучено действие соединения ГК-2, оригинального димерного аналога NGF, на мышей C57Bl/6 со стрептозотоциновым диабетом типа 2. Перспективность фармакологической разработки ГК-2 обусловлена сочетанием его антидиабетического эффекта с положительным воздействием на когнитивные функции и антидепрессивные свойства, а также сохранением активности при пероральном введении.

Acta Naturae

ТОМ 9, № 2 (33), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2017

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. Габитов, 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 (Компъень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректур: 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 24 июня 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

ОБЗОРЫ

Е. Э. Алемасова, О. И. Лаврик

**На стыке трех нуклеиновых кислот:
роль РНК-связывающих белков
и поли(ADP-рибозы) в репарации ДНК. 4**

И. В. Демидюк, К. Н. Чухонцева, С. В. Костров

**Глутамилэндопептидазы: загадка
субстратной специфичности 18**

Ю. А. Колобкова, В. А. Вигонт, А. В. Шалыгин,
Е. В. Казначеева

**Болезнь Хантингтона: нарушения кальциевой
сигнализации и модели для изучения
развития патологии 35**

А. А. Федотова, А. Н. Бончук, В. А. Могила,
П. Г. Георгиев

**Белки с цинковыми пальцами типа C2H2 —
самый многочисленный и наименее
изученный класс транскрипционных
факторов высших эукариот. 50**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. В. Гущина, Д. К. Нилов, А. Л. Захаренко,
О. И. Лаврик, В. К. Швядас

Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека 62

С. С. Ефимова, О. С. Остроумова

Дипольные модификаторы – регуляторы латеральной гетерогенности липидных мембран 70

А. М. Куджаев, А. Г. Андрианова, Е. С. Дубовцева,
О. В. Серова, Т. В. Ротанова

Роль инсерционного α -спирализованного домена АТР-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента 79

П. А. Левашов, Д. А. Матолыгина, Е. Д. Овчинникова,
Д. Л. Атрошенко, С. С. Савин, Н. Г. Белогурова,
С. А. Смирнов, В. И. Тишков, А. В. Левашов

Влияние различных эфффекторов на бактериолитическую активность интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца 87

Р. А. Максютлов, С. Н. Якубицкий, И. В. Колосова,
С. Н. Щелкунов

Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека 93

Р. У. Островская, С. С. Ягубова, Т. А. Гудашева,
С. Б. Середин

Низкомолекулярный миметик NGF корректирует когнитивный дефицит и депрессивные проявления при экспериментальном диабете 100

Правила для авторов 109

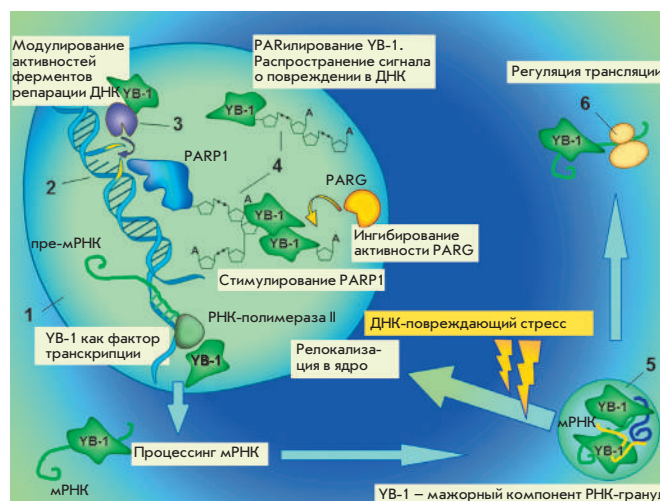


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Алемасовой и др.)

УДК 577.213.3

На стыке трех нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли(ADP-рибозы) в репарации ДНК

Е. Э. Алемасова¹, О. И. Лаврик^{1,2*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

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

Поступила в редакцию 14.09.2016

Принята к печати 19.01.2017

РЕФЕРАТ РНК-связывающие белки (РВР) регулируют метаболизм РНК на всех его этапах – от биосинтеза до деградации. Взаимодействуя с РНК, РВР участвуют также в поддержании стабильности генома на различных уровнях – от предотвращения повреждений в ДНК до посттранскрипционной координации экспрессии генов. Недавно было показано непосредственное участие РВР в репарации (исправлении повреждений) ДНК, что представляет особый интерес, поскольку в большинстве случаев этот процесс происходит без участия РНК. У высших организмов вблизи повреждения ДНК синтезируется РНК-подобный ядерный полимер – поли(ADP-рибоза) (РАР). Сходство с нуклеиновой кислотой позволяет РАР привлекать к месту повреждения ДНК- и РНК-связывающие белки. Предполагается, что поли(ADP-рибоза) и РВР способны не только модулировать активность ферментов репарации ДНК, но и играть важную структурную роль в создании временного «репарационного компартмента» в клетке. Сходный процесс «фильтрации» молекул происходит в цитоплазме при образовании ансамблей функционально связанных РНК и мультиспецифичных РВР. Главный компонент цитоплазматических РНК-ансамблей – Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) – является классическим РНК-связывающим белком, который рассматривается как неканонический фактор репарации ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА репарация ДНК, поли(ADP-рибоза), РНК-связывающие белки, функционально неупорядоченные белки, Y-бокс-связывающий белок 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BER – эксцизионная репарация оснований ДНК; IDP – функционально неупорядоченный белок; IDPR – функционально неупорядоченный участок белка; LCD – домен низкой сложности; PAR – поли(ADP-рибоза); PTM – посттрансляционная модификация белка; RBD – РНК-связывающий домен; RBP – РНК-связывающий белок; RNP – рибонуклеопротеиновый комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

ДНК, РНК и поли(ADP-рибоза) (PAR) – три важнейших нуклеиновых кислоты клетки, функционирование которых тесно сопряжено и осуществляется при участии специализированных белков-посредников. Некоторые из ДНК-, РНК- и PAR-связывающих белков способны взаимодействовать сразу с несколькими типами полимеров. Как правило, такие белки содержат функционально неупорядоченные элементы, позволяющие им подстраиваться под структуру определенного лиганда. В настоящем обзоре мы постарались обобщить современные представления о взаимосвязях трех нуклеиновых кислот, реализуемых с участием мультифункциональных белков клетки. В качестве одного из примеров таких белков рассмотрен Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1).

ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И РЕПАРАЦИИ ДНК

Сопряженность систем репарации ДНК и метаболизма РНК в клетке наглядно показывает процесс эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), поскольку многие участники этого пути исправления повреждений ДНК, включая белки APE1, SMUG1 и PARP1, вовлечены также в метаболизм РНК [1]. Очевидно, что транскрипционные факторы могут принимать опосредованное участие в репарации ДНК, контролируя экспрессию генов ферментов репарации [2]. Однако возможно и обратное: некоторые факторы репарации ДНК способны действовать как коактиваторы транскрипции [3]. Например, вовлеченная в BER тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) может стимулировать транскрипцию некоторых генов, привлекая коактиваторы [4]. Этот фермент осуществляет динамическое

деметилирование ДНК в промоторах молчащих генов и генов, включающихся на конкретном этапе развития, а также в энхансерах активных генов для быстрого транскрипционного ответа [5, 6].

Как правило, репарация и транскрипция ДНК не происходят одновременно, по крайней мере, это справедливо для постоянно экспрессируемых генов домашнего хозяйства. Некоторые объемные повреждения, блокируя движение РНК-полимеразы II, индуцируют систему эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) (этот путь репарации называется репарацией, сопряженной с транскрипцией, или TC-NER) [7]. Мутагенный потенциал других поврежденных ДНК минимизируется за счет ингибирования транскрипции вблизи повреждения – например, подавление экспрессии генов наблюдается в процессе репарации окислительных повреждений ДНК системой BER [8].

Для активации экспрессии генов, связанных с развитием, и генов, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием, напротив, требуется временное повреждение ДНК в промоторе, которое необходимо репарировать [3]. Важным механизмом регуляции экспрессии таких генов служат *паузы транскрипции*, вызванные остановкой РНК-полимеразы II в проксимальной области промотора [9]. При этом происходит инициация транскрипции, но элонгация останавливается на ранних этапах [10]. Для снятия «паузирования» РНК-полимеразы и элонгации транскрипции служат белки репарации ДНК и факторы ремоделирования хроматина. Например, эстрогеновый рецептор активизирует лизин-специфичную деметилазу 1 (LSD1), деметилирующую гистон H3. В ходе этого окислительного процесса образуется пероксид водорода, превращающий близко расположенные гуанины в ДНК в 8-оксогуанин (8-охоG) [11]. При репарации 8-охоG ДНК-гликозилазами формируются одноцепочечные разрывы ДНК, на которых начинают действовать ДНК-эндонуклеазы, в том числе топоизомераза ТороIIβ [12]. При экспрессии протяженных генов ТороII вносит разрывы в молекулу ДНК не только в промоторах, но и в кодирующих участках генов, поддерживая элонгацию транскрипции [13]. Показано, что ингибирование топоизомераз снижает экспрессию протяженных генов у дрожжей [14, 15]. Считается, что образующиеся двухцепочечные разрывы релаксируют ДНК и способствуют привлечению сенсоров повреждений и факторов репарации (таких, как PARP1 и ДНК-протеинкиназы), что приводит к формированию оптимальной для активации транскрипции архитектуры хроматина [12]. Так, у человека разрывы ДНК и соответствующая им передача сигнала о повреждении ДНК необходимы

для снятия паузы для РНК-полимеразы II с последующей элонгацией транскрипции генов, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием [16]. Среди факторов ремоделирования хроматина, регулирующих паузы РНК-полимеразы II, идентифицирован фермент поли(ADP-рибозо) (PAR) полимеразы 1 (PARP1). Считается, что PARP1 способствует элонгации транскрипции за счет PAR-опосредованной разборки нуклеосом [17]. Однако индуцируемый разрывами ДНК процесс поли(ADP-рибоз)илирования вблизи промоторов генов необходим, вероятно, также для привлечения РНК-связывающих белков, важных для посадки РНК-полимеразы II.

Интересно, что для активации репарации может использоваться образование *РНК-транскрипта в сайте повреждения ДНК*. Показано, что спонтанно возникающие двухцепочечные разрывы ДНК индуцируют эктопическую транскрипцию, в результате которой синтезируются короткие некодирующие РНК (DSB-induced small RNAs, diRNAs) размером ~21 нуклеотид [18]. Предполагается, что diRNAs привлекают ферменты репарации двухцепочечных разрывов ДНК к сайтам повреждений, тем самым способствуя репарации [18]. Более того, недавно появились данные, указывающие на возможность *поли(ADP-рибоз)илирования* ферментами PARP1 и PARP2 *концов разрывов ДНК* [19]. Не исключено, что этот процесс может вносить вклад как в ремоделирование хроматина, так и в репарацию ДНК [19].

Наконец, некоторые факторы транскрипции способны напрямую участвовать в репарации ДНК [20]. Предполагается, что в основе этого феномена лежит способность факторов транскрипции индуцировать локальную перестройку хроматина, стимулируя репарацию вблизи распознаваемых ими последовательностей в ДНК [21].

Таким образом, факторы транскрипции способны обеспечивать дополнительный уровень стабильности генома. В разных тканях организма преобладают разные источники повреждений ДНК: высокий уровень метаболизма кислорода в нейронах приводит к образованию большого количества окислительных повреждений в ДНК, в то время как в клетках кожи повышен уровень повреждений ДНК, индуцированных УФ-светом [20]. Поскольку факторы транскрипции регулируются внеклеточными воздействиями и стресс-зависимыми сигнальными системами, они могут способствовать дополнительной защите ДНК клеток определенного типа [20]. В клетках, ввиду гетерогенности репарации в геноме (существует градиент эффективности репарации транскрибируемой цепи ДНК, при этом репарация вблизи 5'-конца идет быстрее, а к 3'-концу замедляется), факторы транскрипции способны обеспечивать дополнительный

уровень защиты целостности ДНК ключевых промоторных и энхансерных элементов регулируемых ими генов [22].

«РНК-ОПЕРОНЫ» ЭУКАРИОТ

В 1961 г. Ф. Жакоб и Ж. Моно предложили модель оперона, согласно которой в геноме бактерий гены функционально взаимосвязанных структурных белков расположены последовательно в одном участке ДНК. Согласованная экспрессия этих генов приводит к синтезу полицистронной мРНК, при трансляции которой все компоненты мультибелкового ансамбля образуются одновременно и в непосредственной близости друг от друга, что способствует быстрой сборке функциональных структур. Позже анализ рибосомного профиля экспрессии генов в геноме *Escherichia coli* подтвердил эту гипотезу, показав, что компоненты функциональных ансамблей синтезируются в точном соотношении согласно стехиометрии финального комплекса [23].

В геномах эукариот ДНК-опероны встречаются редко, и мРНК по большей части моноцистронны. Отказ от ДНК-оперонов у высших организмов может быть связан как с полярным эффектом нонсенс-мутаций, так и со сложностью регуляции синтеза multifункциональных белков, содержание которых в протеомах эукариот значительно выше, чем у прокариот [24]. Поэтому координация экспрессии генов у эукариот частично осуществляется на посттранскрипционном уровне, когда мРНК, кодирующие функционально сопряженные белки, объединяются в РНК-опероны (рис. 1), тем самым приобретая схожую организацию и направленность [25]. Главной структурно-функциональной единицей этого процесса являются многочисленные РНК-связывающие белки (RBP), которые распознают мотивы РНК и формируют рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы [26]. RNP-комплексы являются структурным выражением РНК-оперонов, позволяя функционально сопряженным белкам, кодируемым разными мРНК, транслироваться синхронно в пределах одного цитоплазматического локуса [27]. Функционирование RNP-комплексов как независимых от окружения динамических компартментов клетки обеспечивается по механизму так называемого «разделения жидкостей» (*liquid demixing*) [28–37], ключевую роль в которых играют неупорядоченные последовательности РНК-связывающих белков.

НОВЫЕ ФУНКЦИИ РНК-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ В ОТВЕТЕ КЛЕТКИ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК

В современных работах РНК-связывающие белки рассматриваются как важнейшие участники поддержания стабильности генома [38].

Наличие в ДНК повреждений приводит к подавлению экспрессии генов на разных уровнях. На самом первом уровне происходят ингибирование транскрипции и репрессия процессинга 3'-концов пре-мРНК [39, 40]. Далее снижение экспрессии функциональных продуктов многих генов осуществляется в результате переключения альтернативного сплайсинга пре-мРНК этих генов на варианты, содержащие преждевременные стоп-кодоны, и следовательно, подверженные нонсенс-опосредованной деградации мРНК [41, 42]. Наконец, повреждение ДНК приводит к уменьшению стабильности многих мРНК [43] и ингибированию трансляции [44, 45].

Однако, несмотря на общее снижение уровня экспрессии, существуют специальные механизмы, обеспечивающие достаточную экспрессию генов, продукты которых вовлечены в ответ клетки на повреждение ДНК. Так, репрессия трансляции при повреждении ДНК может не распространяться на мРНК, кодирующие белки-участники ответа на повреждение [46]. В соответствии с моделью РНК-оперонов мРНК, которые кодируют функционально связанные белки, регулируются сопряженно на посттранскрипционном уровне. Таким образом, отдельно взятый RBP может контролировать экспрессию целого ряда генов ответа на повреждение ДНК, как это происходит с белком HuR [47–49].

РНК-связывающие белки могут регулировать транскрипцию и ремоделирование хроматина и способны напрямую участвовать в репарации ДНК [50, 51]. При этом RBP локализуются вблизи сайтов повреждений ДНК [52–54], что может быть опосредовано их связыванием с короткими некодирующими РНК (ncРНК), которые синтезируются на повреждениях [18, 50, 55], или осуществляться по механизму, независимому от РНК.

Транскрипция генов с высоким уровнем экспрессии или очень протяженных иногда продолжается в S-фазе клеточного цикла [56], при этом могут формироваться РНК-ДНК-гибриды (R-петли), которые служат причиной большого количества повреждений ДНК эндогенной природы [57]. Образование R-петель предотвращается, в первую очередь, благодаря упаковке РНК-связывающими белками пре-мРНК в процессе ее синтеза [58, 59].

Важнейшую роль в ответе клетки на повреждение ДНК играет передача сигнала посредством посттрансляционных модификаций (PTM) белков. RBP представляют основную категорию белков, фосфорилирование [60, 61] и поли(ADP-рибоз)илирование [62] которых регулируются повреждением ДНК. Генотоксический стресс приводит также к повышению уровня ацетилирования некоторых РНК-связывающих белков [63].

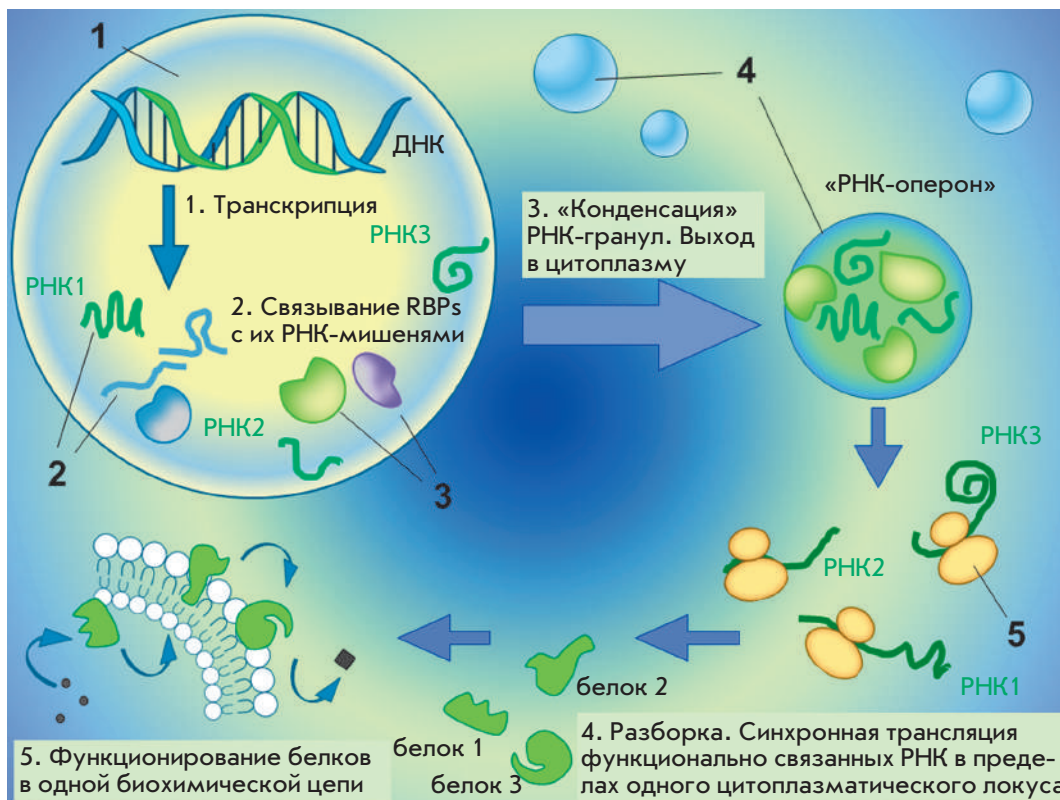


Рис. 1. «РНК-опероны» эукариотических клеток (схема). 1 – ядро клетки; 2 – пре-мРНК; 3 – РНК-связывающие белки; 4 – цитоплазматические RNP-гранулы («РНК-опероны»); 5 – рибосома. Схема иллюстрирует формирование и функционирование цитоплазматических комплексов функционально связанных мРНК и RBP («РНК-оперонов»), обеспечивающие локализованную в месте и времени трансляцию белковых компонентов надмолекулярных ансамблей

Наконец, повреждение ДНК индуцирует внутриклеточную релокализацию РНК-связывающих белков из цитоплазмы в ядро и наоборот [64, 65], что может быть важным для координации регуляции метаболизма РНК и репарации ДНК мультифункциональными RBP.

РНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ: МОДУЛЬНОЕ СТРОЕНИЕ

Большая часть РНК-клетки ассоциирована с РНК-связывающими белками в форме RNP-комплексов, нарушения в формировании которых приводят к различным заболеваниям [66, 67]. Взаимодействие с RBP необходимо для регуляции метаболизма РНК на всех этапах – от биогенеза до деградации, и РНК-связывающие белки выполняют ключевые функции в таких процессах, как сплайсинг пре-мРНК [68], полиаденилирование [69], экспорт в цитоплазму и трансляция. Также RBP участвуют в процессинге некодирующих РНК – микроРНК (miРНК), циклических РНК (circРНК), длинных некодирующих РНК (lncРНК) [70–72]. Таким образом, РНК-связывающие белки являются важнейшими посттранскрипционными регуляторами генов.

На настоящий момент идентифицировано порядка 1500 RBP [73, 74]. Большинство из них имеют модульное строение, при котором разнообразие распозна-

емых последовательностей РНК достигается за счет различных комбинаций всего нескольких основных РНК-связывающих доменов (RBD) [75]. Отдельные RBD связывают, как правило, короткие последовательности и обладают слабым сродством к РНК, однако, организация поверхности взаимодействия из множества модулей позволяет достичь высокой аффинности и специфичности к РНК-мишени. Использование суперпозиции из слабых взаимодействий делает более простой регуляцию сборки и разборки RNP-комплексов, которая может осуществляться посредством РНК-подобного полимера поли(ADP-рибозы) [76, 77]. Причем, благодаря модульной структуре РНК-связывающих белков, становится возможным распознавание последовательностей, принадлежащих разным молекулам РНК [75]. Замечательный пример достижения специфичного связывания с мишенью за счет тандемных RBD представляют белки семейства Pumilio (Puf), у которых боковые радикалы трех аминокислотных остатков каждого из восьми доменов образуют контакты с отдельным основанием РНК [78]. Этот «код» распознавания РНК может быть использован для конструирования белков, обладающих нужной специфичностью [79]. RBD, например, РНК-распознающий мотив (RRM), в некоторых случаях могут служить для взаимодействия РНК-связывающего белка с другими белками [80].

Недавно было обнаружено, что, помимо классических RBD, важнейшую роль в распознавании РНК-белками играют неупорядоченные последовательности (IDPR), которых в РНК-связывающих белках существенно больше, чем в среднем по протеому [81]. Так, около 20% белков млекопитающих, идентифицированных как RBP, неупорядочены более чем на 80% [82]. Как и классические RBD, участки с неупорядоченной структурой в РНК-связывающих белках организованы в виде модулей, повторяющихся неслучайным образом в пределах аминокислотной последовательности, и в некоторых случаях могут комбинироваться с глобулярными доменами [82]. Следует отметить, что возникновение неупорядоченных последовательностей в RBP коррелирует с повышением сложности транскрипта в эволюции [83].

«ТАНЦУЮЩИЕ» БЕЛКИ, ХАМЕЛЕОНЫ, 4D И «БЕЛКОВЫЕ ОБЛАКА»

Эти термины [84–87], появившиеся, чтобы охарактеризовать биологически активные белки, не имеющие определенной 3D-структуры, отражают основные особенности функционально неупорядоченных белков (*intrinsically disordered proteins*, IDP) и частей белков (*intrinsically disordered protein regions*, IDPR) – их высокую пластичность и динамику [88]. Поскольку 3D-структура белка формируется за счет различных нековалентных взаимодействий – водородных связей, гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и др., функциональная неупорядоченность IDP, как и уникальная структура глобулярных белков, закодирована в их аминокислотной последовательности. Наличие большого числа некомпенсированных заряженных групп в совокупности с пониженным содержанием гидрофобных аминокислотных остатков, как правило, приводит к отсутствию стабильной структуры белка в физиологических условиях [89]. В частности, в первичной структуре IDP и IDPR преобладают остатки Pro, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys и Ala и уменьшено количество Cys, Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val и Asn [90].

Функционально неупорядоченные белки частично приобретают определенную 3D-структуру при изменении условий среды или при связывании с лигандом [91]. Так, их фолдингу способствуют: повышение температуры, усиливающее гидрофобные взаимодействия [92]; изменение pH, уменьшающее суммарный заряд белка [92]; а также наличие ионов, нейтрализующих электростатическое отталкивание между кластерами одноименно заряженных аминокислотных остатков [93, 94]. Внутри клетки функционально неупорядоченные белки приобретают определенную структуру при связывании со специфичными мишенями и лигандами – небольшими молекулами,

кофакторами, другими белками, нуклеиновыми кислотами, мембранами и т.д. [91, 95].

Функции многих белков, особенно IDP, модулируются посредством посттрансляционных модификаций (PTM), разнообразие которых в физиологических условиях достигает 300 [96]. При том, что ДНК кодирует всего 20 аминокислот, разнообразие аминокислотных остатков в белках, благодаря PTM, превышает 140 [97]. Модификация белков посредством PTM осуществляется преимущественно в неупорядоченных участках последовательности [98, 99].

IDP и белки, содержащие IDPR, по-видимому, играют центральную роль в интерактомах [100]. Так, у высших эукариот около 30–40% белков содержат протяженные IDPR [101], причем неупорядоченные белки выполняют ключевые функции в транскрипции и клеточных сигнальных каскадах [102]. В 2005 г. впервые предположили, что *хабы* (узловые белки интерактомов) могут быть обогащены IDPR [103]. Многочисленные исследования позволили разделить хабы на две основные категории – стабильные и временные [104, 105], первые из которых формируют *модули* – функциональные комплексы с высокой степенью взаимосвязанности белковых компонентов (например, система инициации транскрипции), а вторые обеспечивают взаимодействия модулей между собой [106]. Оказалось, что IDPR широко представлены только во второй категории хабов [107], следовательно, роль функционально неупорядоченных белков в интерактоме заключается именно в координации различных клеточных процессов [100].

В клетке существует множество способов функционирования неупорядоченных белков. IDPR вовлечены в автоингибирование ферментов, при этом переход между упорядоченным и неупорядоченным состоянием отдельных доменов белка действует как переключатель, активируя или ингибируя фермент [108]. Такой механизм, в частности, используется в репарации ДНК для активации фермента PARP1 и передачи сигнала о повреждении в ДНК [109]. Другим интересным примером использования IDPR служит вовлечение IDPR-содержащих белков в системы контроля качества белков, при этом переход белковых шаперонов от упорядоченного к неупорядоченному состоянию является стресс-индуцируемым [110]. Считается, что IDP способны действовать как «молекулярные щиты», стерически ингибируя образование агрегатов других неупорядоченных белков в условиях стресса [111]. Функционально неупорядоченные элементы в белках (IDPR) также используются для регуляции тканеспецифичных сетей взаимодействий белков на уровне транскрипции. В работах Buljan и соавт. [112] и Ellis и соавт. [113] показано, что высо-



Рис. 2. Фазовые переходы биомолекул. 1 – функциональные немембранные органеллы; 2 – патологические амилоидные агрегаты белков. Биомолекулы претерпевают фазовые переходы подобно воде. В состоянии «газа» биомолекулы распределены в плазме клетки, не взаимодействуя друг с другом. При повышении локальной концентрации мультивалентных и функционально неупорядоченных белков происходит «расслоение» (*liquid demixing*) внутриклеточной плазмы с формированием немембранной органеллы, по поведению сходной с каплей жидкости [30–32]. Функционирование динамической немембранной органеллы реализуется за счет множественных слабых взаимодействий образующих ее биомолекул. Стабилизация связей биомолекул с переходом в «твердую фазу» приводит к формированию нефункциональных амилоидных агрегатов белков и может наблюдаться при патологических состояниях, таких, как болезнь Альцгеймера [35]

кое содержание IDPR в белках обусловлено тканеспецифичными экзонами, остающимися после альтернативного сплайсинга [112]. Аналогично, тканеспецифичные экзоны кодируют существенную часть белковых сегментов, содержащих сайты РТМ, и мотивы, служащие для связывания белков-партнеров [112]. Интересно, что белки, транслируемые с мРНК, обогащенных тканеспецифичными экзонами, занимают центральные позиции в интерактомах, взаимодействуя с различными партнерами в соответствующих тканях [112].

Наличие неконсервативных IDPR в структуре ранних ферментов эксцизионной репарации ДНК млекопитающих является уникальной особенностью, отсутствующей у их гомологов из низших организмов [114]. IDPR ферментов репарации вовлечены в распознавание повреждений ДНК, взаимодействие с белковыми партнерами; они действуют как преимущественные акцепторы РТМ, регулируя стабильность, ферментативную и ДНК-связывающую активности, внутриклеточную локализацию белков репарации, а также дают высшим организмам преимущество в размерах белков, освобождая пространство для динамики биомолекул внутри клетки [115–119].

Наконец, важнейшую роль IDP и IDPR играют в формировании динамических макромолекулярных структур клетки, в том числе RNP-гранул и комплексов репарации ДНК.

ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ БИМОЛЕКУЛ

Согласно современным представлениям, подробно изложенным в работах [29, 30, 33–35, 37], разобщение биохимических процессов в клетке осуществляется посредством так называемых *фазовых переходов* (*phase transitions*) биомолекул (рис. 2). В соответствии с этой парадигмой образование немембранных компартментов клетки имеет сходные черты с формированием капель дисперсной фазы при расслоении эмульсии двух жидкостей, обладающих различными свойствами [28–30, 120–122]. Ключевая роль в фазовых переходах принадлежит функционально неупорядоченным белкам [31], структурная пластичность которых позволяет им, приобретая различные конформации, вступать во множественные гомо- и гетерогенные взаимодействия [32]. Многие IDP содержат *домены низкой сложности* (LCD), имеющие тенденцию к энергетически выгодной агрегации с образованием мультимеров белков [33]. В результате «расслоения» внутриклеточной плазмы (*liquid demixing*) и отделения «дисперсной фазы» белки и взаимодействующие с ними лиганды оказываются в окружении, отличном от среды за пределами компартмента, что способствует локальному повышению концентраций реагирующих молекул и эффективному протеканию специфических биохимических реакций [34].

Образование RNP-комплексов является одним из важнейших примеров немембранной компартиментализации посредством фазовых переходов мРНК

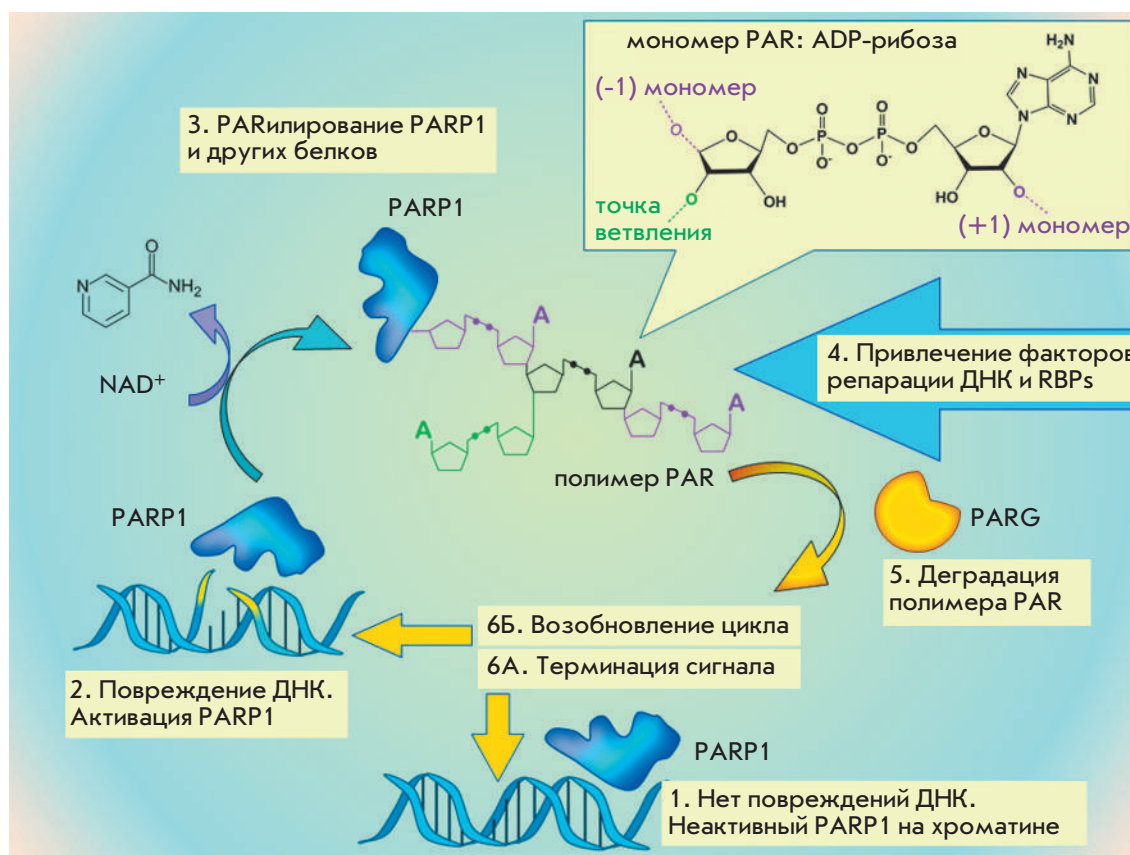


Рис. 3. PARP1-зависимая передача сигнала о повреждении ДНК (схема)

и соответствующих им IDPR-содержащих РНК-связывающих белков [27]. Присутствие РНК в этих комплексах необходимо для сохранения их «растворимости» [35, 36], что, по-видимому, важно для последующей трансляции [27]. Однако фазовые переходы могут осуществляться и независимо от РНК, только с участием белков – как, например, при формировании centrosom (точек нуклеации сборки микротрубочек) [123]. Согласно Altmeyer и соавт., сборка мультибелковых комплексов репарации вблизи повреждений ДНК может происходить по механизму фазового разделения, при котором формирование «репаросомного» компартмента способствует также удержанию в непосредственной близости концов разрыва ДНК, одновременно защищая их от гидролиза нуклеазами [124, 125].

Фазовый переход белков и нуклеиновых кислот с образованием динамических ансамблей может инициироваться локальным повышением концентрации компонентов с последующей самоассоциацией [126] и происходить в ответ на изменения физических параметров микроокружения, таких, как pH, ионная сила или температура [127]. Кроме того, некоторые биомолекулы способны выступать в качестве «ядер» нуклеации сборки мультибелковых комплексов с последующим локальным расслоением внутриклеточ-

ной плазмы на две жидкие фазы с различными свойствами [37].

Предпочтительными субстратами для нуклеации фазовых переходов являются одноцепочечные нуклеиновые кислоты – РНК [27, 128] и одноцепочечная ДНК (оцДНК) [129]. Оба полимера обладают большей структурной гибкостью, чем двухцепочечная ДНК, и их общие свойства – отрицательный заряд и относительно низкая сложность в силу строения из ограниченного набора уникальных блоков [33] – напоминают характерные черты функционально неупорядоченных белков. У высших организмов эволюция самоорганизации внутриклеточной плазмы достигает своего пика с появлением «третьей нуклеиновой кислоты», не несущей информационной нагрузки, имеющей предельно простую структуру из повторяющихся мономеров и очень короткое время существования в клетке, – это поли(ADP-рибоза) (PAR). Роль этой нуклеиновой кислоты может быть определяющей в регуляции фазовых переходов биомолекул в клетке.

ПОЛИ(ADP-РИБОЗА) И ПОЛИ(ADP-РИБОЗ)ИЛИРОВАНИЕ

Поли(ADP-рибоза) представляет собой линейную или разветвленную полимерную цепь, состоящую

из идентичных молекулярных блоков – единиц ADP-рибозы, источником которых в процессе катализируемого PARP1 синтеза PAR служит NAD^+ (рис. 3) [130]. В физиологических условиях PAR формирует динамичную мультиглобулярную структуру, зависящую от размера полимера, что может способствовать его «подстройке» при связывании различных лигандов [131]. Адениновые основания в поли(ADP-рибозе), как в нуклеиновых кислотах, располагаются в *анти*-конформации, открытой для образования водородных связей и стекинг-взаимодействий [132]. Вторичная структура PAR в виде спирали, подтвержденная *in vitro* методом спектрального анализа [133], может формироваться при высокой ионной силе раствора (4 М NaCl) либо, в физиологических условиях, при связывании с белками [132]. Полимер PAR обладает отрицательным зарядом за счет двух отрицательно заряженных фосфатных групп в каждом из мономеров (остатков ADP-рибозы), в то время как РНК и оцДНК содержат лишь один отрицательный заряд на мономер (остаток нуклеотида) [134]. В отсутствие воздействий, индуцирующих повреждение ДНК, уровень PAR в клетках очень низкий, и (ADP-рибоза) присутствует в форме достаточно стабильных (время полураспада $t_{1/2} \sim 7.7$ ч) моно- или олигомеров. Массированный локальный синтез высокодинамичного полимера PAR ($t_{1/2}$ менее 1 мин) индуцируется возникновением повреждения в ДНК [135–137]. Главная отличительная особенность поли(ADP-рибозы) – участие в посттрансляционной модификации белков.

По аналогии с ДНК и РНК ферменты, ответственные за синтез PAR в клетках, были названы PAR-полимеразами (PARP). PARP1 является важнейшим представителем семейства белков со сходными каталитическими доменами, у человека это семейство насчитывает 17 членов [138]. Только четыре представителя этого класса обладают способностью к синтезу поли(ADP-рибозы) – PARP1, PARP2 и две танкиразы [138, 139]. Белки PARP1 и PARP2 играют важную роль в сохранении стабильности генома [140]. Танкиразы, способные синтезировать линейный PAR длиной до 20 мономеров ADP-рибозы [141], функционируют при формировании веретена деления [142] и контролируют функции centrosомы [143].

PARP1 активируется при связывании с экспонированными основаниями на концах разрыва ДНК [144]. Распознавание повреждения приводит к локальной перестройке аутоингибиторного домена PARP1, который, приобретая неупорядоченную структуру, перестает препятствовать связыванию NAD^+ в активном центре для последующего синтеза поли(ADP-рибозы) [109]. В результате интердоменных взаимодействий, привлекающих катали-

тический домен к месту повреждения ДНК, домен аутомодификации PARP1 располагается вблизи активного центра, тем самым оказываясь наиболее доступным акцептором полимера PAR [145]. Это объясняет тот факт, что преимущественной мишенью поли(ADP-рибоз)илирования является сам PARP1 [134]. В PARP1, как и в модифицируемых им белках, установлено большое разнообразие (ADP-рибоза)-акцепторных сайтов: Lys, Arg, Glu, Asp, Cys, Ser, Thr, Ser (по фосфату), Asn, хотя чаще акцепторами служат заряженные аминокислотные остатки [146–149]. Принимая во внимание, что скорость синтеза PAR лимитируется расщеплением NAD^+ , можно предположить, что присоединение ADP-рибозы к белку-мишени в присутствии активированного PARP1 происходит по любому подходящему аминокислотному остатку на экспонированной поверхности белка [125]. Специфичность PAR-опосредованной модуляции клеточных процессов при этом может достигаться за счет разного локального окружения PARP1 и его мишени, а не за счет специфичных сайтов модификации в белке [125].

Многие белки взаимодействуют с PAR нековалентно. Среди белков, ассоциированных с PAR и/или подвергающихся этой РТМ, идентифицированы некоторые факторы репарации ДНК, белки ремоделирования хроматина, РНК-связывающие белки и транскрипционные факторы [62, 150]. Многие функции, выполняемые PAR в клетках, реализуются посредством динамического взаимодействия поли(ADP-рибозы) и PAR-связывающих белков. Перераспределение белков в клетке в результате локального синтеза PAR может влиять на пути передачи сигнала, ответ клетки на повреждение ДНК, регуляцию транскрипции, стабильность белков, определение судьбы клетки [151]. На настоящий момент описано несколько PAR-связывающих модулей в белках, структура которых варьирует от полностью упорядоченных доменов до IDPR, способных вступать в мультивалентные взаимодействия с полимером PAR [125].

PAR также может распознаваться РНК- и ДНК-связывающими мотивами белков [125]. Поскольку для организации макромолекулярных ансамблей в клетке важны не только специфичные взаимодействия, но и динамические изменения локальных концентраций взаимодействующих молекул, пики PARилирования вблизи повреждений ДНК могут конкурировать с РНК за связывание RBP, привлекая их к сайтам повреждений [152]. ДНК-связывающие домены ферментов репарации ДНК и факторов транскрипции также могут способствовать PAR-зависимому привлечению этих белков к месту локализации повреждения в ДНК [153, 154].

Недавно было показано, что PAR может выступать в качестве ядра нуклеации фазовых переходов РНК-связывающих белков FUS (TLS), EWS (EWSR1) и TAF15 в сайтах геномных повреждений [124]. Компарментализация клетки, инициируемая PAR-зависимым разделом фаз, может лежать в основе ключевых функций этого полимера в различных процессах, связанных с ДНК и РНК, например, в формировании стресс-гранул [155], ядрышек [156], сплайсосом [157] и транскрипсосом [158]. Так, в случае регуляции транскрипции фазовый переход FUS (TLS), EWS (EWSR1) и TAF15 на промоторах генов может обеспечивать платформу для посадки неупорядоченного С-концевого домена РНК-полимеразы II [159]. По-видимому, формирование PAR вблизи промоторов может способствовать транскрипции, особенно если принять во внимание, что в некоторых случаях повреждения специально вносятся в промоторы и кодирующие части генов [5, 13, 17].

Длительное существование PAR в клетке сопряжено с определенными рисками, среди которых снятие РНК- и ДНК-связывающих белков с их мишеней, возможность фазового перехода динамических «капель» к нерастворимым агрегатам белков, которые наблюдаются при некоторых патологических состояниях организма [33], а также энергетический кризис, вызванный истощением запасов NAD⁺ [160]. Поэтому важную роль в системе поли(ADP-рибоз)илирования играют ферменты, способные расщеплять PAR и удалять ADP-рибозу с модифицированных белков [161]. Ключевым ферментом, деградирующим PAR в клетках, является поли(ADP-рибозо)гликогидролаза (PARG), которой присущи эндо- и экзогликогидролазная активности с преобладанием последней [162]. Поскольку для расщепления PAR требуется доступность полимера, PAR-связывающие белки потенциально могут препятствовать активности PARG в клетках. Так, PARG не может отщеплять проксимальный мономер ADP-рибозы, что, предположительно, обусловлено стерическими затруднениями [163]. Для удаления ADP-рибозы с моно(ADP-рибоз)илированных белков существуют специализированные ферменты [164]. Динамическая регуляция уровня PAR в клетках может обеспечивать необходимый баланс РНК- и ДНК-белковых взаимодействий в различных системах.

У-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК 1

В качестве примера мультиспецифичного белка, функционирующего «на стыке трех нуклеиновых кислот», можно привести У-бокс-связывающий белок 1 (УВ-1). При взаимодействии с ДНК [165, 166] реализуется роль УВ-1 в транскрипции [167] и предполагаемое участие в репарации ДНК [166, 168].

Под контролем УВ-1, действующего как фактор транскрипции, находятся гены, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием, и некоторые гены, продукты которых участвуют в репарации ДНК [167, 169, 170]. В качестве РНК-связывающего белка УВ-1 участвует в сплайсинге пре-мРНК [167, 171], является основным белком RNP в цитоплазме [172] и регулирует трансляцию мРНК [167, 173]. Установлено, что УВ-1 взаимодействует с большим числом некодирующих РНК [174, 175], обладает повышенным сродством к поврежденным ДНК и РНК [166, 168, 176], а также обнаружен среди PAR-связывающих белков [150]. Для УВ-1 характерна стресс-зависимая релокализация из цитоплазмы в ядро [177–180], в некоторых случаях обусловленная специфической посттрансляционной модификацией УВ-1 – его частичным протеолизом 20S протеасомой [181].

Большая часть молекулы УВ-1 имеет функционально неупорядоченную структуру [167], наделяющую этот белок высокой мультивалентностью и способностью к самоассоциации с образованием мультимеров в присутствии РНК и ДНК [182] или амилоидных фибрилл при высокой ионной силе раствора [183]. УВ-1 физически взаимодействует с ферментами разных систем репарации ДНК – эксцизионной репарации оснований (NEIL2 [177], APE1 [184], ДНК-полимеразы β [177], ДНК-полимеразы δ [185], PCNA [186], ДНК-лигазы III α [177], NEIL1, PARP1 и PARP2 [187]), мисматч-репарации (MSH2 [185]), репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Ku80 [185]). УВ-1 может способствовать распознаванию объемных повреждений ДНК фактором NER XPC-HR23b [188] и модулировать активность ключевых и регуляторных ферментов BER [177, 187, 189–191].

УВ-1 обнаруживается в стрессовых гранулах [192], необходим для формирования центросомы [193] и может участвовать в разборке ядрышек [194]. Архитектором формирования этих немембранных структур, как и комплексов репарации на повреждениях ДНК, служит поли(ADP-рибоза) [155, 156, 195]. Недавно было показано, что УВ-1 способен модулировать синтез PAR в зависимости от интенсивности повреждения ДНК [187], выступать в качестве мишени поли(ADP-рибоз)илирования [187, 196] и защищать PAR от гидролиза PARG, существенно продлевая время существования полимера [187]. Схематическое изображение участия УВ-1 в метаболизме PAR и РНК представлено на *рис. 4*.

Таким образом, транскрипционный фактор и один из ключевых РНК-связывающих белков цитоплазмы УВ-1 обладает широким спектром дополнительных функций, которые могут «включаться» в условиях

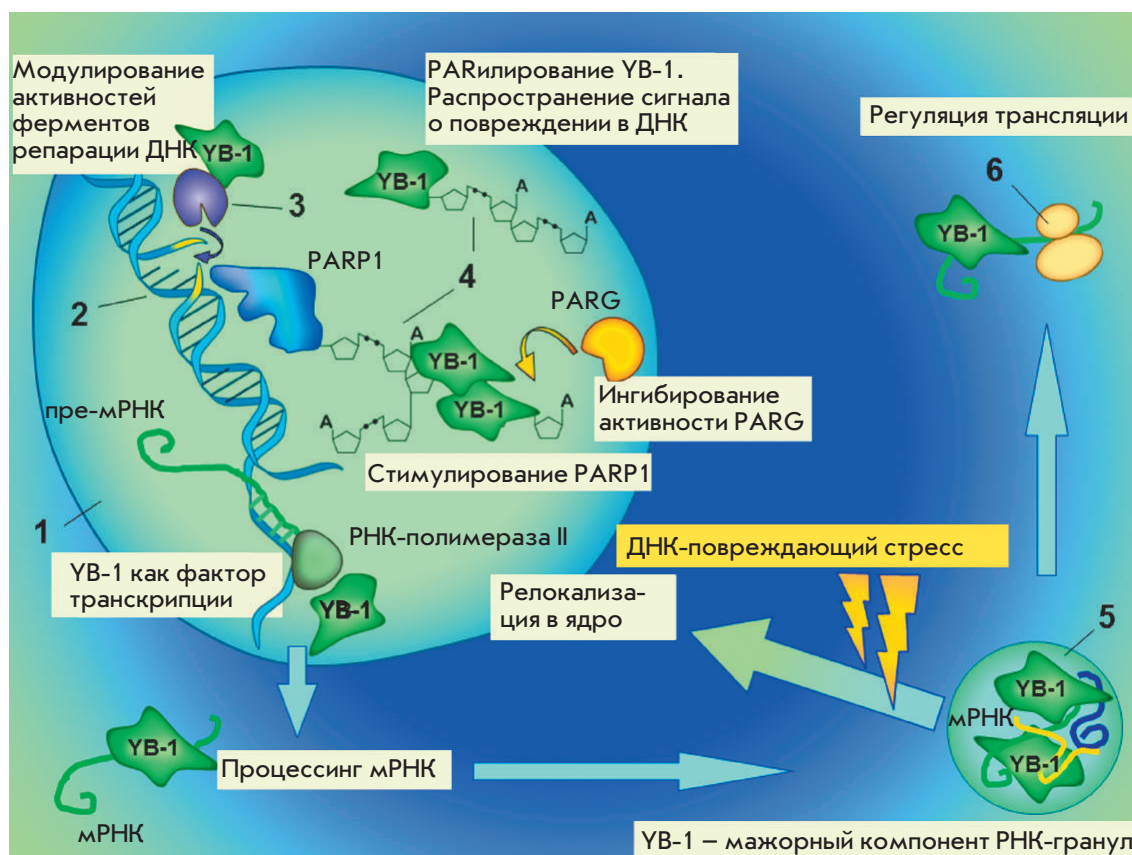


Рис. 4. «Переключение» внутриклеточных функций РНК-связывающего белка YB-1 при генотоксическом стрессе (схема). 1 – ядро клетки; 2 – повреждение в молекуле ДНК; 3 – фермент репарации ДНК; 4 – поли(ADP-рибоза); 5 – цитоплазматическая РНК-гранула; 6 – рибосома

ДНК-повреждающего стресса. Помимо транскрипционной и посттранскрипционной регуляции генов, в их число входят непосредственное участие в репарации ДНК и регуляция сборки комплексов репарации путем PAR-индуцируемых фазовых переходов функционально неупорядоченных белков и факторов репарации ДНК, содержащих IDPR. YB-1 служит примером возможного функционирования RBP в качестве дополнительного стресс-индуцируемого уровня защиты целостности генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение сложности организма в эволюции коррелирует с развитием регуляторных систем. В то же время ограничение размера клетки приводит к росту мультифункциональности биополимеров. Мультифункциональность, т.е. способность принимать участие в нескольких биохимических процессах, тесно связана со способностью взаимодействовать с различными партнерами, структура большинства из которых строго детерминирована их функцией в клетке. Использование модульной структуры из блоков, обладающих разной специфичностью, не позволяет полностью решить эту проблему, поскольку сохраняется ограничение на количество возможных взаимодействий. Изящным решением этой задачи стало умень-

шение информационного объема первичных структур нуклеиновых кислот и белков. В своих работах Уверский В. [88, 197] убедительно показал, как упрощение аминокислотной последовательности белка приводит к достижению максимальной структурной сложности. Появление функционально неупорядоченных белков позволило значительно расширить спектр внутриклеточных взаимодействий за счет уникальных биофизических особенностей этих представителей белкового царства [197]. Обладая мультивалентностью в сочетании с малым объемом, функционально неупорядоченные белки способны вовлекаться в самые разные клеточные процессы и образовывать узловые точки интерактомов, выступая в качестве ключевых регуляторных белков клетки.

Параллельно с преобразованием протеома в ходе эволюции у высших эукариот появляется большее разнообразие некодирующих нуклеиновых кислот, служащих для регуляции базовых систем РНК- и ДНК-белковых взаимодействий. В поддержании стабильности генома особое место занимает «третья нуклеиновая кислота» – поли(ADP-рибоза) (PAR), синтез которой из NAD⁺ стимулируется в присутствии поврежденной ДНК. Образование PAR, модулирующей взаимодействия РНК- и ДНК-связывающих белков с их мишенями, приводит

к сборке специфических функциональных комплексов, необходимых для регуляции ключевых процессов клеточного метаболизма в условиях стрессового воздействия. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (№ 14-24-00038) и стипендии Президента РФ для молодых ученых и аспирантов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vohhodina J., Harkin D.P., Savage K.I. // Wiley Interdiscip. Rev. RNA. 2016. V. 7. № 5. P. 604–619.
2. Goodwin J.F., Schiewer M.J., Dean J.L., Schrecengost R.S., de Leeuw R., Han S., Ma T., Den R.B., Dicker A.P., Feng F.Y., Knudsen K.E. // Cancer Discov. 2013. V. 3. № 11. P. 1254–1271.
3. Fong Y.W., Cattoglio C., Tjian R. // Mol. Cell. 2013. V. 52. № 3. P. 291–302.
4. Chen D., Lucey M.J., Phoenix F., Lopez-Garcia J., Hart S.M., Losson R., Buluwela L., Coombes R.C., Chambon P., Schär P., Ali S. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. № 40. P. 38586–38592.
5. Shen L., Wu H., Diep D., Yamaguchi S., D'Alessio A.C., Fung H.L., Zhang K., Zhang Y. // Cell. 2013. V. 153. № 3. P. 692–706.
6. Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., Le Coz M., Devarajan K., Wessels A., Soprano D., et al. // Cell. 2011. V. 146. № 1. P. 67–79.
7. Mellon I., Hanawalt P.C. // Nature. 1989. V. 342. № 6245. P. 95–98.
8. Khobta A., Epe B. // Mutat. Res. 2012. V. 736. № 1–2. P. 5–14.
9. Adelman K., Lis J.T. // Nat. Rev. Genet. 2012. V. 13. № 10. P. 720–731.
10. Jonkers I., Lis J.T. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2015. V. 16. № 3. P. 167–177.
11. Perillo B., Ombra M.N., Bertoni A., Cuozzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E.V. // Science. 2006. V. 319. № 5860. P. 202–206.
12. Ju B.G., Lunyak V.V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D.W., Glass C.K., Rosenfeld M.G. // Science. 2006. V. 312. № 5781. P. 1798–1802.
13. Bunch H., Lawney B.P., Lin Y.F., Asaithamby A., Murshid A., Wang Y.E., Chen B.P., Calderwood S.K. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 10191. doi: 10.1038/ncomms10191
14. Joshi R.S., Piña B., Roca J. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. № 16. P. 7907–7915.
15. Pedersen J.M., Fredsoe J., Roedgaard M., Andreasen L., Mundbjerg K., Kruhoffer M., Brinch M., Schierup M.H., Bjergbaek L., Andersen A.H. // PLoS Genet. 2012. V. 8. № 12. e1003128.
16. Bunch H. // FEBS Lett. 2016. V. 590. № 8. P. 1064–1075.
17. Petesch S.J., Lis J.T. // Trends Genet. 2012. V. 28. № 6. P. 285–294.
18. Francia S., Michelini F., Saxena A., Tang D., de Hoon M., Anelli V., Mione M., Carninci P., d'Adda di Fagnagna F. // Nature. 2012. V. 488. № 7410. P. 231–235.
19. Talhaoui I., Lebedeva N.A., Zarkovic G., Saint-Pierre C., Kutuzov M.M., Sukhanova M.V., Matkarimov B.T., Gasparutto D., Saparbaev M.K., Lavrik O.I., et al. // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 19. P. 9279–9295.
20. Malewicz M., Perlmann T. // Exp. Cell Res. 2014. V. 329. № 1. P. 94–100.
21. Frit P., Kwon K., Coin F., Auriol J., Dubaele S., Salles B., Egly J.M. // Mol. Cell. 2002. V. 10. № 6. P. 1391–1401.
22. Tu Y., Tornaletti S., Pfeifer G.P. // EMBO J. 1996. V. 15. № 3. P. 675–683.
23. Li G.W., Burkhardt D., Gross C., Weissman J.S. // Cell. 2014. V. 157. № 3. P. 624–635.
24. Keene J.D., Tenenbaum S.A. // Mol. Cell. 2002. V. 9. № 6. P. 1161–1167.
25. Keene J.D. // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. № 7. P. 533–543.
26. Mitchell S.F., Parker R. // Mol. Cell. 2014. V. 54. № 4. P. 547–558.
27. Nielsen F.C., Hansen H.T., Christiansen J. // Bioessays. 2016. V. 38. № 7. P. 674–681.
28. Kato M., Han T.W., Xie S., Shi K., Du X., Wu L.C., Mirzaei H., Goldsmith E.J., Longgood J., Pei J., et al. // Cell. 2012. V. 149. № 4. P. 753–767.
29. Hyman A.A., Simons K. // Science. 2012. V. 337. № 6098. P. 1047–1049.
30. Weber S.C., Brangwynne C.P. // Cell. 2012. V. 149. № 6. P. 1188–1191.
31. Uversky V.N., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Zaslavsky B. // FEBS Lett. 2015. V. 589. № 1. P. 15–22.
32. Li P., Banjade S., Cheng H.C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth J.V., King D.S., Banani S.F., et al. // Nature. 2012. V. 483. № 7389. P. 336–340.
33. Aguzzi A., Altmeyer M. // Trends Cell Biol. 2016. V. 26. № 7. P. 547–558.
34. Brangwynne C.P. // J. Cell Biol. 2013. V. 203. № 6. P. 875–881.
35. Elbaum-Garfinkle S., Brangwynne C.P. // Dev. Cell. 2015. V. 35. № 5. P. 531–532.
36. Zhang H., Elbaum-Garfinkle S., Langdon E.M., Taylor N., Occhipinti P., Bridges A.A., Brangwynne C.P., Gladfelter A.S. // Mol. Cell. 2015. V. 60. № 2. P. 220–230.
37. Hyman A.A., Weber C.A., Jülicher F. // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2014. V. 30. P. 39–58.
38. Dutertre M., Lambert S., Carreira A., Amor-Guéret M., Vagner S. // Trends Biochem. Sci. 2014. V. 39. № 3. P. 141–149.
39. Kleiman F.E., Manley J.L. // Cell. 2001. V. 104. P. 743–753.
40. Mirkin N., Fonseca D., Mohammed S., Cevher M.A., Manley J.L., Kleiman F.E. // Nucleic Acids Res. 2008. V. 36. № 6. P. 1792–1804.
41. Dutertre M., Sanchez G., Barbier J., Corcos L., Auboeuf D. // RNA Biol. 2011. V. 8. № 5. P. 740–747.
42. Ip J.Y., Schmidt D., Pan Q., Ramani A.K., Fraser A.G., Odum D.T., Blencowe B.J. // Genome Res. 2011. V. 21. № 3. P. 390–401.
43. Fan J., Yang X., Wang W., Wood W.H. 3rd, Becker K.G., Gorospe M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 16. P. 10611–10616.
44. Braunstein S., Badura M.L., Xi Q., Formenti S.C., Schneider R.J. // Mol. Cell Biol. 2009. V. 29. № 21. P. 5645–5656.
45. Kruiswijk F., Yuniati L., Magliozzi R., Low T.Y., Lim R., Bolder R., Mohammed S., Proud C.G., Heck A.J., Pagano M., Guardavaccaro D. // Sci. Signal. 2012. V. 5. № 227. ra 40.
46. Powley I.R., Kondrashov A., Young L.A., Dobbyn H.C., Hill K., Cannell I.G., Stoneley M., Kong Y.W., Cotes J.A., Smith G.C., et al. // Genes Dev. 2009. V. 23. № 10. P. 1207–1220.
47. Mazan-Mamczarz K., Galbán S., López de Silanes I., Martindale J.L., Atasoy U., Keene J.D., Gorospe M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 14. P. 8354–8359.
48. Glorian V., Maillot G., Polès S., Iacovoni J.S., Favre G., Vagner S. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 11. P. 1692–1701.
49. Wang W., Furneaux H., Cheng H., Caldwell M.C., Hutter D., Liu Y., Holbrook N., Gorospe M. // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 3. P. 760–769.
50. Hung T., Wang Y., Lin M.F., Koegel A.K., Kotake Y., Grant G.D., Horlings H.M., Shah N., Umbricht C., Wang P., et al. //

- Nat. Genet. 2011. V. 43. № 7. P. 621–629.
51. Hegde M.L., Banerjee S., Hegde P.M., Bellot L.J., Hazra T.K., Boldogh I., Mitra S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 41. P. 34202–34211.
52. Anantha R.W., Alcivar A.L., Ma J., Cai H., Simhadri S., Ule J., König J., Xia B. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. e61368.
53. Hong Z., Jiang J., Ma J., Dai S., Xu T., Li H., Yasui A. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 4. e60208.
54. Rulten S.L., Rotheray A., Green R.L., Grundy G.J., Moore D.A., Gómez-Herreros F., Hafezparast M., Caldecott K.W. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. 307–314.
55. Wei W., Ba Z., Gao M., Wu Y., Ma Y., Amiard S., White C.I., Rendtlew Danielsen J.M., Yang Y.G., et al. // *Cell*. 2012. V. 149. № 1. P. 101–112.
56. Azvolinsky A., Giresi P.G., Lieb J.D., Zakian V.A. // *Mol. Cell*. 2009. V. 34. № 6. P. 722–734.
57. Aguilera A., García-Muse T. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 2. P. 115–124.
58. Tuduri S., Crabbé L., Conti C., Tourrière H., Holtgreve-Grez H., Jauch A., Pantesco V., De Vos J., Thomas A., Theillet C., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2009. V. 11. № 11. P. 1315–1324.
59. Drolet M. // *Mol. Microbiol.* 2006. V. 59. P. 723–730.
60. Bennetzen M.V., Larsen D.H., Bunkenborg J., Bartek J., Lukas J., Andersen J.S. // *Mol. Cell Proteomics*. 2010. V. 9. № 6. P. 1314–1323.
61. Bensimon A., Schmidt A., Ziv Y., Elkon R., Wang S.Y., Chen D.J., Aebersold R., Shiloh Y. // *Sci. Signal*. 2010. V. 3. № 151. rs3.
62. Jungmichel S., Rosenthal F., Altmeyer M., Lukas J., Hottiger M.O., Nielsen M.L. // *Mol. Cell*. 2013. V. 52. № 2. P. 272–285.
63. Beli P., Lukashchuk N., Wagner S.A., Weinert B.T., Olsen J.V., Baskomb L., Mann M., Jackson S.P., Choudhary C. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 2. P. 212–225.
64. Koike K., Uchiumi T., Ohga T., Toh S., Wada M., Kohno K., Kuwano M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. № 3. P. 390–394.
65. Cammas A., Lewis S.M., Vagner S., Holcik M. // *Biochem. Pharmacol.* 2008. V. 76. № 11. P. 1395–1403.
66. Lukong K.E., Chang K.W., Khandjian E.W., Richard S. // *Trends Genet.* 2008. V. 24. № 8. P. 416–425.
67. Cooper T.A., Wan L., Dreyfuss G. // *Cell*. 2009. V. 136. № 4. P. 777–793.
68. Braunschweig U., Gueroussov S., Plocik A.M., Graveley B.R., Blencowe B.J. // *Cell*. 2013. V. 152. № 6. P. 1252–1269.
69. Shi Y., Manley J.L. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 9. P. 889–897.
70. Ha M., Kim V.N. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 8. P. 509–524.
71. Rinn J.L. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. V. 6. № 8. P. a018614.
72. Lasda E., Parker R. // *RNA*. 2014. V. 20. № 12. P. 1829–1842.
73. Gerstberger S., Hafner M., Tuschl T. // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. № 12. P. 829–845.
74. Neelamraju Y., Hashemikhabir S., Janga S.C. // *J. Proteomics*. 2015. V. 127. Pt A. P. 61–70.
75. Lunde B.M., Moore C., Varani G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 6. P. 479–490.
76. Leung A.K., Vyas S., Rood J.E., Bhutkar A., Sharp P.A., Chang P. // *Mol. Cell*. 2011. V. 42. № 4. P. 489–499.
77. Leung A., Todorova T., Ando Y., Chang P. // *RNA Biol.* 2012. V. 9. № 5. P. 542–548.
78. Wang X., McLachlan J., Zamore P.D., Hall T.M. // *Cell*. 2002. V. 110. № 4. P. 501–512.
79. Cheong C.G., Hall T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 37. P. 13635–13639.
80. Kielkopf C.L., Rodionova N.A., Green M.R., Burley S.K. // *Cell*. 2001. V. 106. № 5. P. 595–605.
81. Järvelin A.I., Noerenberg M., Davis I., Castello A. // *Cell Commun. Signal*. 2016. V. 14. № 9. doi: 10.1186/s12964-016-0132-3
82. Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B.M., Strein C., Davey N.E., Humphreys D.T., Preiss T., Steinmetz L.M., et al. // *Cell*. 2012. V. 149. № 6. P. 1393–1406.
83. Beckmann B.M., Horos R., Fischer B., Castello A., Eichelbaum K., Alleaume A.M., Schwarzl T., Curk T., Foehr S., Huber W., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 10127. P. 1–9.
84. Livesay D.R. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010. V. 10. № 6. P. 706–708.
85. Uversky V.N. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2003. V. 21. № 2. P. 211–234.
86. Tsvetkov P., Asher G., Paz A., Reuven N., Sussman J.L., Silman I., Shaul Y. // *Proteins*. 2008. V. 70. № 4. P. 1357–1366.
87. Dunker A.K., Uversky V.N. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010. V. 10. № 6. P. 782–788.
88. Uversky V.N. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 13. P. 6681–6688.
89. Uversky V.N., Gillespie J.R., Fink A.L. // *Proteins*. 2000. V. 41. № 3. P. 415–427.
90. Dunker A.K., Lawson J.D., Brown C.J., Williams R.M., Romero P., Oh J.S., Oldfield C.J., Campen A.M., Ratliff C.M., Hipps K.W., et al. // *J. Mol. Graph. Model.* 2001. V. 19. № 1. P. 26–59.
91. Uversky V.N. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. № 1. P. 2–12.
92. Uversky V.N., Li J., Fink A.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 10737–10744.
93. Goto Y., Takahashi N., Fink A.L. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. № 14. P. 3480–3488.
94. Fink A.L., Calciano L.J., Goto Y., Kurotsu T., Palleros D.R. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 41. P. 12504–12511.
95. Uversky V.N., Narizhneva N.V. // *Biochemistry (Mosc.)*. 1998. V. 63. № 4. P. 420–433.
96. Witze E.S., Old W.M., Resing K.A., Ahn N.G. // *Nat. Methods*. 2007. V. 4. № 10. P. 798–806.
97. Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G.J. Jr. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 45. P. 7342–7372.
98. Dunker A.K., Brown C.J., Obradovic Z. // *Adv. Protein Chem.* 2002. V. 62. P. 25–49.
99. Xie H., Vucetic S., Iakoucheva L.M., Oldfield C.J., Dunker A.K., Obradovic Z., Uversky V.N. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 5. P. 1917–1932.
100. Cumberworth A., Lamour G., Babu M.M., Gsponer J. // *Biochem J.* 2013. V. 454. № 3. P. 361–369.
101. Ward J.J., Sodhi J.S., McGuffin L.J., Buxton B.F., Jones D.T. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 337. № 3. P. 635–645.
102. Xie H., Vucetic S., Iakoucheva L.M., Oldfield C.J., Dunker A.K., Uversky V.N., Obradovic Z. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 5. P. 1882–1898.
103. Dunker A.K., Cortese M.S., Romero P., Iakoucheva L.M., Uversky V.N. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 20. P. 5129–5148.
104. Ekman D., Light S., Björklund A.K., Elofsson A. // *Genome Biol.* 2006. V. 7. № 6. R45.
105. Higurashi M., Ishida T., Kinoshita K. // *Protein Sci.* 2008. V. 17. № 1. P. 72–78.
106. Patil A., Kinoshita K., Nakamura H. // *Protein Sci.* 2010. V. 19. № 8. P. 1461–1468.
107. Singh G.P., Ganapathi M., Dash D. // *Proteins*. 2007. V. 66. № 4. P. 761–765.
108. Trudeau T., Nassar R., Cumberworth A., Wong E.T., Woollard G., Gsponer J. // *Structure*. 2013. V. 21. № 3. P. 332–341.
109. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. // *Mol. Cell*. 2015. V. 60. № 5. P. 755–768.

110. Tapley T.L., Körner J.L., Barge M.T., Hupfeld J., Schauerte J.A., Gafni A., Jakob U., Bardwell J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 14. P. 5557–5562.
111. Chakrabortee S., Tripathi R., Watson M., Schierle G.S., Kurniawan D.P., Kaminski C.F., Wise M.J., Tunnacliffe A. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. № 1. P. 210–219.
112. Buljan M., Chalancon G., Eustermann S., Wagner G.P., Fuxreiter M., Bateman A., Babu M.M. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 6. P. 871–883.
113. Ellis J.D., Barrios-Rodiles M., Colak R., Irimia M., Kim T., Calarco J.A., Wang X., Pan Q., O'Hanlon D., Kim P.M., et al. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 6. P. 884–892.
114. Hegde M.L., Izumi T., Mitra S. // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2012. V. 110. P. 123–153.
115. Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. // *Cell Mol. Life Sci.* 2010. V. 67. № 21. P. 3573–3587.
116. Mittag T., Kay L.E., Forman-Kay J.D. // *J. Mol. Recog.* 2010. V. 23. № 2. P. 105–116.
117. Gunasekaran K., Tsai C.J., Kumar S., Zanuy D., Nussinov R. // *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. № 2. P. 81–85.
118. Krueger K.E., Srivastava S. // *Mol. Cell Proteomics*. 2006. V. 5. № 10. P. 1799–1810.
119. Seet B.T., Dikic I., Zhou M.M., Pawson T. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 473–483.
120. Brangwynne C.P., Eckmann C.R., Courson D.S., Rybarska A., Hoeghe C., Gharakhani J., Jülicher F., Hyman A.A. // *Science*. 2009. V. 324. № 5935. P. 1729–1732.
121. Brangwynne C.P., Mitchison T.J., Hyman A.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 11. P. 4334–4339.
122. Han T.W., Kato M., Xie S., Wu L.C., Mirzaei H., Pei J., Chen M., Xie Y., Allen J., Xiao G., et al. // *Cell*. 2012. V. 149. № 4. P. 768–779.
123. Zwicker D., Decker M., Jaensch S., Hyman A.A., Jülicher F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 26. P. 2636–2645.
124. Altmeyer M., Neelsen K.J., Teloni F., Pozdnyakova I., Pellegrino S., Gröfte M., Rask M.B., Streicher W., Jungmichel S., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 8088. P. 1–12.
125. Teloni F., Altmeyer M. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 3. P. 993–1006.
126. Weber S.C., Brangwynne C.P. // *Curr. Biol.* 2015. V. 25. № 5. P. 641–646.
127. Nott T.J., Petsalaki E., Farber P., Jervis D., Fussner E., Plochowitz A., Craggs T.D., Bazett-Jones D.P., Pawson T., Forman-Kay J.D., et al. // *Mol. Cell*. 2015. V. 57. № 5. P. 936–947.
128. Shevtsov S.P., Dundr M. // *Nat. Cell Biol.* 2011. V. 13. № 2. P. 167–173.
129. Nott T.J., Petsalaki E., Farber P., Jervis D., Fussner E., Plochowitz A., Craggs T.D., Bazett-Jones D.P., Pawson T., Forman-Kay J.D., et al. // *Mol. Cell*. 2015. V. 57. № 5. P. 936–947.
130. Bürkle A. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 18. P. 4576–4589.
131. D'Annessa I., Coletta A., Desideri A. // *Biopolymers*. 2014. V. 101. № 1. P. 78–86.
132. Schultheisz H.L., Szymczyna B.R., Williamson J.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 40. P. 14571–14578.
133. Minaga T., Kun E. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 2. P. 725–730.
134. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 342. Pt. 2. P. 249–268.
135. Wielckens K., George E., Pless T., Hilz H. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 7. P. 4098–4104.
136. Kreimeyer A., Wielckens K., Adamietz P., Hilz H. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 2. P. 890–896.
137. Alvarez-Gonzalez R., Althaus F.R. // *Mutat. Res.* 1989. V. 218. № 2. P. 67–74.
138. Bock F.J., Chang P. // *FEBS J.* 2016. V. 283. № 22. P. 4017–4031.
139. Hottiger M.O., Hassa P.O., Lüscher B., Schüler H., Koch-Nolte F. // *Trends Biochem. Sci.* 2010. V. 35. № 4. P. 208–219.
140. Beck C., Robert I., Reina-San-Martin B., Schreiber V., Dantzer F. // *Exp. Cell Res.* 2014. V. 329. № 1. P. 18–25.
141. Cook B.D., Dynek J.N., Chang W., Shostak G., Smith S. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 1. P. 332–342.
142. Chang P., Coughlin M., Mitchison T.J. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. № 11. P. 1133–1139.
143. Ozaki Y., Matsui H., Asou H., Nagamachi A., Aki D., Honda H., Yasunaga S., Takihara Y., Yamamoto T., Izumi S., et al. // *Mol. Cell*. 2012. V. 47. № 5. P. 694–706.
144. Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Oussatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 17. P. 17076–17083.
145. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. // *Science*. 2012. V. 336. № 6082. P. 728–732.
146. Daniels C.M., Ong S.E., Leung A.K. // *Mol. Cell*. 2015. V. 58. № 6. P. 911–924.
147. Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. № 11. P. 3723–3738.
148. Zhang Y., Wang J., Ding M., Yu Y. // *Nat. Methods*. 2013. V. 10. № 10. P. 981–984.
149. Hottiger M.O. // *Annu. Rev. Biochem.* 2015. V. 84. P. 227–263.
150. Gagné J.P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., Poirier G.G. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 22. P. 6959–6976.
151. Krietsch J., Rouleau M., Pic É., Ethier C., Dawson T.M., Dawson V.L., Masson J.Y., Poirier G.G., Gagné J.P. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 6. P. 1066–1087.
152. Krietsch J., Caron M.C., Gagné J.P., Ethier C., Vignard J., Vincent M., Rouleau M., Hendzel M.J., Poirier G.G., Masson J.Y. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 20. P. 10287–10301.
153. Zhang F., Shi J., Chen S.H., Bian C., Yu X. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 22. P. 10782–10794.
154. Izhar L., Adamson B., Ciccio A., Lewis J., Pontano-Vaites L., Leng Y., Liang A.C., Westbrook T.F., Harper J.W., Elledge S.J. // *Cell Rep.* 2015. V. 11. № 9. P. 1486–1500.
155. Isabelle M., Gagné J.P., Gallouzi I.E., Poirier G.G. // *J. Cell Sci.* 2012. V. 125. Pt. 19. P. 4555–4566.
156. Boamah E.K., Kotova E., Garabedian M., Jarnik M., Tulin A.V. // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 1. e1002442.
157. Ji Y., Tulin A.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 8. P. 16168–16183.
158. Kraus W.L., Hottiger M.O. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 6. P. 1109–1123.
159. Kwon I., Kato M., Xiang S., Wu L., Theodoropoulos P., Mirzaei H., Han T., Xie S., Corden J.L., McKnight S.L. // *Cell*. 2013. V. 155. № 5. P. 1049–1060.
160. Andrabi S.A., Umanah G.K., Chang C., Stevens D.A., Karuppagounder S.S., Gagné J.P., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 28. P. 10209–10214.
161. Barkauskaite E., Jankevicius G., Ahel I. // *Mol. Cell*. 2015. V. 58. № 6. P. 935–946.
162. Barkauskaite E., Brassington A., Tan E.S., Warwicker J., Dunstan M.S., Banos B., Lafite P., Ahel M., Mitchison T.J., Ahel I., et al. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. № 2164. P. 1–8.
163. Dunstan M.S., Barkauskaite E., Lafite P., Knezevic C.E., Brassington A., Ahel M., Hergenrother P.J., Leys D., Ahel I. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. № 878. P. 1–6.
164. Jankevicius G., Hassler M., Golia B., Rybin V., Zacharias M., Timinszky G., Ladurner A.G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 4. P. 508–514.
165. Tafuri S.R., Wolfe A.P. // *New Biol.* 1992. V. 4. № 4. P. 349–359.

166. Hasegawa S.L., Doetsch P.W., Hamilton K.K., Martin A.M., Okenquist S.A., Lenz J., Boss J.M. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. № 18. P. 4915–4920.
167. Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2011. V. 76. № 13. P. 1402–1433.
168. Gaudreault I., Guay D., Lebel M. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 1. P. 316–327.
169. En-Nia A., Yilmaz E., Klinge U., Lovett D.H., Stefanidis I., Mertens P.R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 9. P. 7702–7711.
170. Lasham A., Moloney S., Hale T., Homer C., Zhang Y.F., Murison J.G., Braithwaite A.W., Watson J. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 37. P. 35516–35523.
171. Soop T., Nashchekin D., Zhao J., Sun X., Alzhanova-Ericsson A.T., Björkroth B., Ovchinnikov L., Daneholt B. // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. Pt. 8. P. 1493–1503.
172. Blobel G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 4. № 1. P. 88–95.
173. Evdokimova V.M., Kovrigina E.A., Nashchekin D.V., Davydova E.K., Hershey J.W., Ovchinnikov L.P. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 6. P. 3574–3581.
174. Liu T.T., Arango-Argoty G., Li Z., Lin Y., Kim S.W., Dueck A., Ozsolak F., Monaghan A.P., Meister G., DeFranco D.B., et al. // *RNA*. 2015. V. 21. № 6. P. 1159–1172.
175. Wu S.L., Fu X., Huang J., Jia T.T., Zong F.Y., Mu S.R., Zhu H., Yan Y., Qiu S., Wu Q., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 17. P. 8516–8528.
176. Hayakawa H., Uchiumi T., Fukuda T., Ashizuka M., Kohno K., Kuwano M., Sekiguchi M. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 42. P. 12739–12744.
177. Das S., Chattopadhyay R., Bhakat K.K., Boldogh I., Kohno K., Prasad R., Wilson S.H., Hazra T.K. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 39. P. 28474–28484.
178. Ohga T., Koike K., Ono M., Makino Y., Itagaki Y., Tanimoto M., Kuwano M., Kohno K. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. № 18. P. 4224–4228.
179. Koike K., Uchiumi T., Ohga T., Toh S., Wada M., Kohno K., Kuwano M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 417. № 3. P. 390–394.
180. Fujita T., Ito K., Izumi H., Kimura M., Sano M., Nakagomi H., Maeno K., Hama Y., Shingu K., Tsuchiya S., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 24. P. 8837–8844.
181. Sorokin A.V., Selyutina A.A., Skabkin M.A., Guryanov S.G., Nazimov I.V., Richard C., Th'ng J., Yau J., Sorensen P.H., Ovchinnikov L.P., et al. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 20. P. 3602–3612.
182. Kretov D.A., Curmi P.A., Hamon L., Abrakhi S., Desforges B., Ovchinnikov L.P., Pastré D. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 19. P. 9457–9473.
183. Selivanova O.M., Guryanov S.G., Enin G.A., Skabkin M.A., Ovchinnikov L.P., Serdyuk I.N. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2010. V. 75. № 1. P. 115–120.
184. Sengupta S., Mantha A.K., Mitra S., Bhakat K.K. // *Oncogene*. 2011. V. 30. № 4. P. 482–493.
185. Gaudreault I., Guay D., Lebel M. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 1. P. 316–327.
186. Ise T., Nagatani G., Imamura T., Kato K., Takano H., Nomoto M., Izumi H., Ohmori H., Okamoto T., Ohga T., et al. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. № 2. P. 342–346.
187. Alemasova E.E., Moor N.A., Naumenko K.N., Kutuzov M.M., Sukhanova M.V., Pestryakov P.E., Lavrik O.I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1864. № 12. P. 1631–1640.
188. Fomina E.E., Pestryakov P.E., Maltseva E.A., Petruseva I.O., Kretov D.A., Ovchinnikov L.P., Lavrik O.I. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2015. V. 80. № 2. P. 219–227.
189. Marenstein D.R., Ocampo M.T., Chan M.K., Altamirano A., Basu A.K., Boorstein R.J., Cunningham R.P., Teebor G.W. // *Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 24. P. 21242–21249.
190. Pestryakov P., Zharkov D.O., Grin I., Fomina E.E., Kim E.R., Hamon L., Eliseeva I.A., Petruseva I.O., Curmi P.A., Ovchinnikov L.P., et al. // *J. Mol. Recognit.* 2012. V. 25. № 4. P. 224–233.
191. Fomina E.E., Pestryakov P.E., Kretov D.A., Zharkov D.O., Ovchinnikov L.P., Curmi P.A., Lavrik O.I. // *J. Mol. Recognit.* 2015. V. 28. № 2. P. 117–123.
192. Yang W.H., Bloch D.B. // *RNA*. 2007. V. 13. № 5. P. 704–712.
193. Kawaguchi A., Asaka M.N., Matsumoto K., Nagata K. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8768.
194. Gonda K., Wudel J., Nelson D., Katoku-Kikyo N., Reed P., Tamada H., Kikyo N. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 12. P. 8153–8160.
195. Chang P., Jacobson M.K., Mitchison T.J. // *Nature*. 2004. V. 432. № 7017. P. 645–649.
196. Alemasova E.E., Pestryakov P.E., Sukhanova M.V., Kretov D.A., Moor N.A., Curmi P.A., Ovchinnikov L.P., Lavrik O.I. // *Biochimie*. 2015. V. 119. P. 36–44.
197. Uversky V.N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1834. № 5. P. 932–951.

УДК 577.151.4

Глутамилэндопептидазы: загадка субстратной специфичности

И. В. Демидюк*, К. Н. Чухонцева, С. В. Костров

Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

*E-mail: duk@img.ras.ru

Поступила в редакцию 02.11.2016

Принята к печати 22.02.2017

РЕФЕРАТ Глутамилэндопептидазы (ГЭПазы) – ферменты, относящиеся к структурной группе химотрипсина и предпочитительно гидролизующие связи α -карбокисильных групп глутаминовой кислоты. Несмотря на многолетнюю историю исследований, структурные детерминанты, определяющие строгую субстратную специфичность ГЭПаз, остаются невыясненными. В обзоре обобщены данные о молекулярных механизмах, лежащих в основе субстратных предпочтений ГЭПаз, а также кратко рассмотрены современные направления изучения этих ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глутамилэндопептидаза, протеаза V8, субстратная специфичность, химотрипсиноподобная протеаза, 3С-подобная сериновая протеаза, эпидермолитический токсин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭПаза – глутамилэндопептидаза; ХПП – химотрипсиноподобная протеаза; 3Сpro – 3С протеаза пикорнавируса; 3CLpro – 3С-подобная протеаза; 3CLSP – 3С-подобная сериновая протеаза; BIGEP – ГЭПаза *Bacillus intermedius*; Вос-ААРЕ – *trp*em-бутилоксикарбонил-Ala-Ala-Pro-Glu; EAV-Nsp4 – неструктурный белок 4 вируса инфекционного артериита лошадей; Esp – внеклеточная сериновая протеаза *Staphylococcus epidermidis*; ET – эпидермолитический токсин; ETA и ETB – эпидермолитические токсины А и В *Staphylococcus aureus*; Glu-SGP – ГЭПаза *Streptomyces griseus*; Glu/Gln-P1 – аминокислотный остаток в положении P1 субстрата; Glu-V8 – протеаза V8 *S. aureus*; HAsV-pro – протеаза астровируса человека; PDB ID – номер доступа в Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>); PRRSV-Nsp4 – неструктурный белок 4 вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней; SeMV-pro – протеаза вируса мозаики себани.

ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ – ЧЛЕНЫ СТРУКТУРНОГО СЕМЕЙСТВА ХИМОТРИПСИНА

Глутамилэндопептидазы (ГЭПазы) – ферменты, предпочитительно гидролизующие связи α -карбокисильных групп глутаминовой кислоты [1, 2]. К настоящему времени охарактеризованы ГЭПазы целого ряда грамположительных бактерий [3–22], а также (+)РНК-вирусов [23–25]. Все ГЭПазы входят в структурное семейство химотрипсина – одно из самых обширных и хорошо изученных. Молекулы химотрипсиноподобных протеаз (ХПП) имеют общий принцип пространственной организации, так называемый химотрипсиновый (или трипсиновый) фолд (рис. 1). Ключевым для определения места гидролиза субстрата ХПП является остаток в положении P1 (по номенклатуре Шехтера и Бергера: расщепляемая связь субстрата находится после остатка P1, которому соответствует S1-связывающий сайт фермента [26]). Традиционно, как и в случае панкреатических сериновых протеаз, ХПП, исходя из первичной субстратной специфичности, делят на три основные группы: 1) гидролизующие связи, образованные α -карбокисильными группами крупных гидрофобных

аминокислотных остатков (химотрипсиноподобная специфичность); 2) расщепляющие связи после положительно заряженных остатков (трипсиноподобная специфичность) и 3) предпочитающие малые гидрофобные остатки в положении P1 (эластазоподобная специфичность) [27]. Кроме того, обнаружены ХПП со специфичностью смешанного типа. Например, коллагенолитические ферменты крабов сочетают специфичность трипсина, химотрипсина и эластазы [28], а дуоденаза крупного рогатого скота [29] и катепсин G [30] способны эффективно гидролизовать субстраты как трипсина, так и химотрипсина. Известны ХПП, расщепляющие связи преимущественно после остатка Gln, например, многие 3С-подобные протеазы вирусов [23], а также специфичные к отрицательно заряженным аминокислотным остаткам – гранзим В, предпочитительно гидролизующий связи после остатков Asp [31], и ГЭПазы, которым посвящен данный обзор.

Молекулы ХПП состоят из двух перпендикулярных β -цилиндрических доменов и С-концевой α -спирали (рис. 1). Каталитический и субстратсвязывающий сайты находятся в щели между дву-

мя β -цилиндрами. Функционально существенные остатки локализованы преимущественно в петлях, соединяющих β -тяжи. S1-карман, расположенный рядом с каталитическим остатком Ser(Cys)195 (здесь и далее нумерация по химотрипсину), сформирован участками 189–192, 214–216 и 224–228. В большинстве случаев ключевыми детерминантами субстратной специфичности являются остатки в позициях 189, 216 и 226 [32, 33]. Причем у ферментов, узнающих заряженные остатки в положении P1, в позиции 189 (Asp у трипсина [34]) или 226 (Arg у гранзима В [35], Glu у катепсина G [36], Asp у коллагеназы краба [37] и дуоденазы [38]) находятся остатки-компенсаторы заряда субстрата. Это позволяет полагать, что первичная субстратная специфичность ХПП контролируется относительно небольшим числом структурных элементов сайта S1. Однако простой перенос этих структурных элементов из одной молекулы в другую не приводит к «переключению» субстратной специфичности.

Как показано на примере конверсии трипсина в химотрипсин, на специфичность влияет также целый набор удаленных структурных элементов, не взаимодействующих с субстратом непосредственно. Сайты S1 обоих ферментов сходны. Однако замена главной детерминанты связывания заряженных субстратов трипсина Asp189 на Ser, характерный для химотрипсина, не приводит к возникновению соответствующей специфичности. Вместо этого формируется низкоэффективная неспецифичная протеаза [39]. Создание химотрипсиноподобной специфичности требует замены четырех остатков в S1-кармане вместе с модификацией удаленных от S1-сайта областей: двух поверхностных петель, которые не контактируют с субстратом непосредственно [40], и остатка Tyr172 [41]. Сравнение кристаллических структур и кинетических характеристик полученных вариантов со структурами и каталитическими свойствами химотрипсина и трипсина показывает, что дополнительные модификации существенны не для связывания собственно остатка P1, а для точного позиционирования расщепляемой связи относительно каталитического центра белка: пары Ser195–His57 и оксианионной впадины [40–43].

Таким образом, основываясь на данных о структурных детерминантах субстратной специфичности ХПП, можно ожидать, что предпочтительный выбор ГЭПазами отрицательно заряженных аминокислотных остатков в положении P1 определяется теми же участками полипептидной цепи, что и у других ферментов группы. Причем ключевой структурной детерминантой специфичности, как у всех распознающих заряженные P1-остатки ХПП, должен быть локализованный в S1-кармане компенсатор заряда субстрата.

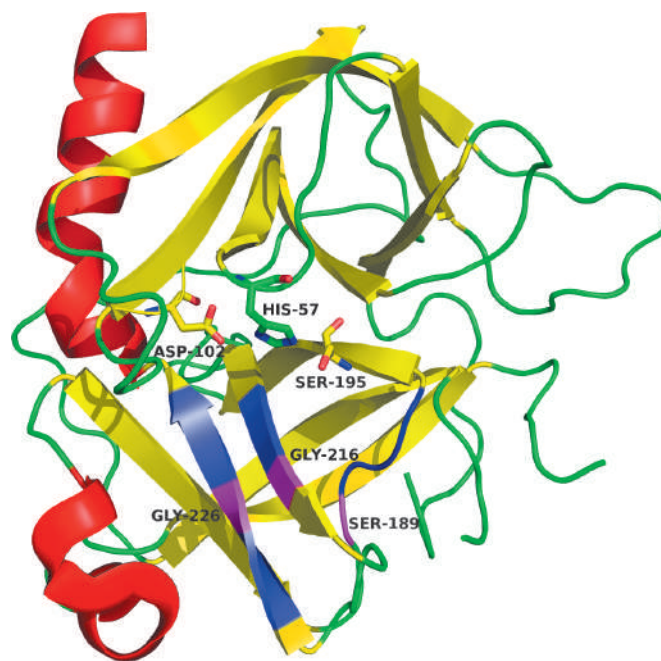


Рис. 1. Пространственная структура химотрипсина (PDB ID – 5cha). Показана структура остатков каталитической триады. Области, формирующие S1-карман, выделены синим цветом; позиции, соответствующие ключевым остаткам S1-кармана, – сиреневым. Все рисунки, содержащие изображения пространственных структур белков, построены с помощью PyMOL Molecular Graphics System (www.pymol.org)

В качестве кандидата на эту роль по аналогии можно предложить остаток Arg или Lys в положении 189 или 226. В то же время следует помнить, что для высокоэффективного взаимодействия с P1-остатком существенно структура регионов, удаленных от S1.

ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗА *STREPTOMYCES GRISEUS*

Первой ГЭПазой, пространственная структура которой была установлена, стала Glu-специфичная протеаза *S. griseus* (Glu-SGP) (PDB ID – 1hpg) [44]. Структура этого фермента в целом типична для ХПП (рис. 2А) и имеет наибольшее сходство с бактериальными ХПП (протеазами А и В из *Str. griseus* и α -литической протеазой). Общая геометрия области S1 также очень близка к геометрии этой области у перечисленных бактериальных ферментов. Вопреки ожиданиям, в структуре S1-сайта не удалось обнаружить явного компенсатора отрицательного заряда субстрата – остатка Lys или Arg. Карбоксильная группа Glu в положении P1 субстрата формирует водородные связи с Ser190 (192 в нумерации [44]), Ser216 и His213. Таким образом, эти остат-

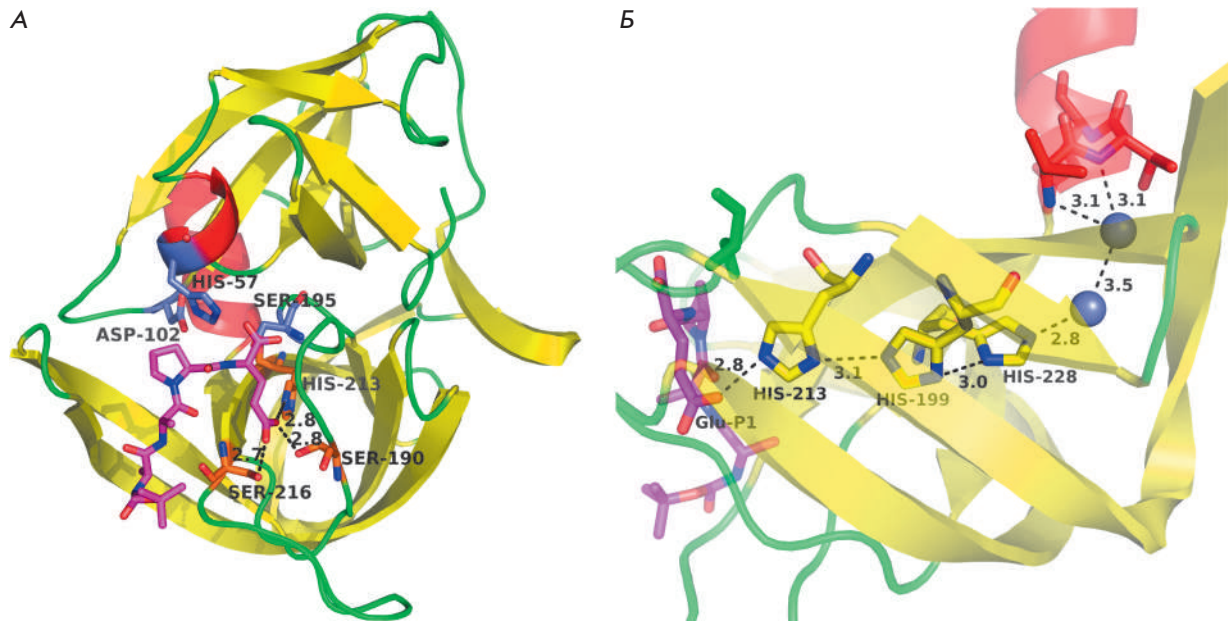


Рис. 2. Пространственная структура глутамилэндопептидазы *Streptomyces griseus* (1hpg). А – общий вид. Б – гистидиновая триада. Фиолетовым цветом выделен лиганд Вос-AAPE (защитная группа не показана); остатки каталитической триады – синим; остатки, непосредственно взаимодействующие с карбоксильной группой Glu-P1, – оранжевым; гистидиновая триада – желтым. Молекулы воды представлены синими сферами. Расстояния приведены в ангстремах

ки, вероятно, играют ключевую роль в узнавании субстрата. Боковая цепь гистидина способна нести положительный заряд. Однако, если считать, что pK_a бокового радикала His213 в отсутствие субстрата равна 6.4, то при pH 8.5, оптимальном для функционирования Glu-SGP, имидазольное кольцо будет протонировано менее чем на 1%, и, следовательно, гистидин должен быть нейтральным [44]. В то же время значение pK_a аминокислотных остатков в белке может существенно варьировать в зависимости от окружения [45].

Анализ структуры Glu-SGP выявил в ней так называемую гистидиновую триаду, в состав которой, кроме His213, входят His199 и His228. Три остатка His пронизывают С-концевой β -цилиндрический домен, формируя цепь водородных связей, соединяющую карбоксильную группу Glu-P1 субстрата и, через связанные с ферментом две молекулы воды, N-концевой обвод С-концевой α -спирали молекулы (рис. 2Б). Постулировалось, что именно эта структура обеспечивает перенос положительного заряда, компенсирующего заряд субстрата, с микрополя α -спирали на His213 субстратсвязывающей области [44]. Отметим, что у глутамилэндопептидаз остатки гистидиновой триады не консервативны [46] и, кроме Glu-SGP, обнаружены лишь у высокомолекулярного фермента из *Str. fradiae* [13].

Роль остатков, формирующих S1-карман и гистидиновую триаду Glu-SGP, была изучена с помощью сайт-направленного мутагенеза. Любые модификации Ser190(192) (Ala/Gly/Asn/Thr/Val) и His213 (Ala/Gly/Lys/Asn/Arg/Ser/Val) приводят к прекращению автокаталитического процессинга (по связи Glu(-1)-Val1) предшественника ГЭПазы, что доказывает принципиальную роль этих остатков в формировании S1-сайта. В то же время Ser216, по-видимому, менее важен, так как его замена на Ala или Gly не приводит к потере ферментом соответствующей активности. Похожий результат наблюдается и при некоторых модификациях остатков гистидиновой триады: мутации His199→Val и His228→Ala/Asp/Asn/Ser/Val не препятствуют процессингу фермента. Все мутантные белки (His199→Val, Ser216→Ala, Ser216→Gly и His228→Ala), специфичность которых была исследована, сохраняли предпочтение к субстратам с Glu-P1 [47]. Итак, гипотеза о важности гистидиновой триады для компенсации заряда не была подтверждена экспериментально, и на ключевые роли в распознавании субстрата вышли остатки Ser190(192) и His213.

Таким образом, с одной стороны, известна структура S1-сайта. С другой стороны, неясно, каким образом формирующие этот сайт элементы могут обеспечивать наблюдаемую субстратную специфич-

ность. Это противоречие становится еще более явным при рассмотрении данных о структуре и специфичности вирусных 3С-подобных сериновых протеаз.

ВИРУСНЫЕ 3С-ПОДОБНЫЕ СЕРИНОВЫЕ ПРОТЕАЗЫ

Процессинг полибелков-предшественников является важной частью жизненного цикла большинства (+)РНК-вирусов [48–50] и обычно осуществляется при участии вирусных папаиноподобных или химо-трипсиноподобных протеаз, которые входят в состав полибелка [51]. Большинство ХПП (+)РНК-вирусов это цистеиновые протеазы, например, 3С протеазы (3Сpro) пикорнавирусов или 3С-подобные протеазы (3СLpro) корона-, поти- или комовирусов [49]. В то же время обнаружены ферменты, активные центры которых содержат каталитический остаток серина. Такие белки обозначаются как 3С-подобные сериновые протеазы (3СLSP) [23]. ХПП (+)РНК-вирусов проявляют узкую субстратную специфичность. Сайты гидролиза 3С и 3С-подобных протеаз в целом похожи и обычно содержат остаток Gln или Glu в позиции P1 в сочетании с расположенным за ним небольшим аминокислотным остатком (Gly, Ala или Ser) [23, 52]. При этом одни протеазы гидролизуют связи, образованные как Gln, так и Glu [53–57]. Другие ферменты предпочитают Gln-P1 (например, 3Сpro и 3СLpro пикорна- и коронавируса [23, 48]) или являются истинными ГЭПазами, расщепляющими полипептидную цепь после Glu. Такую специфичность проявляют ХПП артери- [23], собемо- [25] и астровирусов [24].

ГЭПазы артеривирусов, обозначаемые как Nsp4 (неструктурный белок 4) [23], являются сериновыми протеазами [58, 59]. К настоящему времени изучены свойства и установлены пространственные структуры Nsp4 вируса артериита лошадей (EAV) и вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV). Пространственная структура EAV-Nsp4 в целом типична для ХПП (PDB ID – 1mbm). В то же время каталитический домен фермента, сформированный двумя перпендикулярными β-цилиндрами, дополнен С-концевым расширением (рис. 3А) [60]. Структура PRRSV-Nsp4 (PDB ID – 3fan) сходна со структурой EAV-Nsp4, заметно отличаясь, однако, взаимным расположением каталитического и С-концевого доменов (рис. 3Б) [59].

Организация S1-участков EAV-Nsp4 и Glu-SGP очень близка (рис. 4А). Карман S1 содержит те же три основных структурных элемента: His213 (134 в EAV-Nsp4, 1198 в полибелке), Thr190 (115, 1179), соответствующий Ser190 у Glu-SGP, и Ser216 (137, 1201) [60]. Все три остатка сохранены и в первичной структуре PRRSV-Nsp4 [58, 59]. Однако, судя по результатам рентгеноструктурного анализа, S1-сайт последнего

фермента имеет иную, чем у EAV-Nsp4 и Glu-SGP, структуру (рис. 4Б). Положение участка полипептидной цепи 190–194 (113–117 в PRRSV-Nsp4) изменено по сравнению с большинством ХПП, что приводит к нетипичной конфигурации оксианионной впадины и существенному удалению Thr190 (113) от карбоксильной группы Glu-P1. Кроме того, методом рентгеноструктурного анализа не удается определить положение содержащей Ser216 петли 216–220 (136–140), что свидетельствует о высокой подвижности этого участка. Расположение наиболее консервативного остатка S1-участка – His213 (133) в трех упомянутых белках не отличается [59]. Возможно, наблюдаемая картина не отражает состояние PRRSV-Nsp4 в растворе, а представляет артефакт кристаллизации свободного фермента.

Важность остатков His213 и Thr190 для функционирования EAV-Nsp4 подтверждена экспериментально по сайт-направленному мутагенезу. Путем модификации остатков каталитической триады показано, что процессинг полибелка с расщеплением связей после остатков Glu зависит от активности EAV-Nsp4. К полному прекращению процессинга приводили и модификации His213(1198)→Lys/Arg/Tyr. Тот же эффект вызывала замена Thr190(1179)→Asp, однако мутации Thr190(1179)→Ser/Gly лишь несколько снижали эффективность процессинга [58]. В совокупности с данными, полученными на модели Glu-SGP, эти результаты показывают принципиальное значение His213 и существенно меньшую важность остатков в позициях 190 и 216 для гидролиза специфических субстратов ГЭПазами. В то же время остается неясным, является ли His213 ключевым элементом в распознавании заряженного субстрата, а также какой вклад в формирование субстратной специфичности вносят Thr/Ser190 и Ser216. Помочь разобраться с некоторыми из этих вопросов может анализ структур других вирусных ГЭПаз.

Протеаза вируса мозаики себании (SeMV-pro) имеет типичную для ХПП пространственную структуру (PDB ID – 1zyo), которая ближе к структурам клеточных (в частности, Glu-SGP), а не вирусных представителей семейства (рис. 3В) [61]. Протеаза имеет классическую каталитическую триаду, модификация остатков которой приводит к прекращению процессинга полибелка [62]. В структуре S1-участка фермента сохранены, как и у всех ГЭПаз, консервативные остатки His213(298) и Thr190(279). Однако позицию 216(301) занимает крупный гидрофобный остаток Phe (рис. 4Б). Наложение пространственных структур SeMV-pro и Glu-SGP в комплексе с тетрапептидным продуктом протеолиза *трет*-бутилоксикарбонил-Ala-Ala-Pro-Glu (Вос-ААРЕ) показывает, что боковой радикал остатка

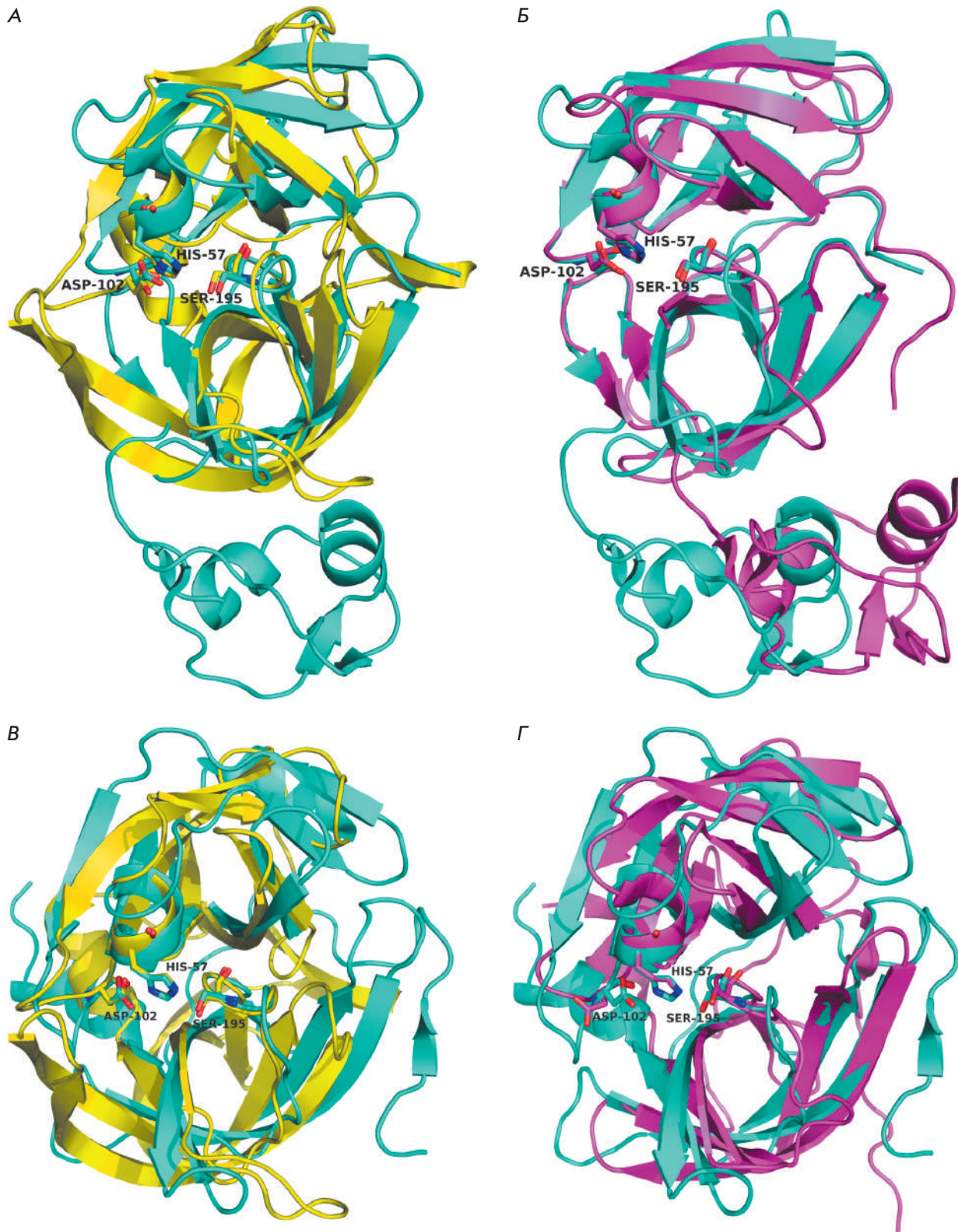


Рис. 3. Пространственные структуры вирусных глутамилэндопептидаз. А – EAV-Nsp4 (PDB ID – 1mbm; голубой) и Glu-SGP (1hrq; желтый). Б – EAV-Nsp4 (голубой) и PRRSV-Nsp4 (3fan; сиреневый). В – Glu-SGP (желтый) и SeMV-pro (1zyo; голубой). Г – SeMV-pro (голубой) и HAsV-pro (2w5e; сиреневый). Обозначены остатки каталитической триады

Glu-P1 хорошо вписывается в S1-карман вирусной протеазы. Сохранение объема S1-кармана при наличии остатка с крупным боковым радикалом требует существенного смещения основной цепи белка на участке 214(299)–223(308) и заполнения образовавшегося в результате этого смещения пространства боковой цепью остатка Asn223(308), который участвует в формировании дна S1-кармана, но, по-видимому, с Glu-P1 непосредственно не взаимодействует (рис. 4B). Эта ситуация показывает, что Ser в положении 216 и водородная связь остатка 216 с γ -карбоксильной группой Glu-P1 не принципиальны для обеспечения глутаматной специфичности. К сожалению, экспериментов по модификации Phe216(301) в составе SeMV-pro не проводилось. В то же время замены His213(298) и Thr190(279) на Ala, но не мутация Asn223(308)→Ala, полностью подавляют процессинг *in cis* слитого белка SeMV-pro/VPg (VPg – вирусный белок, который находится в полибелке за SeMV-pro) в модельной системе [61].

Субстратная специфичность протеазы астровируса человека (HAstV-pro) мало изучена. Данные о сайтах процессинга вирусного полибелка, осуществляемого этим ферментом, противоречивы [63]. Вместе с тем, с использованием рекомбинантного фермента и набора синтетических субстратов *in vitro* показано, что HAstV-pro гидролизует только связи, образованные α -карбоксильными группами Glu и Asp [24]. Пространственная структура HAstV-pro (PDB ID – 2w5e) в целом близка к структуре SeMV-pro (рис. 3Г), но имеет ряд специфических особенностей. Так, остаток Asp102 (489 в полибелке) каталитической триады, в которую входят также Ser195(551) и His57(461), имеет неканоническую конформацию [24].

Структура участка S1 также заметно отличается от рассмотренных выше. Несмотря на то что остаток His213 и его положение инвариантны, в позиции 216 вместо Ser находится Asn216(569), амидная группа которого, как показывает наложение структур HAstV-pro и Glu-SGP в комплексе с лигандом, практически занимает место γ -карбоксильной группы субстрата Glu-P1 (рис. 4Г). Это приводит к существенному уменьшению кармана S1 [24], объем которого не соответствует боковому радикалу Glu. Кроме того, конформация участка 189–193 (545–549) основной цепи иная, чем у большинства ХПП. Как следствие, консервативный остаток Thr190 удален от S1-сайта и развернут в сторону. (Положение участка 189–193 напоминает конфигурацию этого региона в PRRSV-Nsp4.) Учитывая описанные отличия от структур других ГЭПаз и ХПП, сложно сделать какие-либо определенные выводы о взаимодействиях HAstV-pro с остатком P1 субстрата.

Обобщая данные о вирусных ГЭПазах и Glu-SGP, можно заключить, что His213 является общим элементом S1-кармана, а его модификация во всех случаях приводит к инактивации ферментов. Этот остаток способен нести положительный заряд и поэтому представляется кандидатом на роль ключевого структурного элемента, определяющего субстратные предпочтения Glu-специфичных протеаз. Остаток Thr/Ser190 также консервативен у всех ГЭПаз, однако его модификация не приводит к потере ферментами специфической активности, и, вероятно, он не играет принципиальной роли в распознавании остатка Glu-P1 субстрата. Наконец, природа остатка 216 несущественна для обеспечения субстратной специфичности. Как следствие, в этой позиции у ГЭПаз обнаружены остатки, сильно отличающиеся по свойствам: Ser, Asn и Phe. Дополнительную информацию о структурных детерминантах субстратной специфичности ГЭПаз может дать анализ вирусных ЗС и ЗС-подобных протеаз, проявляющих специфичность к Gln в положении P1.

Сравнение первичных и пространственных структур ГЭПаз и ЗС/ЗСLpro выявляет сходство их S1-участков (рис. 4Д,Е). Во-первых, все ЗС/ЗСLpro, так же как и ГЭПаза, содержат консервативный остаток His213 [64–76], модификации которого приводят к инактивации ферментов [77–79]. Это позволяет заключить, что данный остаток не является ключевым элементом распознавания заряда субстрата, но принципиален для обеспечения корректной геометрии S1-сайта. Во-вторых, большинство ЗС/ЗСLpro сохраняют характерный для ГЭПаз остаток Thr/Ser190 [58], что подтверждает вывод о его важности для формирования правильной геометрии S1-кармана, а не для распознавания заряда. На месте третьего элемента S1-участка ГЭПаз, в положении 216, у ЗС/ЗСLpro, как правило, находятся остатки Gly (рис. 4Е) и иногда Ala (рис. 4Д), которые не встречаются у известных ГЭПаз. Последнее стало основанием для рассуждений об участии Ser216 в компенсации заряда субстрата у ГЭПаз [60]. Однако мутагенез на модели Glu-SGP показывает, что замены Ser216→Ala/Gly не делают субстраты с Gln-P1 предпочтительными, хотя и увеличивают эффективность их гидролиза [47]. Кроме того, обсуждавшиеся данные о ГЭПазах с остатками Phe/Asn216 также не свидетельствуют в пользу подобных предположений. Следует упомянуть еще об одной гипотезе, которая до сих пор остается непроверенной. Поскольку все ГЭПаза являются сериновыми, а Gln-специфичные ферменты – цистеиновыми протеазами, можно предположить, что различие в их субстратной специфичности определяется каталитическими остатками.

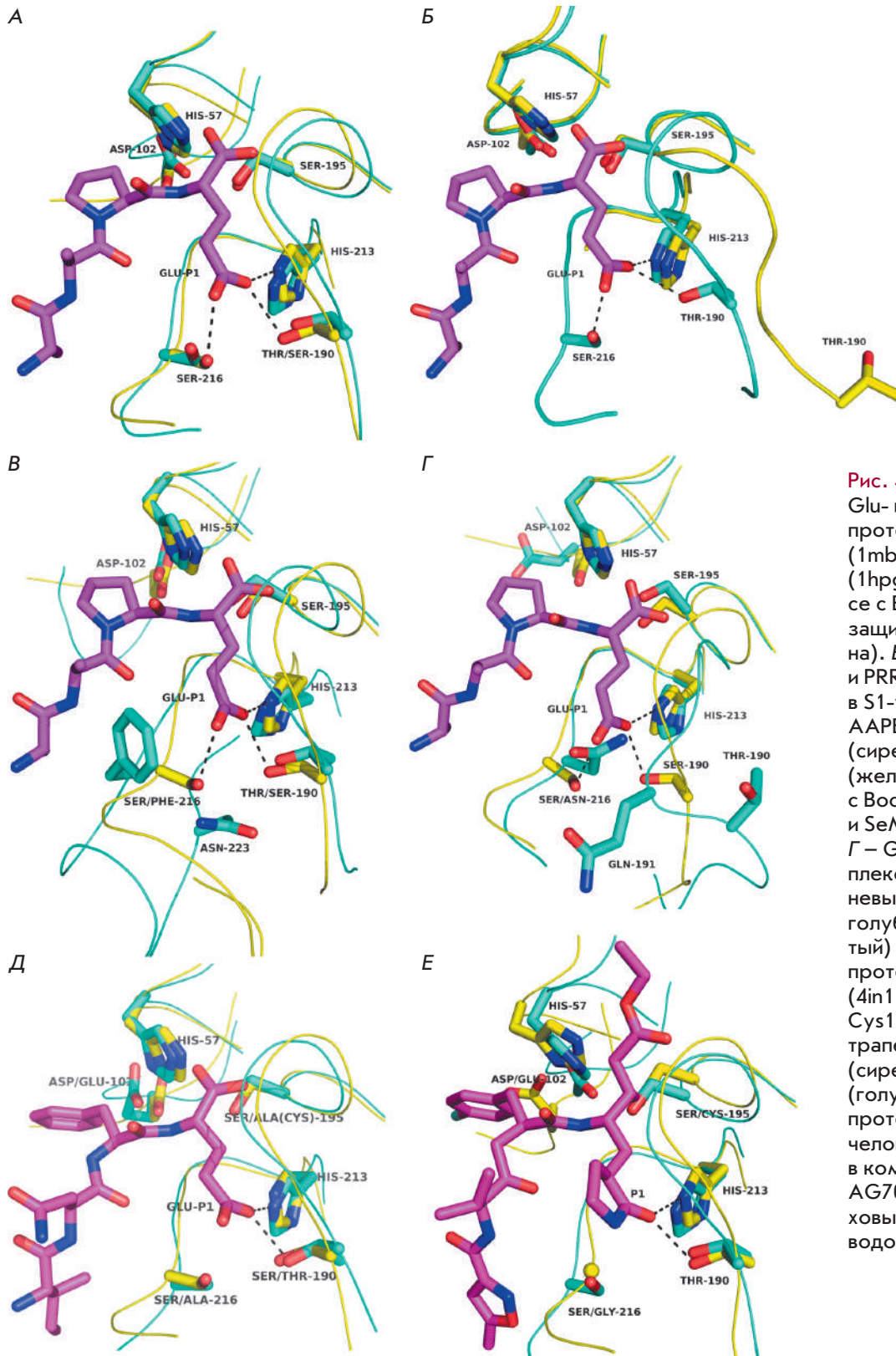


Рис. 4. S1-участки вирусных Glu- и Gln-специфичных протеаз. А – EAV-Nsp4 (1mbm; голубой) и Glu-SGP (1hpq; желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый, защитная группа не показана). Б – EAV-Nsp4 (голубой) и PRRSV-Nsp4 (3fan; желтый), в S1-участок вписан Voc-AAPE из структуры Glu-SGP (сиреневый). В – Glu-SGP (желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый) и SeMV-pro (1zuq; голубой). Г – Glu-SGP (желтый) в комплексе с Voc-AAPE (сиреневый) и HAsV-pro (2w5e; голубой). Д – Glu-SGP (желтый) и Gln/Glu-специфичная протеаза вируса Норуолк (4in1; голубой) с заменой Cys195→Ala в комплексе с тетрапептидом Ile-Asn-Phe-Glu (сиреневый). Е – EAV-Nsp4 (голубой) и Gln-специфичная протеаза 3С риновируса человека (1сqq, желтый) в комплексе с ингибитором AG7088 (сиреневый). Штриховые линии обозначают водородные связи

Итак, ни один из обнаруженных консервативных структурных элементов S1 участка Glu-SGP и вирусных 3CLSP, по-видимому, не определяет предпочтения этих ферментов к остатку Glu в положении P1 субстрата. Следовательно, такая специфичность ГЭПаз вирусов и стрептомицетов обеспечивается структурными детерминантами, не находящимися непосредственно в субстратсвязывающей области. Однако традиционный путь исследований, сочетающий анализ пространственных структур, сайт-направленный мутагенез и изучение каталитических свойств ферментов, до настоящего времени не позволил выявить эти детерминанты. Более успешными кажутся исследования ГЭПаз бактерий.

ЭПИДЕРМОЛИТИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ СТАФИЛОКОККОВ

Стафилококки продуцируют два типа ГЭПаз: ферменты, сходные с протеазой V8 *Staphylococcus aureus* (Glu-V8), о которых пойдет речь в следующем разделе, и эпидермолитические токсины (ЕТ). ЕТ являются основными факторами вирулентности, отвечающими за развитие буллезного импетиго и его генерализованной формы – стафилококкового синдрома ошпаренной кожи, а также сходных заболе-

ваний животных [80, 81]. Биологическая активность ЕТ связана с их способностью с высокой специфичностью гидролизовать связь Glu381-Gly в десмоглине 1 – десмосомальном белке кадгенинового типа, обеспечивающем межклеточные взаимодействия (более подробно см. обзор [80]). Кроме того, *in vitro* ЕТ расщепляют эфирные связи, образованные карбоксильными группами остатков Glu [82].

Пространственные структуры эпидермолитических токсинов А [83, 84] и В [85] из *S. aureus* указывают на принадлежность ЕТ к ХПП (рис. 5). В то же время эти белки обладают уникальными особенностями. Первая из них – N-концевая α -спираль. Вторая – необычное положение остатков, формирующих оксианионную впадину: пептидная связь Pro/Val192-Gly193 (нумерация по химотрипсину) развернута на 180° по сравнению с другими ХПП. Это приводит к формированию водородной связи между карбонильным кислородом остатка 192 и гидроксильной группой каталитического Ser195, что, по-видимому, препятствует проявлению активности. На основе анализа структур высказано предположение, что связывание ЕТ с субстратом (или рецептором), в которое вовлечена N-концевая α -спираль, приводит к перестройке активного центра и активации ферментов [83].

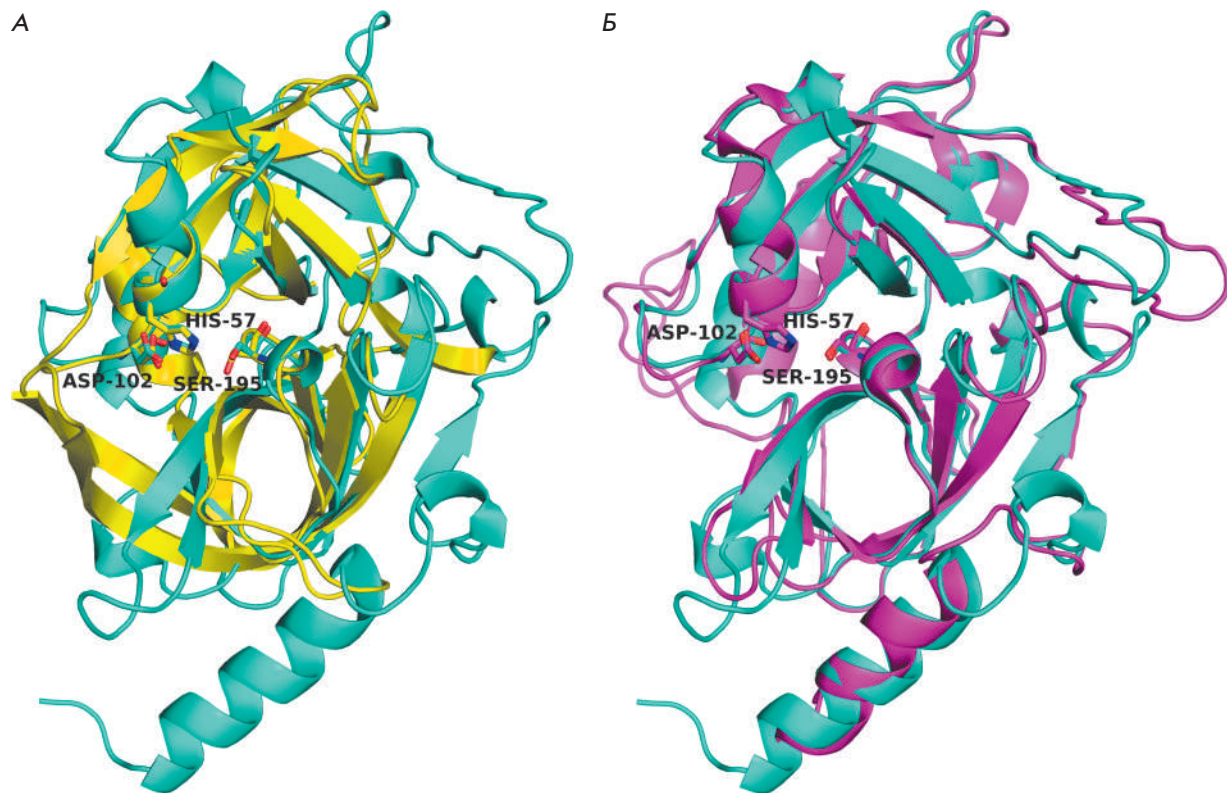


Рис. 5. Пространственные структуры эпидермолитических токсинов *S. aureus*. А – ЕТА (1agj; голубой) и Glu-SGP (1hrj; желтый). Б – ЕТА (голубой) и ЕТВ (1qtf; сиреневый). Обозначены остатки каталитической триады

Как у всех обсуждавшихся выше ГЭПаз, S1-карманы ET содержат три ключевых элемента, два из которых – консервативные остатки His213 и Thr190 (рис. 6). Третьим, как предсказано ранее на основе моделирования пространственных структур [46], является идеально подходящий на роль компенсатора отрицательного заряда Glu-P1 остаток Lys в позиции 216, где у других ГЭПаз обычно находится Ser. Остаток Lys консервативен у большинства ET *S. aureus* и *S. hyicus*, а у ExhA (ET из *S. hyicus*) в положении 216 обнаружен Arg [86, 87]. Важность Lys216 для гидролиза субстратов с остатком Glu подтверждена экспериментами по сайт-направленному мутагенезу, выполненными на модели ETA [88]. Любая из замен Lys216→Ala/Glu/Thr аналогично мутациям по остаткам каталитической триады приводила к потере белком способности гидролизовать α-фениловый эфир N-Вос-L-глутаминовой кислоты и утрате эпидермолитической активности.

Итак, в случае ET положительно заряженный остаток, вероятный компенсатор заряда субстрата, удается обнаружить непосредственно в S1-участке, причем в положении 216, важном для распознавания субстрата всеми ХПП. Этот компенсатор принципиален для проявления ET ферментативной активности. В то же время прямые доказательства того, что Lys/Arg216 у ET отвечает за глутаматную специфич-

ность, в настоящее время отсутствуют. При этом S1-сайты ET, за исключением Lys216, очень похожи на соответствующие области ГЭПаз вирусов и стрептомицетов (рис. 6). Однако приведенные выше данные указывают на то, что остаток в положении 216 не существен для обеспечения субстратной специфичности этих ферментов. Тогда следует заключить, что разные группы ГЭПаз имеют разные механизмы распознавания субстрата. У ET ключевым является стандартный компенсатор заряда в S1-кармане, у ферментов вирусов и стрептомицетов – какой-то другой удаленный структурный элемент. Такой вывод подкрепляется данными, полученными для других бактериальных ГЭПаз.

ДРУГИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ

Кроме ГЭПаз стрептомицетов и ET охарактеризован целый ряд протеаз, секретируемых грамположительными бактериями и обладающих общими структурными особенностями. Проведенное на ранних этапах изучения ГЭПаз моделирование пространственных структур относящихся к этой группе Glu-V8, ГЭПаз *Bacillus licheniformis* и *B. subtilis* привело к предположению, что компенсацию заряда субстрата у всех трех белков обеспечивает α-аминогруппа остатка в положении 1 зрелого фер-

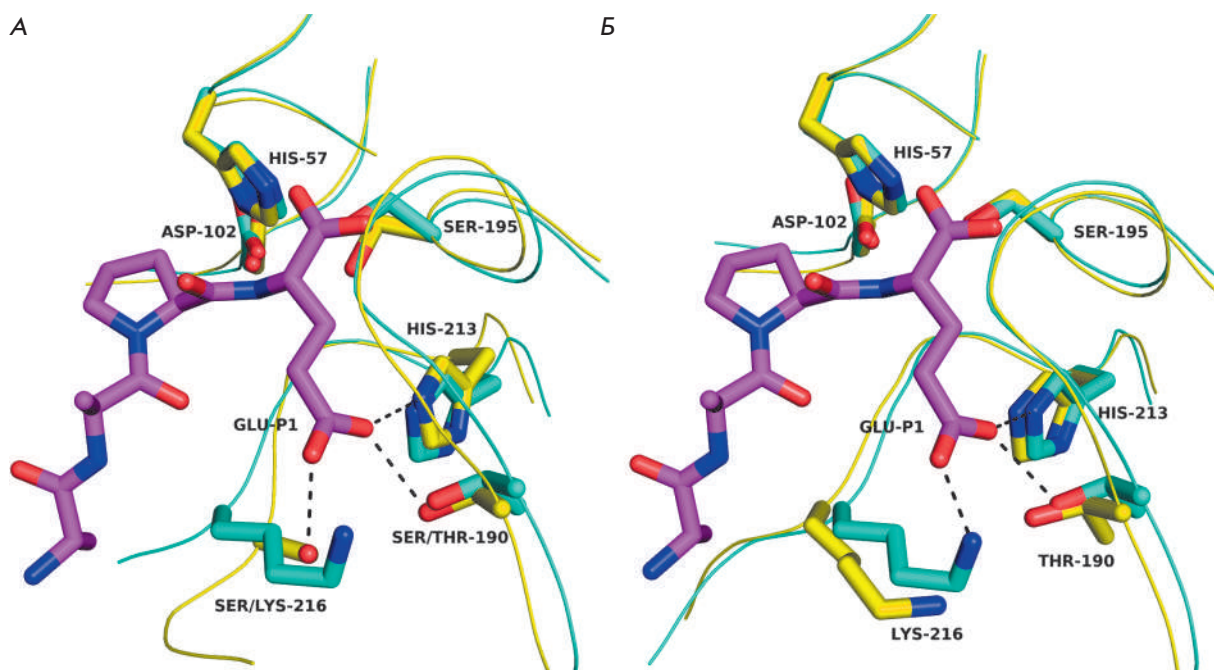


Рис. 6. S1-участки эпидермолитических токсинов *S. aureus*. А – ETA (1agj; голубой) и Glu-SGP (1hpg; желтый) в комплексе с Вос-ААРЕ (сиреневый, защитная группа не показана). Б – ETA (голубой) и ETB (1qtf; желтый), в S1-участок вписан лиганд Вос-ААРЕ из структуры Glu-SGP (сиреневый). Штриховые линии обозначают водородные связи

мента [46]. Сегодня локализация N-концевого остатка в S1-участке ГЭПаз этой группы подтверждена экспериментальными данными о третичных структурах ГЭПазы *B. intermedius* (BIGEP) [89], Glu-V8 [90] и внеклеточной сериновой протеазы *S. epidermidis* (Esp) [91].

Обсуждаемые белки обладают высоким структурным сходством между собой, а также с ET стафилококков, и имеют типичное для ХПП строение. Их молекулы состоят из двух β -доменов, разделенных глубокой щелью, в которой расположен активный центр (рис. 7). Участки S1 у Glu-V8, BIGEP и Esp в целом организованы сходно с аналогичными регионами других ГЭПаз и содержат обязательные элементы: His213 и Ser/Thr190 (рис. 8А,Б). В то же время в третьей ключевой позиции S1-кармана находится остаток Gly, что, как обсуждалось выше, является особенностью вирусных Gln-специфичных 3С- и 3СLpro. Однако отсутствие бокового радикала, способного формировать водородную связь с кислородом карбоксильной группы субстрата, у остатка в позиции 216 компенсируется, как и было предсказано, α -аминогруппой Val1, которая занимает место, соответствующее положению ϵ -аминогруппы остатка Lys216 у ET (рис. 8В). Таким образом, в случае Glu-V8, BIGEP и Esp, по-видимому, наблюдается уникальная ситуация, когда специфичность протеазы определяется N-концом полипептидной цепи. Своеобразие такого «конструктивного решения» состоит в том, что Glu-V8, BIGEP и Esp синтезируются клеткой в виде предшественников, включающих, кроме каталитической части, сигнальный пептид и пропептид. Следовательно, N-конец зрелого белка, а значит, и S1-карман формируются только после процессинга. Эта ситуация напоминает механизм активации ХПП млекопитающих: после удаления пропептида N-концевая NH_2 -группа зрелого белка образует солевой мостик с остатком Asp194, что индуцирует структурные перестройки молекулы фермента, приводящие к его активации благодаря формированию корректной структуры S1-участка и оксианионной впадины [92–96].

Направленная модификация остатков S1-участков BIGEP и Glu-V8 дала очень интересные результаты. Прежде всего, был впервые исследован вариант ГЭПазы с модификацией остатка His213. (Подобные мутации вводили и ранее [47, 58], но получить белки не удалось.) Показано, что BIGEP с заменой His213 (186 в BIGEP) на Thr не изменяет субстратных предпочтений и гидролизует белковый субстрат только после остатков Glu. В то же время модификация существенно влияет на эффективность катализа (k_{cat} снижается более чем в 600 раз), но при этом относительно мало сказывается на связывании субстрата

(K_M возрастает примерно в 5 раз) [97]. Интересно, что подобный эффект наблюдается в случае гидролиза нативными ГЭПазами субстратов, содержащих остаток Asp в положении P1: K_M растет примерно в 6 раз, а падение k_{cat} имеет тот же порядок (~150 раз) [98]. Полученные результаты позволяют заключить, что консервативный остаток His213 не является ключевым элементом, определяющим распознавание отрицательного заряда субстрата ГЭПазами, но, по-видимому, существен для точного позиционирования расщепляемой связи относительно нуклеофила – кислорода гидроксильной группы Ser195. Этот вывод хорошо согласуется с тем, что His213 является общим структурным элементом для Glu- и Gln-специфичных протеаз.

Данные о роли N-концевого остатка в функционировании ГЭПаз получены на модели Glu-V8. Показано, что замена N-концевого Val на Leu/Ala/Phe/Gly/Ser приводит к снижению эффективности гидролиза субстратов с остатком Glu в примерно 3, 20, 50, 100 и 200 раз соответственно [9, 99], и чем ближе остаток по своим свойствам к Val, тем меньше снижение активности. Этот результат свидетельствует о важности остатка 1 для функционирования фермента и может быть объяснен различным отклонением положения α -аминогруппы этого остатка у мутантов от оптимального. Кроме того, удалось получить варианты Glu-V8 с дополнительными аминокислотными остатками, фрагментами пропептида, на N-конце. Введение дополнительных остатков (от 1 до 39) во всех случаях приводило к значительному падению активности фермента при гидролизе субстратов с Glu-P1 [9, 100], но в меньшей степени влияло на эффективность гидролиза аналогичных субстратов с Gln-P1. При этом мутанты сохраняли предпочтение к субстратам с Glu-P1, которые они гидролизировали примерно в 10–20 раз эффективнее [100]. Таким образом, вероятно, α -аминогруппа N-концевого остатка Val вносит очень существенный вклад в узнавание заряженного субстрата обсуждаемыми бактериальными ГЭПазами, но не определяет специфичность ферментов полностью.

Обобщая всю имеющуюся информацию о ГЭПаз, можно сделать вывод о различиях в механизмах распознавания заряженного субстрата ферментами разных групп. Вероятно, это свидетельствует о том, что на эволюционном древе ХПП ветви ГЭПаз возникали несколько раз, возможно, на основе базовой структуры S1-кармана, одинаково хорошо подходящей для реализации как глутаматной, так и глутаминовой специфичности, и наиболее близкой, по-видимому, к структуре S1-областей вирусных ферментов. Необходимость реализации нескольких структурных вариантов оптимизации специфично-

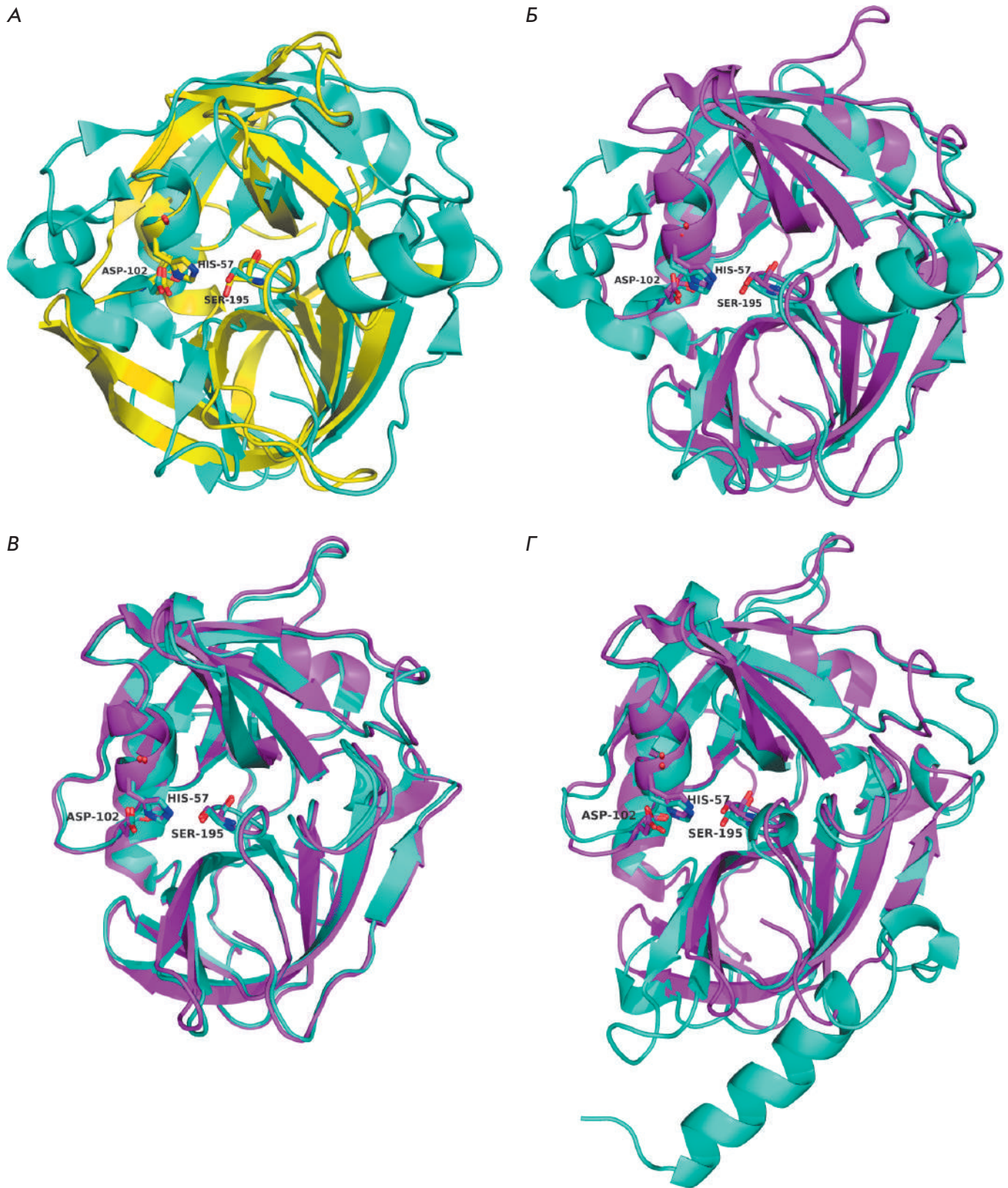


Рис. 7. Пространственные структуры бактериальных глутамилэндопептидаз. А – BIGEP (1p3c; голубой) и Glu-SGP (1hpg; желтый). Б – BIGEP (голубой) и Glu-V8 (1qy6; сиреневый). В – Glu-V8 (сиреневый) и Esp (4jcn; голубой). Г – Glu-V8 (сиреневый) и ETA *S. aureus* (1agj; голубой). Обозначены остатки каталитической триады

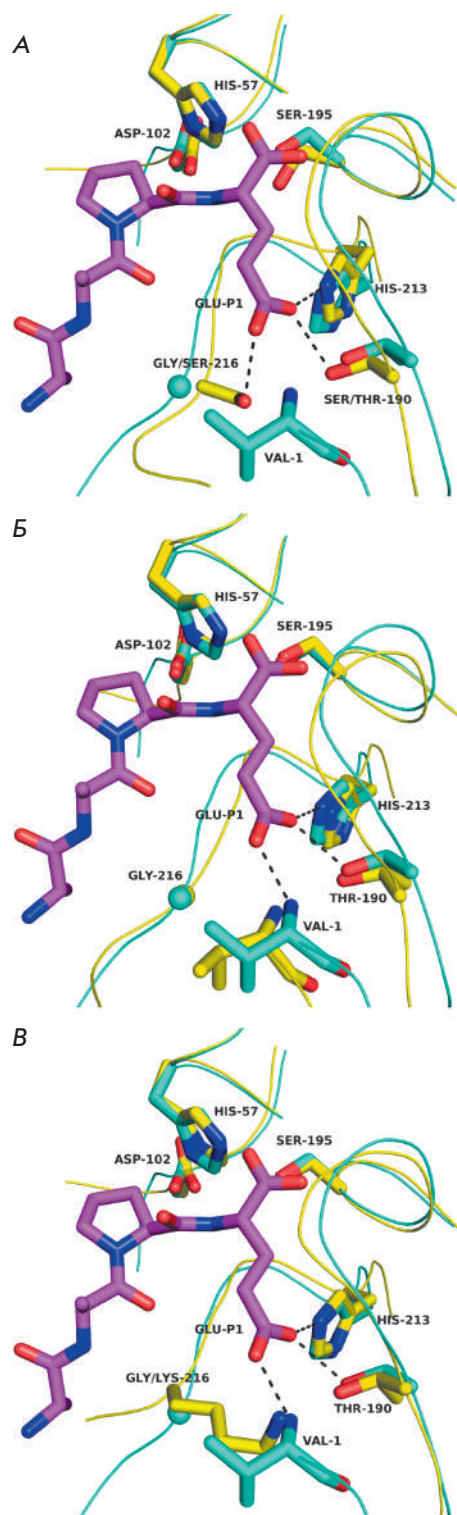


Рис. 8. S1-участки бактериальных глутамилэндопептидаз. А – BIGEP (1r3c; голубой) и Glu-SGP (1hrq; желтый) в комплексе с Boc-AAPE (сиреневый, защитная группа не показана). Б – BIGEP (голубой) и Glu-V8 (1qy6; желтый). В – BIGEP (голубой) и ETA (1agj; желтый). На частях Б и В в S1-сайт вписан лиганд Boc-AAPE из структуры Glu-SGP (сиреневый). Пунктирные линии обозначают водородные связи

сти очевидно должна быть обусловлена отличиями в функционировании протеаз, относящихся к разным группам. Анализ опубликованных данных о ГЭПазах позволяет обнаружить, что вариации в структуре S1-участков этих ферментов коррелируют с различиями в механизмах созревания их предшественников. Такое наблюдение позволяет выдвинуть гипотезу о том, что способ компенсации заряда диктуется путем созревания белка-предшественника.

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ СУБСТРАТНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ И СОЗРЕВАНИЕ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ГЛУТАМИЛЭНДОПЕПТИДАЗ

Все ГЭПазы синтезируются в виде предшественников. Однако механизмы процессинга ферментов существенно различаются и могут быть разделены на три группы. ГЭПазы стрептомицетов и вирусов процессируются автокаталитически [47, 51]. Предшественники ET содержат только секреторный лидер [3] и, следовательно, процессируются сигнальной пептидазой. В случае же бактериальных ГЭПаз, подобных Glu-V8 и BIGEP, удаление пропептида, за единственным исключением [21], осуществляется различными протеазами гетерокаталитически [22, 100–104]. Сопоставление структур S1-участков ГЭПаз и механизмов процессинга показывает, что у автоактивирующихся ферментов в S1-кармане не удастся обнаружить явного компенсатора заряда субстрата, для S1-участка ET характерно наличие остатка Lys216, а для ГЭПаз, сходных с Glu-V8 и процессирующихся гетерокаталитически, – α -аминогруппы N-концевого остатка. Рассмотрим эти соответствия с точки зрения биологических функций протеаз каждой группы.

Вирусные ГЭПазы синтезируются как часть протяженного полибелка, селективный гидролиз которого является основной функцией данных ферментов [25, 51, 105, 106]. Таким образом, вирусные ГЭПазы функционируют внутри клетки, начиная действовать сразу после синтеза полибелка. Следовательно, активный центр фермента, включая определяющие специфичность участки, должен быть сформирован и способен осуществлять высокоспецифический гидролиз уже в составе полибелка-предшественника, сохраняя структуру после процессинга. Функционирование ГЭПаз стрептомицетов кажется существенно иным. Эти внеклеточные ферменты синтезируются как классические предшественники протеаз, содержащие препептид. Функции пропоследовательностей ГЭПаз стрептомицетов не установлены, однако по аналогии с близкородственной протеазой В из *Str. griseus* [107, 108] можно полагать, что пропептиды обеспечивают кинетическую стабильность зрелых молекул и участвуют

в их секреции. В то же время автокаталитический процессинг и отсутствие видимой регуляции активности на посттрансляционном уровне делают ситуацию сходной с описанной для вирусных ферментов: активный центр должен быть полностью сформирован в составе предшественника и сохраняться неизменным после образования зрелой молекулы. Эта задача в обоих случаях, по-видимому, имеет одно структурное решение (рис. 4). В S1-кармане нет прямого компенсатора заряда. N-Конец удален от активного центра в зрелом белке и, следовательно, не участвует в формировании S1-участка, так как вовлечен в процессинг. Не установленные до настоящего времени структурные элементы, отвечающие за глутаматную специфичность, локализованы вне S1-области и, вероятно, формируются до процессинга предшественника. Таким образом, изменяющиеся в ходе созревания элементы структуры не участвуют в образовании значимых для катализа регионов молекулы.

Противоположная ситуация наблюдается в случае синтезируемых в виде препробелков ГЭПаз, подобных Glu-V8. Эти протеазы не только подвергаются гетероактивации [101–103, 109], но и, как показано на примере Glu-V8, вовлечены в регуляторные активационные каскады [110–112]. Это предполагает строгий контроль активности, который реализуется достаточно сложным и в чем-то противоречивым способом. На первый взгляд, предшественники Glu-V8, BIGEP и Esp должны быть неактивны, поскольку S1-участок у этих белков формируется только в зрелой молекуле (рис. 7 и 8). В то же время опубликованы данные, которые показывают, что предшественники Glu-V8 [113], BIGEP [109], Esp [7], а также ГЭПаз *B. licheniformis* [114], *B. subtilis* [102] и *Thermoactinomyces* sp. [21] способны к автопроцессингу, причем в большинстве случаев гидролизу подвергаются связи, соответствующие специфичности зрелых ферментов [7, 21, 109, 114]. Кроме того, обнаружена глутаматная активность *in trans* аналогов предшественников [100]. Эти факты ставят под сомнение саму возможность управления активностью обсуждаемых протеаз, однако внимательный анализ пути активации предшественников показывает, что ситуация более сложная.

Автопроцессинг, возможно внутримолекулярный, нативных ферментов, проходящий спонтанно как *in vitro*, так и *in vivo*, приводит не к полному удалению пропоследовательности, а к формированию форм белков с «обрезками» пропептидов (обычно протяженностью 3–15 аминокислотных остатков) [7, 100, 109, 113, 114], т.е. соответствующих по размеру пропептидам ХПП млекопитающих. Эти формы не проявляют активности по отноше-

нию к белковым субстратам (а также малоактивны по отношению к пептидам) *in trans* и могут быть активированы только гетерокаталитически [7, 100, 109, 113, 114]. (Для полноты картины следует отметить, что недавно опубликованы данные о ферменте *Thermoactinomyces* sp. с остатком Glu в положении -1, который способен к автоактивации в гетерологичной экспрессионной системе *in vitro* [21], как и полученные ранее искусственно мутанты других ГЭПаз [109, 114].) Таким образом, созревание ферментов, сходных с Glu-V8, происходит ступенчато. По-видимому, эти белки содержат как бы два пропептида. Первый, протяженный фолдинг-ассистент [99, 109], обеспечивающий кинетическую стабильность зрелого белка, как это часто бывает у бактериальных протеаз [115]. Второй – короткий, формирующийся после первого акта процессинга, – активационный модуль [109, 113, 114], поддерживающий фермент в неактивном состоянии. Нельзя исключить также, что структура активного центра протеаз меняется после удаления первой части пропептида. Можно сказать, что пропептиды ГЭПаз описываемой группы одновременно сочетают в себе свойства, типичные для пропептидов бактериальных ХПП и ферментов млекопитающих. Таким образом, необходимость строгого контроля активности ферментов, подобных Glu-V8, обеспечивается за счет формирования полноценного S1-кармана только после удаления пропептида. Для этого используется механизм, сходный с механизмом активации ХПП млекопитающих, – участие N-концевой аминокислотной группы в структуре существенных для катализа элементов молекулы. Но удаление фолдинг-ассистента при этом происходит автокаталитически за счет базовой специфичности ферментов.

ЕТ стафилококков представляют собой промежуточный вариант. С одной стороны, их предшественники процессируются гетерокаталитически. С другой стороны, процессинг не связан с регуляцией активности, поскольку заключается лишь в удалении сигнального пептида. Таким образом, формирование функционально активного фермента до процессинга, как и строгий контроль активности, очевидно, не являются необходимыми. Здесь, по-видимому, подошел бы вариант, реализованный у ГЭПаз вирусов и стрептомицетов. Однако филогенетический анализ показывает, что ЕТ с наибольшей вероятностью представляют собой паралоги Glu-V8 (рис. 9, см. обсуждение ниже), т.е. эти белки «созданы» на одной базе с Glu-V8 и, по существу, используют ту же схему строения S1-участка (рис. 8). В то же время, в отличие от Glu-V8, ЕТ не содержат пропептидов, что указывает на иной путь сворачивания [115], и имеют значительно более узкую специфичность.

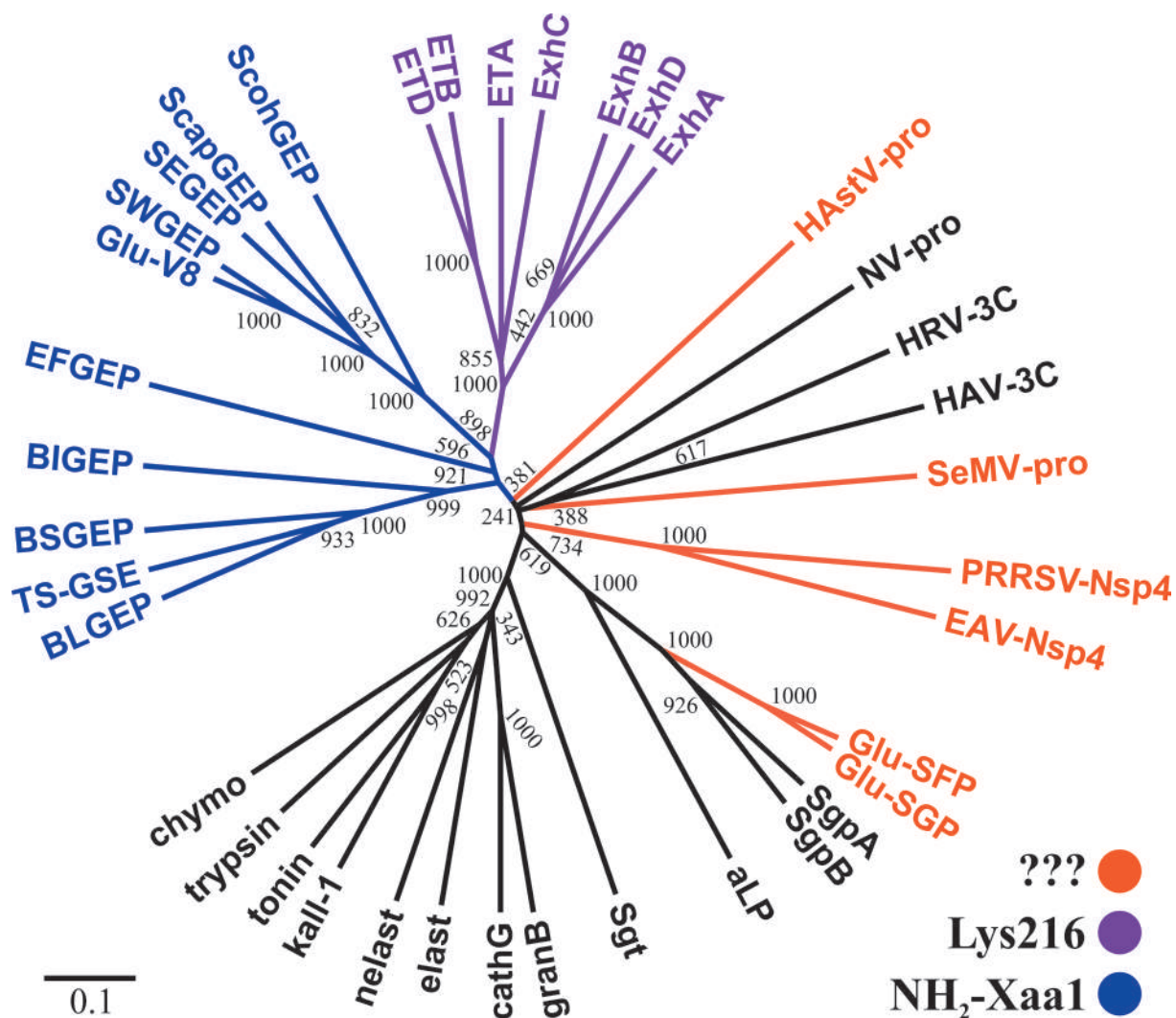


Рис. 9. Филогенетическое дерево химотрипсиноподобных протеаз. Ветви, соответствующие ГЭПамам, выделены цветом: оранжевый – компенсатор заряда в S1-сайте ферментов не выявлен, сиреневый – Lys216 в S1-участке, синий – α-аминогруппа N-концевого остатка в S1-сайте. ГЭПазы: Glu-SFP из *Str. fradiae*, SEGEP из *S. epidermidis*, SWGEP из *S. warneri*, ScohGEP из *S. cohnii*, ScapGEP из *S. caprae*, BLGEP из *B. licheniformis*, BSGEP из *B. subtilis*, TS-GSE из *Thermoactinomyces* sp., EFGEp из *Ent. faecalis*; ExhA, ExhB, ExhC и ExhD – эпидермолитические токсины A, B, C и D из *S. hyicus*. NV-pro – протеаза вируса Норфолк; HRV-3C, HAV-3C – протеазы 3C риновируса и вируса гепатита A человека; aLP – α-литическая протеаза *Lysobacter enzymogenes*; Sgt, SgpA, SgpB – трипсин, протеазы A и B *Str. griseus*; kall-1, trypsin, nelast, cathG, granB – калликреин 1, трипсин 1, эластаза нейтрофилов, катепсин G, гранзим B человека; chymo, elast – химотрипсин A и эластаза 1 быка; tonin – тонин крысы. Выравнивание последовательностей и построение дерева с использованием метода присоединения соседей осуществлены с помощью программы ClustalX 2.1 (www.clustal.org). Дерево визуализировано при помощи программы FigTree (tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/). Цифры соответствуют числу дендрограмм, в которых были представлены индивидуальные бифуркации при бутстреп-анализе 1000 вариантов филогенетических деревьев

Они неактивны по отношению к большинству белков и пептидов, что достигается, возможно, за счет введения остатка Lys216 и уменьшения объема S1-кармана, а также за счет необычной конформации оксианионной впадины [83].

В контексте нашего обсуждения интересно было бы проследить филогению ГЭПа.

Единственную опубликованную попытку филогенетического анализа ферментов этой группы мы обнаружили в работе, вышедшей в свет 20 лет назад [46]. Поэтому в рамках данного обзора на основе сравнения последовательностей охарактеризованных ГЭПа и некоторых ХПП с другой специфичностью мы построили филогенетическое дерево,

которое представлено на *рис. 9*. Первое, что хочется отметить вслед за авторами работы [46], – складывается впечатление, что ГЭПазы возникали на эволюционном древе ХПП по меньшей мере 2 раза. На это указывает наличие двух удаленных ветвей бактериальных ГЭПаз, одна из которых включает белки, сходные с Glu-V8 и ET, а другая соответствует ферментам стрептомицетов. (Судить об эволюционном положении вирусных протеаз сложно, поскольку топология полученного дерева в части, касающейся этих белков, недостоверна.) Особенно показательно, что ГЭПазы стрептомицетов представляют собой лишь небольшой побег на ветви бактериальных протеаз с широкой специфичностью. Это наблюдение позволяет предположить, что вероятность реализации глутаматной специфичности (как, впрочем, и любой другой) на базе хмотрипсинового фолда достаточно велика. По-видимому, для этого достаточно модификации ключевых остатков S1-кармана (His213, Thr/Ser190), обеспечивающих необходимую геометрию и минимальные взаимодействия для связывания остатков Glu/Gln. Однако такая базовая специфичность, вероятно, требует «усиления», которое может быть достигнуто разными путями, в частности, введением компенсатора в S1-сайт, но эта возможность, как показывает анализ ферментов вирусов и стрептомицетов, не единственная. Ветвь, объединяющую все бактериальные ГЭПазы, кроме ферментов стрептомицетов, следует рассмотреть отдельно. Топология этой ветви ожидаемо соответствует таксономии бактерий-продуцентов. При этом ET и ферменты стафилококков, подобные Glu-V8, локализируются на одной общей ветви, т.е. они структурно ближе друг к другу, чем к остальным бактериальным ГЭПазам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный нами анализ показывает, что все известные ГЭПазы относятся к структурному семейству хмотрипсина и имеют в целом сходное строение S1-субстратсвязывающего участка. При этом у ферментов этой группы существует несколько разных систем компенсации заряда субстрата. Отличия в механизмах распознавания отрицательного заря-

да коррелируют с различиями в архитектуре и путях процессинга предшественников, что, вероятно, определяется биологическими функциями соответствующих протеаз. Все это позволяет предположить, что ГЭПазы возникли на эволюционном древе ХПП, по крайней мере, дважды. В то же время мы вынуждены констатировать, что имеющаяся в настоящее время информация о структуре и механизмах действия ГЭПаз не позволяет до конца справиться с загадкой их строгой субстратной специфичности.

Следует подчеркнуть, однако, что сегодня центр тяжести исследований ГЭПаз смещается от изучения собственно ферментов к анализу их биологических функций, как правило, в связи с патогенезом. Так, например, активно изучают участие ГЭПаз стафилококков в регуляции роста биопленок, что определяется, в первую очередь, надеждами на обнаружение новых средств борьбы со стафилококковой инфекцией [116]. Интенсивно ведутся работы по изучению вирусных ГЭПаз, что связано с попытками создания эффективных противовирусных препаратов. При этом ГЭПазы обычно не выделяют из всего пула ЗС-подобных протеаз в поисках универсальных ингибиторов процессинга вирусных полибелков. Инженерия ингибиторов требует экстенсивного изучения белок-лигандных взаимодействий, что влечет за собой получение большого объема структурных данных (см., например, [76, 117]). Не прекращается изучение роли ГЭПаз в жизненном цикле вирусов [24, 118]. Отдельно следует отметить появление работ, посвященных изучению вирусных ЗС и ЗС-подобных протеаз, в том числе и ГЭПаз, в качестве индукторов программируемой клеточной гибели [119–122]. Несомненно, исследования ГЭПаз в медицинском контексте будут активно продолжаться. При этом важно подчеркнуть, что, поскольку строгая субстратная специфичность является основой биологического действия ГЭПаз, в ходе таких исследований неизбежно будут получены новые данные, касающиеся ее структурных детерминант. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00526).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидюк И.В., Костров С.В. // Молекуляр. биология. 1999. Т. 33. № 1. С. 100–105.
2. Мильготина Е.И., Воюшина Т.Л., Честухина Г.Г. // Биоорг. химия. 2003. Т. 29. № 6. С. 563–576.
3. Dancer S.J., Garratt R., Saldanha J., Jhoti H., Evans R. // FEBS Lett. 1990. V. 268. № 1. P. 129–132.
4. Hanakawa Y., Schechter N.M., Lin C., Nishifuji K., Amagai M., Stanley J.R. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 7. P. 5268–5277.
5. Dubin G., Chmiel D., Mak P., Rakwalska M., Rzychon M., Dubin A. // Biol. Chem. 2001. V. 382. № 11. P. 1575–1582.
6. Moon J.L., Banbula A., Oleksy A., Mayo J.A., Travis J. // Biol. Chem. 2001. V. 382. № 7. P. 1095–1099.
7. Ohara-Nemoto Y., Ikeda Y., Kobayashi M., Sasaki M., Tajika S., Kimura S. // Microb. Pathog. 2002. V. 33. № 1. P. 33–41.
8. Yokoi K., Kakikawa M., Kimoto H., Watanabe K., Yasukawa H., Yamakawa A., Taketo A., Kodaira K.I. // Gene. 2001. V. 281. № 1–2. P. 115–122.
9. Ono T., Ohara-Nemoto Y., Shimoyama Y., Okawara H., Kobayakawa T., Baba T.T., Kimura S., Nemoto T.K. // Biol. Chem. 2010. V. 391. № 10. P. 1221–1232.
10. Fudaba Y., Nishifuji K., Andresen L.O., Yamaguchi T.,

- Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M. // *Microb. Pathog.* 2005. V. 39. № 5–6. P. 171–176.
11. Nishifuji K., Fudaba Y., Yamaguchi T., Iwasaki T., Sugai M., Amagai M. // *Vet. Dermatol.* 2005. V. 16. № 5. P. 315–323.
 12. Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K., Makisumi S. // *J. Biochem.* 1988. V. 104. № 3. P. 451–456.
 13. Kitadokoro K., Nakamura E., Tamaki M., Horii T., Okamoto H., Shin M., Sato T., Fujiwara T., Tsuzuki H., Yoshida N., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1993. V. 1163. № 2. P. 149–157.
 14. Хайдарова Н.В., Руденская Г.Н., Ревина Л.П., Степанов В.М., Егоров Н.С. // *Биохимия.* 1989. Т. 54. № 1. С. 46–53.
 15. Svendsen I., Breddam K. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 204. № 1. P. 165–171.
 16. Rufo G.A., Jr., Sullivan B.J., Sloma A., Pero J. // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. № 2. P. 1019–1023.
 17. Leshchinskaya I.B., Shakirov E.V., Itskovitch E.L., Balaban N.P., Mardanova A.M., Sharipova M.R., Viryasov M.B., Rudenskaya G.N., Stepanov V.M. // *FEBS Lett.* 1997. V. 404. № 2–3. P. 241–244.
 18. Rebrikov D.V., Akimkina T.V., Shevelev A.B., Demidyuk I.V., Bushueva A.M., Kostrov S.V., Chestukhina G.G., Stepanov V.M. // *J. Protein Chem.* 1999. V. 18. № 1. P. 21–27.
 19. Мосолова О.В., Руденская Г.Н., Степанов В.М., Ходова О.М., Цаплина И.А. // *Биохимия.* 1987. Т. 52. № 3. С. 414–422.
 20. Демидюк И.В., Носовская Е.А., Цаплина И.А., Каравайко Г.И., Костров С.В. // *Биохимия.* 1997. Т. 62. № 2. С. 202–207.
 21. Liu F., Zhao Z.S., Ren Y., Cheng G., Tang X.F., Tang B. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 24. P. 10429–10441.
 22. Kawalec M., Potempa J., Moon J.L., Travis J., Murray B.E. // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. № 1. P. 266–275.
 23. Ziebuhr J., Snijder E.J., Gorbalenya A.E. // *J. Gen. Virol.* 2000. V. 81. № 4. P. 853–879.
 24. Speroni S., Rohayem J., Nenci S., Bonivento D., Robel I., Barthel J., Luzhkov V.B., Coutard B., Canard B., Mattevi A. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 387. № 5. P. 1137–1152.
 25. Somera M., Sarmiento C., Truve E. // *Viruses.* 2015. V. 7. № 6. P. 3076–3115.
 26. Schechter I., Berger A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967. V. 27. № 2. P. 157–162.
 27. Stroud R.M. // *Sci. Am.* 1974. V. 231. № 1. P. 74–88.
 28. Руденская Г.Н. // *Биоорган. химия.* 2003. Т. 29. № 2. С. 117–128.
 29. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L., Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Morozov I.A., Kononenko N.V., Mirgorodskaya O.A., Da U., Larionova N.I., et al. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 249. № 2. P. 612–621.
 30. Polanowska J., Krokoszynska I., Czapinska H., Watorek W., Dadlez M., Otlewski J. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1386. № 1. P. 189–198.
 31. Poe M., Blake J.T., Boulton D.A., Gammon M., Sigal N.H., Wu J.K., Zweerink H.J. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 1. P. 98–103.
 32. Perona J.J., Craik C.S. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 3. P. 337–360.
 33. Hedstrom L. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. № 12. P. 4501–4524.
 34. Krieger M., Kay L.M., Stroud R.M. // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 83. № 2. P. 209–230.
 35. Waugh S.M., Harris J.L., Fletterick R., Craik C.S. // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. № 9. P. 762–765.
 36. Hof P., Mayr I., Huber R., Korzus E., Potempa J., Travis J., Powers J.C., Bode W. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 20. P. 5481–5491.
 37. Tsu C.A., Perona J.J., Fletterick R.J., Craik C.S. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 18. P. 5393–5401.
 38. Pletnev V.Z., Zamolodchikova T.S., Pangborn W.A., Duax W.L. // *Proteins.* 2000. V. 41. № 1. P. 8–16.
 39. Graf L., Jancso A., Szilagyi L., Hegyi G., Pinter K., Naray-Szabo G., Hepp J., Medzihradzky K., Rutter W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. № 14. P. 4961–4965.
 40. Hedstrom L., Szilagyi L., Rutter W.J. // *Science.* 1992. V. 255. № 5049. P. 1249–1253.
 41. Hedstrom L., Perona J.J., Rutter W.J. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 29. P. 8757–8763.
 42. Hedstrom L., Farr-Jones S., Kettner C.A., Rutter W.J. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 29. P. 8764–8769.
 43. Perona J.J., Hedstrom L., Rutter W.J., Fletterick R.J. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 5. P. 1489–1499.
 44. Nienaber V.L., Breddam K., Birktoft J.J. // *Biochemistry.* 1993. V. 32. № 43. P. 11469–11475.
 45. Cortes A., Emery D.C., Halsall D.J., Jackson R.M., Clarke A.R., Holbrook J.J. // *Protein Sci.* 1992. V. 1. № 7. P. 892–901.
 46. Barbosa J.A., Saldanha J.W., Garratt R.C. // *Protein Eng.* 1996. V. 9. № 7. P. 591–601.
 47. Stennicke H.R., Birktoft J.J., Breddam K. // *Protein Sci.* 1996. V. 5. № 11. P. 2266–2275.
 48. Dougherty W.G., Semler B.L. // *Microbiol. Rev.* 1993. V. 57. № 4. P. 781–822.
 49. Gorbalenya A., Snijder E. // *Perspectives Drug Discov. Design.* 1996. V. 6. № 1. P. 64–86.
 50. Spall V.E., Shanks M., Lomonosoff G.P. // *Semin. Virol.* 1997. V. 8. № 1. P. 15–23.
 51. Gorbalenya A.E., Koonin E.V. // *Sov. Sci. Rev. Sect. D Physicochem. Biol.* 1993. V. 11. № 3. P. 1–84.
 52. Blanck S., Stinn A., Tsiklauri L., Zirkel F., Junglen S., Ziebuhr J. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 23. P. 13747–13758.
 53. Meyers G., Wirblich C., Thiel H.J., Thumfart J.O. // *Virology.* 2000. V. 276. № 2. P. 349–363.
 54. Belliot G., Sosnovtsev S.V., Mitra T., Hammer C., Garfield M., Green K.Y. // *J. Virol.* 2003. V. 77. № 20. P. 10957–10974.
 55. Sosnovtsev S.V., Belliot G., Chang K.O., Prikhodko V.G., Thackray L.B., Wobus C.E., Karst S.M., Virgin H.W., Green K.Y. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 16. P. 7816–7831.
 56. Robel I., Gebhardt J., Mesters J.R., Gorbalenya A., Coutard B., Canard B., Hilgenfeld R., Rohayem J. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 16. P. 8085–8093.
 57. Wei C., Meller J., Jiang X. // *Virology.* 2013. V. 436. № 1. P. 24–32.
 58. Snijder E.J., Wassenaar A.L., van Dinten L.C., Spaan W.J., Gorbalenya A.E. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 9. P. 4864–4871.
 59. Tian X., Lu G., Gao F., Peng H., Feng Y., Ma G., Bartlam M., Tian K., Yan J., Hilgenfeld R., et al. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 392. № 4. P. 977–993.
 60. Barrette-Ng I.H., Ng K.K., Mark B.L., van Aken D., Cherney M.M., Garen C., Kolodenco Y., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., James M.N. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 42. P. 39960–39966.
 61. Gayathri P., Satheshkumar P.S., Prasad K., Nair S., Savithri H.S., Murthy M.R. // *Virology.* 2006. V. 346. № 2. P. 440–451.
 62. Satheshkumar P.S., Lokesh G.L., Savithri H.S. // *Virology.* 2004. V. 318. № 1. P. 429–438.
 63. Bosch A., Pinto R.M., Guix S. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. V. 27. № 4. P. 1048–1074.
 64. Matthews D.A., Smith W.W., Ferre R.A., Condon B., Budahazi G., Sisson W., Villafranca J.E., Janson C.A., McElroy H.E., Gribskov C.L., et al. // *Cell.* 1994. V. 77. № 5. P. 761–771.
 65. Mosimann S.C., Cherney M.M., Sia S., Plotch S., James M.N. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 5. P. 1032–1047.
 66. Bergmann E.M., Mosimann S.C., Chernaia M.M., Malcolm B.A., James M.N. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 3. P. 2436–2448.
 67. Matthews D.A., Dragovich P.S., Webber S.E., Fuhrman S.A., Patick A.K., Zalman L.S., Hendrickson T.F., Love R.A., Prins T.J., Marakovits J.T., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 20. P. 11000–11007.
 68. Anand K., Palm G.J., Mesters J.R., Siddell S.G., Ziebuhr J., Hilgenfeld R. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 13. P. 3213–3224.

69. Anand K., Ziebuhr J., Wadhvani P., Mesters J.R., Hilgenfeld R. // *Science*. 2003. V. 300. № 5626. P. 1763–1767.
70. Yang H., Yang M., Ding Y., Liu Y., Lou Z., Zhou Z., Sun L., Mo L., Ye S., Pang H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 23. P. 13190–13195.
71. Birtley J.R., Knox S.R., Jaulent A.M., Brick P., Leatherbarrow R.J., Curry S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 12. P. 11520–11527.
72. Nakamura K., Someya Y., Kumasaka T., Ueno G., Yamamoto M., Sato T., Takeda N., Miyamura T., Tanaka N. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 21. P. 13685–13693.
73. Zeitler C.E., Estes M.K., Venkataram Prasad B.V. // *J. Virol.* 2006. V. 80. № 10. P. 5050–5058.
74. Leen E.N., Baeza G., Curry S. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 6. P. e38723.
75. Muhaxhiri Z., Deng L., Shanker S., Sankaran B., Estes M.K., Palzkill T., Song Y., Prasad B.V. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 8. P. 4281–4292.
76. Damalanka V.C., Kim Y., Alliston K.R., Weerawarna P.M., Galasiti Kankanamalage A.C., Lushington G.H., Mehzebain N., Battaile K.P., Lovell S., Chang K.O., et al. // *J. Med. Chem.* 2016. V. 59. № 5. P. 1899–1913.
77. Ziebuhr J., Heusipp G., Siddell S.G. // *J. Virol.* 1997. V. 71. № 5. P. 3992–3997.
78. Hegyi A., Friebe A., Gorbalenya A.E., Ziebuhr J. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. № 3. P. 581–593.
79. Someya Y., Takeda N., Miyamura T. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 12. P. 5949–5958.
80. Nishifuji K., Sugai M., Amagai M. // *J. Dermatol. Sci.* 2008. V. 49. № 1. P. 21–31.
81. Bukowski M., Wladyka B., Dubin G. // *Toxins (Basel)*. 2010. V. 2. № 5. P. 1148–1165.
82. Bailey C.J., Redpath M.B. // *Biochem. J.* 1992. V. 284. № 1. P. 177–180.
83. Vath G.M., Earhart C.A., Rago J.V., Kim M.H., Bohach G.A., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 7. P. 1559–1566.
84. Cavarelli J., Prevost G., Bourguet W., Moulinier L., Chevrier B., Delagoutte B., Bilwes A., Mourey L., Rifai S., Piemont Y., et al. // *Structure*. 1997. V. 5. № 6. P. 813–824.
85. Vath G.M., Earhart C.A., Monie D.D., Iandolo J.J., Schlievert P.M., Ohlendorf D.H. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 32. P. 10239–10246.
86. Yamaguchi T., Nishifuji K., Sasaki M., Fudaba Y., Aepfelbacher M., Takata T., Ohara M., Komatsuzawa H., Amagai M., Sugai M. // *Infect. Immun.* 2002. V. 70. № 10. P. 5835–5845.
87. Ahrens P., Andresen L.O. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 6. P. 1833–1837.
88. Rago J.V., Vath G.M., Bohach G.A., Ohlendorf D.H., Schlievert P.M. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 4. P. 2207–2213.
89. Meijers R., Blagova E.V., Levnikov V.M., Rudenskaya G.N., Chestukhina G.G., Akimkina T.V., Kostrov S.V., Lamzin V.S., Kuranova I.P. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. № 10. P. 2784–2791.
90. Prasad L., Leduc Y., Hayakawa K., Delbaere L.T. // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004. V. 60. № 2. P. 256–259.
91. Chen C., Krishnan V., Macon K., Manne K., Narayana S.V., Schneewind O. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 41. P. 29440–29452.
92. Bode W. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 127. № 4. P. 357–374.
93. Bode W., Schwager P., Huber R. // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 118. № 1. P. 99–112.
94. Wang D., Bode W., Huber R. // *J. Mol. Biol.* 1985. V. 185. № 3. P. 595–624.
95. Wroblowski B., Diaz J.F., Schlitter J., Engelborghs Y. // *Protein Eng.* 1997. V. 10. № 10. P. 1163–1174.
96. Gomis-Ruth F.X., Bayes A., Sotiropoulou G., Pampalakis G., Tsetsenis T., Villegas V., Aviles F.X., Coll M. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 30. P. 27273–27281.
97. Demidyuk I.V., Romanova D.V., Nosovskaya E.A., Chestukhina G.G., Kuranova I.P., Kostrov S.V. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. V. 17. № 5. P. 411–416.
98. Breddam K., Meldal M. // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 206. № 1. P. 103–107.
99. Nemoto T.K., Ohara-Nemoto Y., Ono T., Kobayakawa T., Shimoyama Y., Kimura S., Takagi T. // *FEBS J.* 2008. V. 275. № 3. P. 573–587.
100. Rouf S.M., Ohara-Nemoto Y., Shimoyama Y., Kimura S., Ono T., Nemoto T.K. // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2012. V. 49. № 6. P. 421–427.
101. Drapeau G.R. // *J. Bacteriol.* 1978. V. 136. № 2. P. 607–613.
102. Park C.H., Lee S.J., Lee S.G., Lee W.S., Byun S.M. // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 19. P. 6457–6464.
103. Велишаева Н.С., Гасанов Е.В., Громова Т.Ю., Демидюк И.В. // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34. № 6. С. 786–791.
104. Demidyuk I.V., Gasanov E.V., Safina D.R., Kostrov S.V. // *Protein J.* 2008. V. 27. № 6. P. 343–354.
105. Geigenmuller U., Chew T., Ginzton N., Matsui S.M. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 4. P. 2003–2008.
106. Kiang D., Matsui S.M. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. № 1. P. 25–34.
107. Truhlar S.M., Cunningham E.L., Agard D.A. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 2. P. 381–390.
108. Baardsnes J., Sidhu S., MacLeod A., Elliott J., Morden D., Watson J., Borgford T. // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. № 12. P. 3241–3244.
109. Gasanov E.V., Demidyuk I.V., Shubin A.V., Kozlovskiy V.I., Leonova O.G., Kostrov S.V. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2008. V. 21. № 11. P. 653–658.
110. Rice K., Peralta R., Bast D., de Azavedo J., McGavin M.J. // *Infect. Immunol.* 2001. V. 69. № 1. P. 159–169.
111. Massimi I., Park E., Rice K., Muller-Esterl W., Sauder D., McGavin M.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 44. P. 41770–41777.
112. Shaw L., Golonka E., Potempa J., Foster S.J. // *Microbiology*. 2004. V. 150. № 1. P. 217–228.
113. Nickerson N.N., Prasad L., Jacob L., Delbaere L.T., McGavin M.J. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 47. P. 34129–34138.
114. Trachuk L.A., Shcheglov A.S., Milgotina E.I., Chestukhina G.G. // *Biochimie*. 2005. V. 87. № 6. P. 529–537.
115. Demidyuk I.V., Shubin A.V., Gasanov E.V., Kostrov S.V. // *BioMolecular Concepts*. 2010. V. 1. № 3–4. P. 305–322.
116. Iwase T., Uehara Y., Shinji H., Tajima A., Seo H., Takada K., Agata T., Mizunoe Y. // *Nature*. 2010. V. 465. № 7296. P. 346–349.
117. Kim Y., Lovell S., Tiew K.C., Mandadapu S.R., Alliston K.R., Battaile K.P., Groutas W.C., Chang K.O. // *J. Virol.* 2012. V. 86. № 21. P. 11754–11762.
118. Nair S., Savithri H.S. // *Virology*. 2010. V. 396. № 1. P. 106–117.
119. Calandria C., Irurzun A., Barco A., Carrasco L. // *Virus Res.* 2004. V. 104. № 1. P. 39–49.
120. Chau D.H., Yuan J., Zhang H., Cheung P., Lim T., Liu Z., Sall A., Yang D. // *Apoptosis*. 2007. V. 12. № 3. P. 513–524.
121. Ma Z., Wang Y., Zhao H., Xu A.T., Wang Y., Tang J., Feng W.H. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. P. e69387.
122. Shubin A.V., Demidyuk I.V., Lunina N.A., Komissarov A.A., Roschina M.P., Leonova O.G., Kostrov S.V. // *BMC Cell Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 4.

УДК 577.352.465

Болезнь Хантингтона: нарушения кальциевой сигнализации и модели для изучения развития патологии

Ю. А. Колобкова, В. А. Вигонт, А. В. Шалыгин, Е. В. Казначеева*

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

*E-mail: evkzn@incras.ru

Поступила в редакцию 14.07.2016

Принята к печати 27.03.2017

РЕФЕРАТ Болезнь Хантингтона (БХ) – это тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся моторной дисфункцией, снижением когнитивных способностей и психическими расстройствами. БХ обусловлена мутацией в первом экзоне гена, кодирующего белок хантингтин, которая приводит к увеличению полиглутаминового тракта в N-концевой области хантингтина и развитию тяжелой нейродегенеративной патологии. Есть все основания рассматривать нарушение кальциевого гомеостаза в качестве одной из ключевых причин развития патологии, что объясняет повышенный интерес к данной проблеме специалистов в области молекулярной физиологии. Большое внимание уделяется созданию животных моделей и пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (HDiPSC), имитирующих развитие заболевания. Несмотря на полуторавековую историю исследований БХ, необходимо констатировать, что проблемы манифестации и диагностики данной патологии актуальны и по сей день. Перечисленные проблемы нашли отражение в настоящем обзоре.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Хантингтона, кальций, нейродегенерация, хантингтин, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (HDiPSC), SOC.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БХ – болезнь Хантингтона; ПМ – плазматическая мембрана; ЭР – эндоплазматический ретикулум; $[Ca^{2+}]$ – концентрация ионов кальция; (HD)iPSC – (специфичные для БХ) индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; InsP₃ – инозитол-1,4,5-трисфосфат; InsP₃R – рецептор инозитол-1,4,5-трисфосфата; (m)Htt – (мутантный) хантингтин; Q – остаток глутамина; MSN – срединные шипиковые нейроны стриатума; SOC(E) – депо-управляемый кальциевый (вход).

ВВЕДЕНИЕ

Наследственная природа болезни Хантингтона (БХ) была установлена и описана Джорджем Хантингтоном в его оригинальной рукописи почти полтора века назад [1]. БХ, наследуемая по аутосомно-доминантному типу, обусловлена мутацией, которая приводит к увеличению количества САG-повторов в гене белка хантингтина (Htt), локализованного на хромосоме 4p16.3. В результате данной мутации в N-концевой области белка Htt увеличивается количество остатков глутамина (Q), что различными путями приводит к наблюдаемым патологиям [2]. В норме полиглутаминовый тракт содержит не более 35 остатков глутамина [3]. Для болезни Хантингтона характерна избирательная гибель ГАВАергических нейронов стриатума [3], в то время как при болезни Паркинсона поражаются в основном дофаминергические нейроны черной субстанции [4], а при болезни Альцгеймера наблюдается

преимущественная гибель нейронов гиппокампа [5]. На сегодняшний день известно несколько механизмов, вносящих вклад в патогенез БХ, включая новые токсические свойства мутантного Htt (mHtt), одновременно с нарушением функций нормального Htt [6]. Данные изменения приводят к нарушению регуляции транскрипции гена, кодирующего Htt [7], синаптической дисфункции и эксайтотоксичности [8, 9], нарушению гомеостаза mHtt [10], дефектам внутриклеточного транспорта [11], митохондриальной дисфункции [12–14] и нарушениям кальциевой сигнализации [15–17].

МАНИФЕСТАЦИЯ И ДИАГНОСТИКА БХ

Распространенность БХ достаточно велика: частота заболевания составляет примерно 1 : 1000000 у людей с азиатским и африканским происхождением и 5–10 : 100000 у лиц европеоидной расы, не считая множества людей, входящих в группу риска. У муж-

чин БХ встречается чаще, чем у женщин, проявляется преимущественно после 30 лет и обычно приводит к летальному исходу через 15–20 лет после появления первых симптомов. В то же время наличие длинных полиглутаминовых трактов может быть причиной ювенильной или даже инфантильной формы БХ. Мутации, увеличивающие длину глутаминовых повторов до 36–40Q, обладают неполной пенетрантностью; повторы длиной более 41Q полностью пенетрантны [18].

Длина полиглутаминового тракта в mHtt прямо коррелирует со степенью тяжести заболевания и в подавляющем большинстве случаев обратно коррелирует с возрастом появления первых симптомов [19]. Тем не менее, существует значительная вариабельность между ожидаемым и наблюдаемым возрастом манифестации [20]. Так, при одинаковой длине полиглутаминового тракта, особенно в диапазоне 40–44Q, возраст манифестации может отличаться на 20 лет [21]. Подобное различие можно объяснить присутствием ряда генетических модификаторов, регулирующих экспрессию как Htt, так и других белков, и опосредующих таким образом повышенную чувствительность либо устойчивость к заболеванию. Например, полиморфизм S18Y в гене, кодирующем убиквитин-С-концевую гидролазу UCH-L1, связан с более поздней манифестацией БХ [22]. У пациентов с мутацией M441T в гене белка, ассоциированного с Htt (Har1), БХ проявлялась в более раннем возрасте за счет ослабления взаимодействия Har1 с mHtt и, как следствие, повышения опосредованной Htt токсичности [23]. Недавно показали, что однонуклеотидный полиморфизм в промоторе гена *Htt*, расположенный в сайте связывания с фактором NF-κB, снижает активность промотора и, как следствие, экспрессию Htt, что приводит к более поздней манифестации БХ [24].

Однако генетической мутации недостаточно как для прогнозирования индивидуального риска заболеваний, так и для оценки текущих физиологических процессов в организме. Поэтому для разработки новых лекарственных средств, определения эффективности лечения и влияния факторов внешней среды важна идентификация биомаркеров прогрессирования БХ, которые могут дать информацию о патологических процессах до проявления клинических симптомов. К недавним достижениям диагностики можно отнести количественное определение уровня mHtt с помощью сверхчувствительного иммунологического анализа одиночных молекул в образцах цереброспинальной жидкости лиц, несущих мутацию в этом гене [25].

Так как Htt экспрессируется практически во всех тканях организма, изменения, вызываемые mHtt,

могут быть обнаружены даже в крови. Участие лейкоцитов в иммунном ответе делает анализ крови идеальным способом выявления таких патологических процессов при БХ, как периферические воспаления. При БХ в крови увеличена экспрессия продукта гена *Y* гистонов семейства H2A [26]. В ходе клинических исследований показано, что экспрессия этого гена как в образцах крови, так и в тканях мозга при БХ в 1.6 раза выше, чем в контрольной группе. С помощью технологий секвенирования нового поколения и Fluidigm выявлено пять генов, кодирующих потенциальные биомаркеры БХ, детектируемые в крови пациентов [27]. Установлена корреляция между когнитивными нарушениями при БХ и уровнями пептидного гормона прокинетицина 2 (PROK2), участвующего в регуляции циркадных ритмов [28]. Таким образом, PROK2 рассматривается как один из многообещающих маркеров прогрессирования БХ. В крови пациентов с БХ обнаружено также повышение уровня мРНК аквапорина 9 [29].

Изменчивость клинического фенотипа БХ и потенциальное влияние совокупности экологических и фармакологических факторов приводят к необходимости комбинирования различных маркеров прогрессирования БХ. Снижение уровня N-ацетиласпартата (NAA) в тканях мозга считается достоверным индикатором дисфункции и гибели нейронов и, что важно для клинической диагностики, может быть измерено неинвазивно с помощью МРТ [30]. Оказалось, что у пациентов с ранней манифестацией БХ уровень NAA ниже, чем в контрольной группе. В то же время у них существенно повышен уровень миоинозита – маркера глиоза [31]. Связь между уровнем NAA и степенью тяжести заболевания открывает возможность использования данного метаболита в качестве идентификатора нейрохимических реакций при оценке эффективности потенциальных терапевтических агентов.

В сыворотке крови при БХ увеличивается концентрация вазопрессина, играющего важную роль в гомеостазе жидкостей организма [32], а также 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина (индикатора окислительного повреждения ДНК); продуктов перекисного окисления липидов (молочной кислоты, 4-гидроксиноненала и малондиальдегида), что позволяет рассматривать эти вещества как потенциальные биомаркеры [33]. В эритроцитах пациентов с БХ наблюдалось снижение уровня глутатионпероксидазы и Cu,Zn-супероксиддисмутазы [34], а в посмертных срезах мозга и образцах плазмы повышен уровень цитокинов, включая интерлейкины-4, -6, -8, -10, -23, TNF-α, а также кластерина [35].

Использование всех этих биомаркеров будет способствовать точной оценке эффективности новых ме-

тодов лечения, повысит безопасность и эффективность доклинических и клинических испытаний.

БЕЛОК ХАНТИНГТИН

Развитие БХ обусловлено мутацией в гене белка хантингтина. Хантингтин – белок с молекулярной массой около 350 кДа и полиглутаминовым трактом в N-концевой области. В той же области находится обогащенный остатками пролина домен, участвующий в белок-белковых взаимодействиях и предохраняющий хантингтин от агрегации [36]. Схема расположения доменов хантингтина человека представлена на *рис. 1*.

В клетке хантингтин выполняет функции скаффолд-белка, т.е. обеспечивает колокализацию взаимодействующих с ним белков, помогая им выполнять свои функции. С хантингтином взаимодействует множество белков (особенно с его N-концевой областью), осуществляющих самые разнообразные функции – от везикулярного транспорта и эндоцитоза до регуляции транскрипции и апоптоза [37].

Молекула хантингтина выглядит как соленоид с гидрофобным кором, сформированным из состыкованных HEAT-повторов. Эти повторы вместе с обогащенным пролином участком принимают участие в белок-белковых взаимодействиях. Свое название HEAT-повторы получили по первым буквам в обозначениях четырех белков, в которых они были впервые обнаружены (Huntingtin, Elongation factor

3, PR65/A –субъединица фосфатазы 2A и липидкиназа TOR) [38]. Структура коротких N-концевых фрагментов хантингтина изучена с помощью рентгеноструктурного анализа [39] и методом ядерного магнитного резонанса [40]. Недавно показали, что вторичная структура хантингтина меняется в зависимости от длины полиглутаминового тракта [41]. С помощью электронной микроскопии получены изображения нормального и мутантного хантингтинов, имеющих сферическую структуру с полостью [41]. Изображения Htt23Q и Htt78Q очень близки, однако влияние полиглутаминового тракта на структуру хантингтина предполагает, что при взаимодействии со своими белками-партнерами хантингтин может подвергаться значительным конформационным перестройкам [41]. Несмотря на сказанное, на сегодняшний день не до конца понятно, как связана структура хантингтина с его функциями, и как изменения его структуры в результате мутации приводят к наблюдаемым патологиям.

Считается, что БХ ассоциирована с отщеплением от мутантного хантингтина N-концевого фрагмента, который кодируется первым экзоном и содержит polyQ-тракт. Отщепленный фрагмент накапливается в ядре, в то время как хантингтин дикого типа локализован в основном в цитозоле [42, 43]. Выбор и изменение места, где будет находиться хантингтин, определяются посттрансляционными модификациями [44]. Накопление агрегированных N-концевых

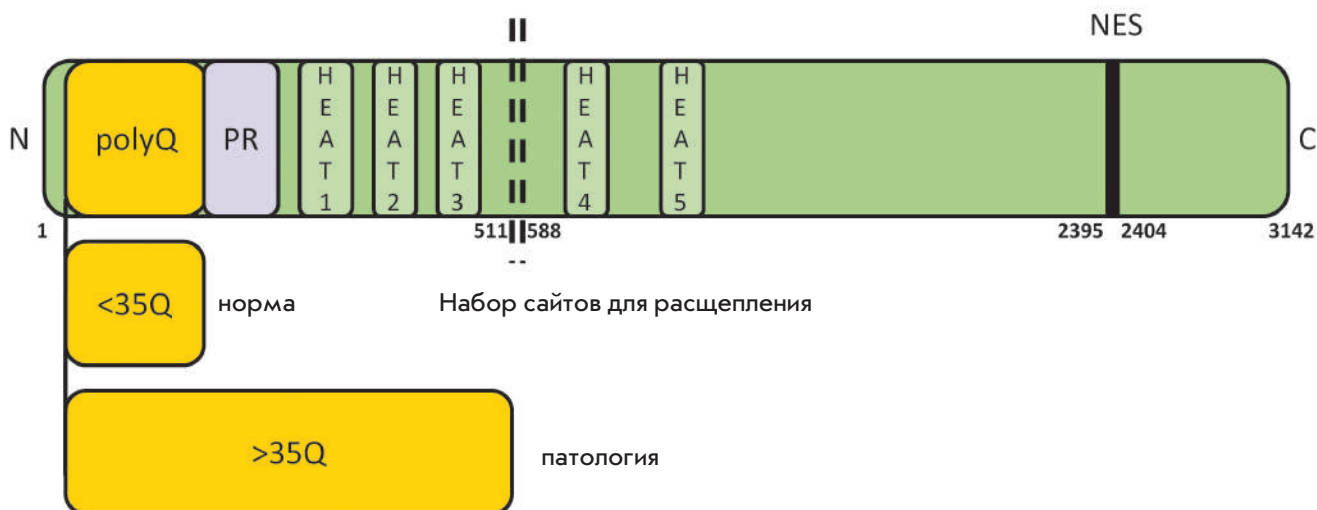


Рис. 1. Белок хантингтин. Схема расположения основных доменов хантингтина человека. Показаны polyQ – полиглутаминовый тракт, PR – обогащенный пролином домен, ответственный за взаимодействие с множеством белков, набор HEAT-повторов, область расщепления протеазами и NES – фактор экспорта в ядро

фрагментов mHtt в ядре и ассоциированных с ними белков, таких, как различные транскрипционные факторы, белки теплового шока и компоненты протеасом, затрудняет выполнение ими своих нормальных функций и, как следствие, приводит к различным патологиям в клетке [45].

К нейропатологическим маркерам БХ относятся внутриклеточные включения, образованные N-концевыми фрагментами mHtt, обнаруженные при посмертном исследовании мозга пациентов с БХ, а также в животных и клеточных моделях БХ [42, 46, 47]. Образование нерастворимых агрегатов при БХ не вызывает сомнения, однако многие исследования показывают, что этот процесс не связан непосредственно с дегенерацией нейронов. Так, экспрессия mHtt в культуре нейронов стриатума показала накопление нерастворимых белковых агрегатов, не коррелирующее с гибелью нейронов. Более того, уменьшение внутриядерных включений mHtt совпадало с усилением нейродегенеративных процессов [48]. Изучение нейронов, экспрессирующих первый экзон mHtt, также показало, что гибель нейронов коррелирует с увеличением длины полиглутаминового тракта и с количеством диффузного mHtt в клетке, в то время как накопление агрегатов лишь снижает количество растворенного mHtt и увеличивает таким образом выживаемость нейронов [49]. Считается, что за амилоидную токсичность ответственны нестабильные, гетерогенные префибриллярные агрегаты, тогда как зрелые фибриллы представляют собой стабильные и безвредные хранилища токсичных элементов [50].

Приведенные факты приводят к мысли, что образование агрегатов при БХ не может быть единственной причиной развития патологии, и выяснение молекулярных причин БХ остается актуальной задачей.

МОДЕЛИРОВАНИЕ БХ

Для изучения молекулярных механизмов нейродегенерации, равно как и для проведения исследований, связанных с поиском новых лекарств, исключительно важным представляется создание адекватных моделей заболевания. Так как БХ – это наследственное заболевание, обусловленное мутацией в единственном гене, существует возможность с помощью генетических манипуляций создавать различные модели, достаточно точно воспроизводящие патологию заболевания (рис. 2).

Мыши R6/2 обладают устойчивым фенотипом, включающим нарушение координации и походки, гипоактивность и когнитивную дисфункцию. Возраст манифестации заболевания в данной модели – порядка 4 недель [51]. У мышей R6/2 формируются

агрегаты, содержащие внутриклеточные включения, аналогичные обнаруженным в биопсийных образцах тканей мозга пациентов с БХ [52]. Однако, несмотря на устойчивость фенотипа, R6/2 не могут служить точной моделью БХ, так как экспрессируют только N-концевой фрагмент мутантного белка. Тем не менее, мышью R6/2 широко используют для моделирования общих черт полиглутаминовых заболеваний, включая аномальную конформацию белка, обусловленную расширенным polyQ-трактом.

Трансгенные мыши YAC128 и VACND, содержащие 128Q и 97Q в полноразмерном мутантном белке соответственно, имеют более мягкий фенотип БХ по сравнению с фенотипом, наблюдаемым в модели R6/2 [53].

Самый слабый фенотип БХ имеют мышинные модели knock-in. Даже при экспрессии 150Q у мышей HdhQ150/Q150 выявлено меньше нарушений, чем у R6/2. У мышей HdhQ150/Q150 первые симптомы заболевания, включающие моторную дисфункцию и нарушение походки, появляются в более позднем возрасте [54].

Несмотря на то что мышинные модели основаны на мутации, вызывающей заболевание, в большинстве из них отсутствует стабильная потеря нейронов, наблюдаемая у пациентов. Для преодоления этой проблемы требуются другие модельные организмы. Токсичность N-концевого фрагмента mHtt проявляется ярче при использовании крупных млекопитающих, таких, как свиньи и обезьяны, тогда как у овец, экспрессирующих полноразмерный mHtt, отсутствуют выраженные фенотипические признаки заболевания [55]. Однако, несмотря на ряд преимуществ, к существенным недостаткам этих моделей относятся высокая стоимость и необходимость специального лабораторного оборудования для содержания.

Drosophila melanogaster и *Caenorhabditis elegans* также используются для моделирования БХ. Преимуществом этих организмов является короткая продолжительность жизни и быстрое воспроизведение. Обнаружение у *Drosophila* ортолога Htt человека предполагает наличие у этих насекомых путей, необходимых для нормального функционирования Htt, что делает *Drosophila* хорошей моделью для изучения БХ [56]. Еще одна интересная особенность *Drosophila* как модели БХ – возможность легко оценивать нейродегенерацию визуально. Сверхэкспрессия mHtt у *Drosophila* приводит к формированию агрегатов, гибели нейронов и снижению выживаемости [57]. Кроме того, моделирование БХ на *Drosophila* позволяет воспроизвести такие симптомы, как моторная дисфункция, ухудшение когнитивных способностей и памяти [58]. У *C. elegans*, экспрессирующих в мышечных клетках polyQ-тракт, слитый с желтым флуоресцентным

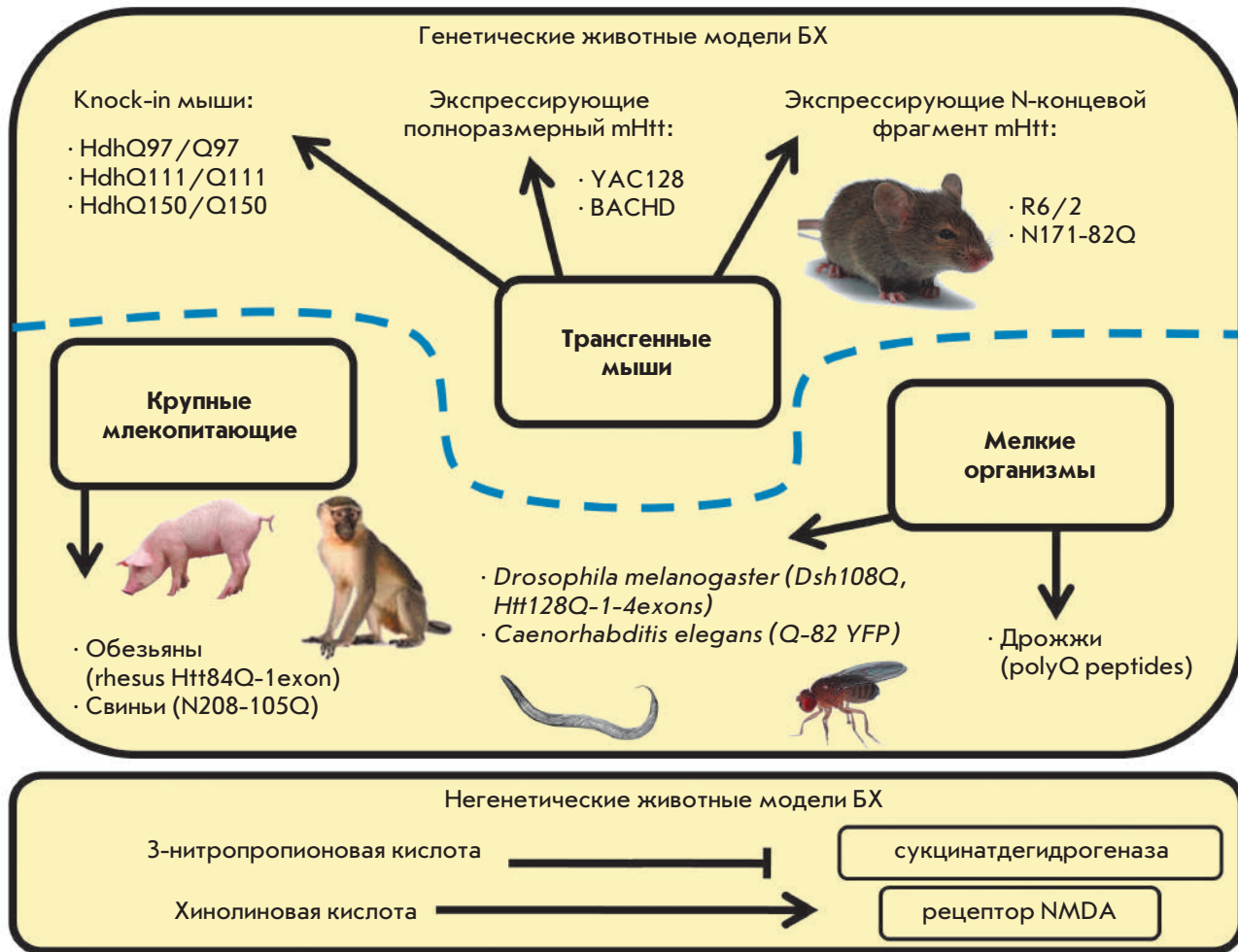


Рис. 2. Животные модели болезни Хантингтона

белком (YFP), наблюдали формирование агрегатов, клеточную токсичность и паралич, прямо коррелирующие с возрастом и количеством повторов Q [59]. Обе упомянутые модели активно используются для тестирования потенциальных лекарственных средств против БХ. Однако столь далекие от человека модели не способны в полной мере воспроизводить картину, наблюдаемую у пациентов с БХ. Так, например, экспрессия фрагментов Htt с полиглутаминовыми трактами с 88 или 128Q в *S. elegans* приводила к значительной нейрональной дисфункции и утрате чувствительности к прикосновению, не вызывая при этом гибели нейронов [60].

Достаточно часто используют дрожжевую модель БХ. Так, например, на дрожжах показаны различные патологические эффекты агрегации mHtt – нарушение эндоцитоза, метаболизма триптофана, клеточного цикла и деградации белков [61–63].

Существуют и негенетические животные модели БХ, основанные на использовании химических веществ (рис. 2). Так, например, 3-нитропропионовую и хинолиновую кислоты используют в качестве эксайтотоксических агентов в животных моделях БХ. Первое соединение является токсином, который действует на митохондрии и индуцирует нейротоксичность путем необратимого ингибирования сукцинатдегидрогеназы – ключевого фермента дыхательной цепи, ответственного за окисление сукцината в фумарат. Хинолиновая кислота является агонистом рецептора N-метил-D-аспартата. Эксайтотоксичность, вызванную этими соединениями, изучали на срезах стриатума, сагиттальных срезах гиппокампа [64], а также на срезах гиппокампа трансгенных мышей R6/2 [65].

Необходимо отметить, что многие патологические проявления, наблюдаемые при БХ, могут быть из-

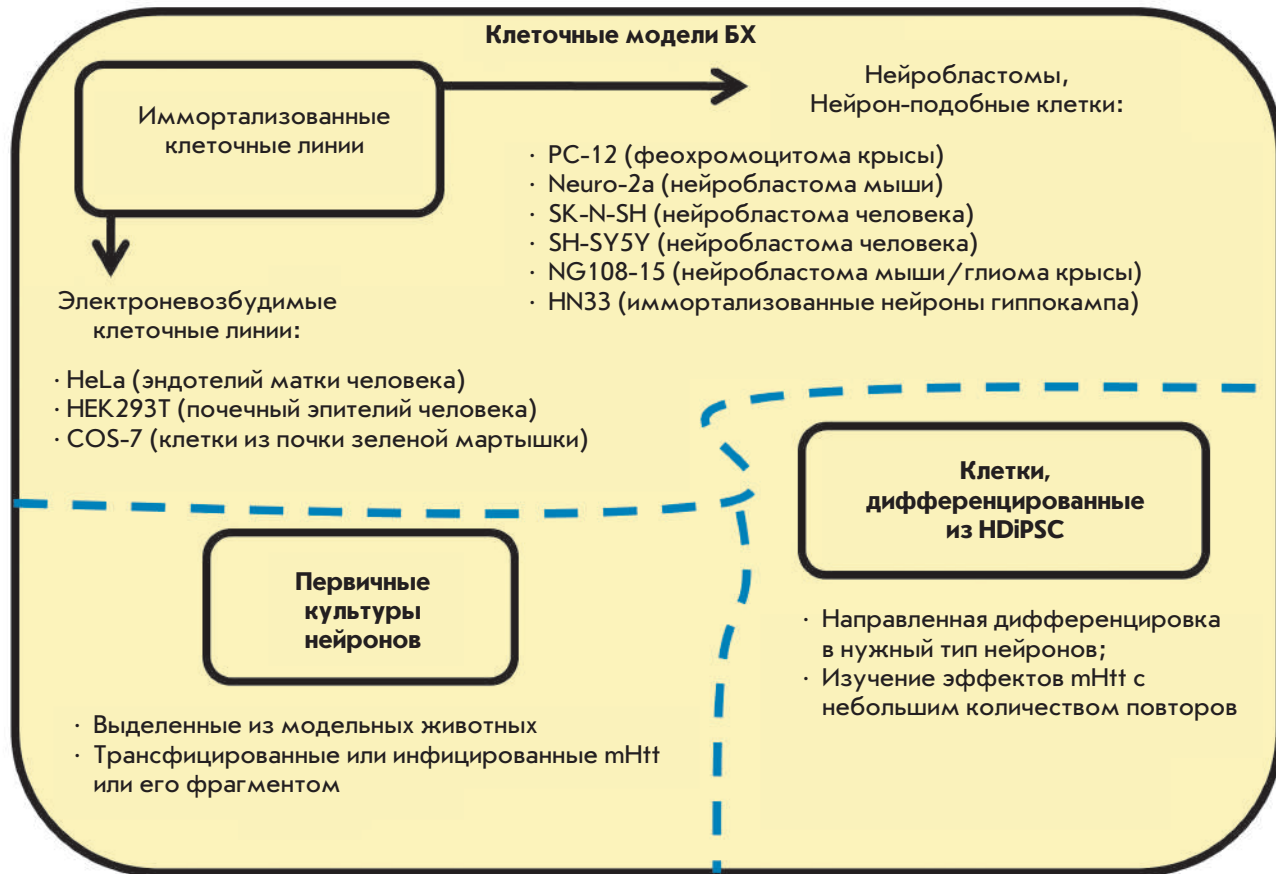


Рис. 3. Клеточные модели болезни Хантингтона

учены на клеточном уровне (рис. 3). Клетки могут быть трансфицированы как полноразмерным mHtt, так и его фрагментами с различной длиной polyQ-тракта. Например, трансфекция клеток PC-12 первым экзоном *mHtt* приводила к локализации mHtt в ядре, изменению морфологии и экспрессии генов, а также к снижению выживаемости [66].

Получено большое количество иммortalized клеточных линий, моделирующих БХ, однако они позволяют выявлять далеко не все патологические проявления БХ. Поэтому довольно часто используют первичные культуры нейронов, полученные из трансгенных мышей, моделирующих БХ [67–69], или нейроны, выделенные из животных дикого типа с последующим введением вектора для экспрессии mHtt или его фрагмента [16].

Интересной и перспективной моделью БХ являются кортикостриатальные срезы мозга крысы, трансфицированные конструкциями, экспрессирующими mHtt человека. Эта модель имеет преимущество перед простыми клеточными моделями, поскольку она поддерживает постоянное взаимодействие между

клетками, что важно при изучении патогенеза БХ [70]. Эта модель может быть использована для изучения действия потенциальных терапевтических агентов, эффективных при БХ.

Один из наиболее современных и многообещающих подходов к моделированию БХ и других нейродегенеративных заболеваний – использование пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (HDiPSC), в которых мутантные формы хантингтина экспрессируются эндогенно. Разработаны протоколы дифференцировки iPSC в фенотип, сходный с фенотипом срединных шипиковых нейронов стриатума (MSN) [71–73] – клеток, наиболее уязвимых при БХ. Одним из преимуществ HDiPSC является возможность изучения патологических процессов, связанных с экспрессией mHtt с небольшой длиной polyQ-тракта [73], которая, как правило, не вызывает патологических изменений в других моделях.

Экспрессия генов и белков в HDiPSC отличалась от экспрессии в контроле, наблюдались изменения в протеостазе, развитии нейронов, внутриклеточном

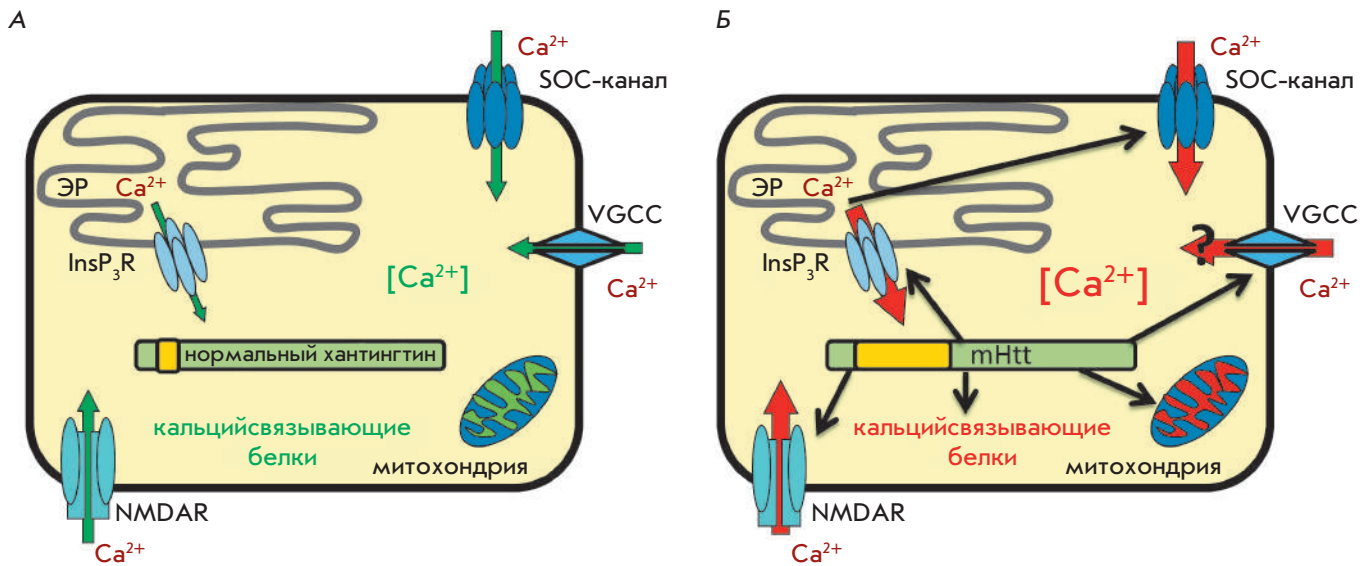


Рис. 4. Нарушения кальциевой сигнализации в клетках, экспрессирующих mHtt. **А** – основные пути регуляции кальциевого гомеостаза в нормальных клетках. Зелеными стрелками показаны основные потоки кальция в норме. **Б** – влияние экспрессии mHtt на кальциевый гомеостаз в клетках. Красными стрелками выделены основные потоки, патологически нарушенные или потенциально нарушенные при БХ. Красным цветом также показаны изменения проницаемости митохондриальной мембраны и нарушения в экспрессии и функции кальцийсвязывающих белков. Черными стрелками проиллюстрированы блоки кальциевой сигнализации, на которые влияет экспрессия mHtt. Обозначения на рисунках: ЭР – эндоплазматический ретикулум, NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата, VGCC – потенциал-управляемые кальциевые каналы, SOC-канал – депо-управляемый кальциевый канал, InsP₃R – рецептор инозитолтрифосфата

транспорте, метаболизме РНК и клеточном метаболизме [74]. Кроме того, степень нарушения экспрессии прямо коррелировала с длиной polyQ-тракта. Дифференцированные из HDiPSC нейроны имели ассоциированный с заболеванием фенотип, в том числе электрофизиологические изменения, изменения метаболизма, клеточной адгезии и клеточной токсичности. Клетки, содержащие самый длинный polyQ-тракт, были наиболее чувствительными к стрессу, например, к отсутствию в клеточной среде BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Изучение нейронов, дифференцированных из HDiPSC, выявило изменения в активности лизосом [73, 75], фрагментации митохондрий [76] и работе репрессоров транскрипции [77].

Еще одна сфера использования HDiPSC – трансплантация клеток для «замещения» больных клеток. Предшественники нейронов, дифференцированные из iPSC, имплантировали крысам, моделирующим БХ. При этом наблюдали восстановление нормального поведения [78]. Оказалось, что предшественники нейронов из HDiPSC в той же мере восстанавливали популяцию ГАВАергических нейронов стриатума и приводили к нормализации поведения крыс, однако

в данном случае на длительных сроках наблюдений пересаженные клетки начинали проявлять патологические свойства [78], что подчеркивает необходимость предварительной генетической коррекции при проведении аутологической трансплантации.

НАРУШЕНИЕ ГОМЕОСТАЗА КАЛЬЦИЯ ПРИ БХ

Нарушения кальциевой сигнализации характерны для различных нейродегенеративных заболеваний, таких, как БХ, болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофической склероз [16, 79–81]. На животных моделях БХ, созданных с использованием генетически доставляемого mHtt или индуцированных 3-нитропропионой кислотой (3-NPA), показано, что нарушение кальциевой сигнализации является отличительной чертой БХ.

Влияние mHtt на кальциевую сигнализацию в клетке происходит сразу по многим направлениям, включая взаимодействие с кальцийсвязывающими белками, мембранами митохондрий, регуляцию притока кальция из внеклеточной среды и высвобождения кальция из внутриклеточных депо (рис. 4).

Среди главных участников нейрональной кальциевой сигнализации можно выделить кальцийсвязыва-

ющие белки, активирующиеся при связывании с Ca^{2+} и регулирующие уровень свободного Ca^{2+} ; белки, экспортирующие Ca^{2+} из цитозоля во внеклеточную среду (АТФ-азы плазматической мембраны, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменники) или в полость органелл (SERCA), а также кальциевые каналы, отвечающие за доставку Ca^{2+} в цитоплазму [82, 83].

mHtt взаимодействует непосредственно с кальцийсвязывающими белками [84], что может приводить к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} и нарушению нормального функционирования этих белков [85]. В частности, взаимодействие mHtt с кальмодулином обнаружено в белковых комплексах с большой молекулярной массой [84], а нарушение этого взаимодействия оказывало нейропротекторный эффект [85, 86]. Одна из причин опасности длительного повышения уровня Ca^{2+} в цитозоле – активация кальпаина, Ca^{2+} -активируемой цистеиновой протеазы, действие которой практически необратимо. Кальпаин разрушает белки цитоскелета и другие примембранные белки. На *Drosophila*, моделирующей БХ, показано, что подавление кальпаина предотвращает агрегацию и токсичность mHtt, стимулируя аутофагию. Сверхэкспрессия кальпаина – ингибитора кальпаина, увеличивает количество аутофагосом и благоприятно влияет на мышей, моделирующих БХ, что делает этот процесс подходящим для разработки подходов к терапии БХ [87].

Важно отметить, что нарушение кальциевой сигнализации при БХ происходит еще на уровне транскрипции, так как фрагменты mHtt влияют на изменение экспрессии некоторых генов кальциевого гомеостаза как в мышинных моделях, так и у пациентов с БХ [6, 88]. Геномные исследования, проведенные на различных моделях БХ, выявили существенные различия в уровнях мРНК генов, кодирующих белки, участвующие во внутриклеточной Ca^{2+} -регуляции, в том числе таких кальцийсвязывающих белков, как парвальбумин, кальмодулин, кальбиндин, гипокальцин; а также рианодиновый рецептор типа 1, рецептор инозитолтрифосфата ($\text{InsP}_3\text{R1}$) и различные субъединицы потенциал-управляемых кальциевых каналов (VGCC) [88–91]. В частности, в мононуклеарных клетках периферической крови при БХ снижен уровень мРНК кальциевого насоса саркоплазматического ретикулума SERCA2 [92].

Недавно с использованием анализа категорий генов выявили ряд генов, кодирующих белки кальциевой сигнализации, экспрессия которых нарушена в нейронах, дифференцированных из HDiPSC [73].

Нарушения транскрипции могут дополнительно усиливаться благодаря кальций-зависимым механизмам контроля. Это может проявляться в резуль-

тате нарушений в кальций-зависимой регуляции активности и стабильности факторов транскрипции, а также изменения функций некоторых кальцийсвязывающих белков, например репрессора транскрипции DREAM (downstream responsive element antagonist modulator), который перемещается в ядро в ответ на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле [93, 94]; и кофактора LMO4, активность которого индуцируется притоком Ca^{2+} через VGCC [95].

Также при БХ увеличивается активность глутаматных рецепторов, что приводит к значительному притоку кальция через плазматическую мембрану (ПМ) в цитозоль, нейрональным нарушениям и клеточной гибели. Обнаружена связь между полиглутаминовой экспансией и чувствительностью нейронов к опосредованной глутаматом эксайтотоксичности [96]. Увеличение входа кальция в цитозоль через рецепторы NMDA (NMDAR) обусловлено потенцирующим влиянием mHtt на транспорт и встраивание NMDAR в ПМ [97]. При этом различия в уровнях экспрессии и субъединичном составе NMDAR в разных клетках могут быть одной из причин, объясняющих селективную гибель MSN при БХ [98]. Фармакологическое ингибирование NMDAR оказывало нейропротекторное действие на первичную культуру мышинных MSN, моделирующих БХ [99, 100]. Необходимо также отметить, что мыши YAC128 отличались повышенной экспрессией внесинаптического NMDAR, что приводило к нарушению сигнальных путей p38 MAPK и CREB, дисфункции и атрофии стриатума [101].

Показано также, что mHtt влияет на VGCC, связываясь непосредственно с вспомогательной $\alpha 2/\delta$ -субъединицей VGCC [102]. Ассоциация N-концевого домена хантингина (как мутантного, так и нормального) с каналобразующей $\text{CaV}2.2$ -субъединицей VGCC N-типа приводит к замещению синтаксина 1A, осуществляющего негативную регуляцию канала, и, как следствие, к увеличению активности VGCC N-типа [103]. Этот пример указывает на возможные физиологические функции отщепления N-концевого фрагмента от нормального хантингина, тогда как для понимания роли VGCC N-типа в патологии необходимы дальнейшие исследования. В то же время возможную гиперфункцию VGCC при БХ подтверждают полученные на *Drosophila* результаты, показывающие, что удаление Dmca1D (белка, образующего у дрозофил пору VGCC L-типа) приводит к снижению нейродегенерации фоторецептора [104].

Сверхэкспрессия фрагментов mHtt в клетках-предшественниках нейронов стриатума (Q7/7) приводит к значительному снижению $[\text{Ca}^{2+}]$ в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), в то время как $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле оставалась такой же, как в контроле [105].

Аппликация циклопиазоновой кислоты индуцировала повышение выброса Ca^{2+} из ЭР в цитозоль в линии клеток стриатума, полученной из knock-in мышечных эмбрионов, экспрессирующих mHtt с 111Q [106]. В то же время экспрессия mHtt в клетках PC-12 не приводила к статистически значимым изменениям в содержании кальция в ЭР [91].

Показано, что mHtt (но не Htt дикого типа) непосредственно взаимодействует с C-концевой частью $\text{InsP}_3\text{R1}$, увеличивая его чувствительность к InsP_3 [107], тем самым способствуя оттоку Ca^{2+} из ЭР. Важная роль $\text{InsP}_3\text{R1}$ в нейротоксичности, вызванной полиглутаминовой экспансией, подтверждена экспериментально на первичной культуре MSN мышей, моделирующих БХ [99, 102], а также на *D. melanogaster* [108]. Установлено также, что пептид, дестабилизирующий взаимодействие между mHtt и $\text{InsP}_3\text{R1}$, оказывает нейропротекторное действие на клетки MSN, моделирующие БХ [109]. Кроме того, подавление экспрессии гена InsP_3R уменьшает агрегацию mHtt [110], что подчеркивает важность взаимодействия двух белков в патогенезе БХ.

mHtt, взаимодействуя с $\text{InsP}_3\text{R1}$ и влияя тем самым на содержание Ca^{2+} в ЭР, может нарушать функции SOC (Store-Operated Calcium) каналов. Активация этих каналов происходит в ответ на понижение концентрации кальция во внутриклеточных кальциевых депо, наиболее общим из которых является ЭР. Таким образом, результатом активации $\text{InsP}_3\text{R1}$ будет не только опустошение депо, но и последующий депо-управляемый вход кальция через ПМ. При этом важно отметить, что нарушение SOCE (SOC Entry) обнаружено при многих нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, спиноцеребеллярную атаксию и БХ [80, 111–113].

Нарушение SOCE может быть обусловлено изменением уровня белков STIM1/2, содержащих домены типа EF-hand и выполняющих функции сенсоров кальция в просвете ЭР. Такие изменения могут быть вызваны нарушениями протеасомной деградации, которые наблюдаются при нейродегенерации [114].

Значительное увеличение SOCE обнаружено в клетках нейробластомы SK-N-SH, экспрессирующих mHtt138Q [113]. Предположили, что значительное повышение SOCE в клетках, моделирующих БХ, опосредовано не изменением свойств каналов SOC, а увеличением их количества, однако, следует отметить, что прямые экспериментальные доказательства этой гипотезы в дальнейшем не были представлены.

В клетках SK-N-SH, экспрессирующих не полно-размерный mHtt, но его N-концевой фрагмент, также наблюдалось значительное повышение SOCE.

Дополнительно было показано, что для активации SOCE необходим белок STIM1. В условиях супрессии STIM1 происходило снижение SOCE, причем регистрируемые токи можно было разделить на два типа: с высоким и низким потенциалом реверсии, что предполагает конкуренцию за взаимодействие со STIM1 SOC-каналов минимум двух типов [115]. Данные о том, что не менее двух различных белков опосредуют вход кальция по депо-управляемому механизму, также получены на моделях БХ – клетках нейробластомы мыши Neuro-2a и на первичной культуре нейронов стриатума мыши [16]. Используя методы локальной фиксации потенциала и РНК-интерференции, установили, что каналобразующие белки Orai1 и TRPC1 совместно поддерживают SOCE в клетках, экспрессирующих N-концевой фрагмент mHtt со 138Q, что может объясняться существованием гетеромерного канала, содержащего субъединицы Orai1 и TRPC1 [16]. Предположения о существовании такого гетеромерного канала высказывались еще в 2007 [116], однако в дальнейшем экспериментальных данных, подтверждающих этот тезис, опубликовано не было. В то же время показано, что вход кальция через каналы, образованные Orai1, необходим для встраивания белков TRPC1 в ПМ [117]. Таким образом, можно предположить, что основной вклад в амплитуду депо-управляемых токов в клетках Neuro-2a, моделирующих БХ, вносят белки TRPC1, что подтверждается драматическим падением тока в условиях супрессии TRPC1. Однако в условиях супрессии Orai1 также наблюдалось значительное снижение амплитуды SOCE, что теперь можно объяснить не только уменьшением тока через Orai1, но и снижением TRPC1-опосредованной компоненты тока вследствие нарушения трафика TRPC1 на плазматическую мембрану [16]. Важность TRPC1 в патогенезе БХ подтверждают результаты, согласно которым супрессия TRPC1 с помощью короткой интерферирующей РНК оказывает значительный протекторный эффект на MSN мышей YAC128 в модели апоптоза, индуцированного глутаматом. При этом супрессия TRPC1 в нейронах мышей дикого типа практически не влияла на гибель клеток, опосредованную глутаматом [111].

Экспрессия N-концевого фрагмента mHtt в первичной культуре MSN также приводит к аномально большому депо-управляемому входу кальция в цитозоль [16]. Эти результаты подтверждаются измерениями внутриклеточной концентрации кальция с помощью кальциевого зонда FURA-2 в клетках MSN, выделенных из мышей YAC128 [111]. Более того, изучено действие на данные клетки соединения EVP4593 – блокатора сигнального пути NF- κ B [111]. Известна тесная связь между активацией NF- κ B

и депо-управляемым входом кальция [118, 119]. NF- κ B способен связываться с геном *Htt* и усиливать активность его промотора в нейронах стриатума мыши [24]. mHtt также может связываться с одним из ключевых ферментов сигнального пути NF- κ B, ИКК, увеличивая тем самым его активность [120].

Показано, что соединение EVP4593 обратимо снижает аномально большой SOCE до контрольных значений как в SK-N-SH, экспрессирующих mHtt с 138Q, так и в MSN мышей YAC128 [111]. Аналогичный эффект EVP4593 оказывал на клетки MSN, экспрессирующие N-концевой фрагмент mHtt [16]. В настоящее время можно считать доказанным, что соединение EVP4593 действует как блокатор SOCE, необходимого для начальных этапов активации сигнальных путей NF- κ B, однако поиски молекулярной мишени EVP4593 продолжаются до сих пор.

Следует отметить, что EVP4593 обладает высоким терапевтическим потенциалом, поскольку оказывает нейропротекторный эффект при индуцированном глутаматом апоптозе MSN из мышей YAC128 и вызывает положительный эффект в тестах на моторику на *D. melanogaster*, моделях БХ [111]. Как показали цитофлуориметрические измерения, инкубация клеток Neuro-2a, моделирующих БХ, с EVP4593 приводила к повышению выживаемости этих клеток [16].

На основе опубликованных данных можно предположить, что нейропротекторный эффект EVP4593 обусловлен существованием отрицательной обратной связи в цепочке воздействия mHtt на клетку. Поскольку NF- κ B способен связываться непосредственно с *Htt* и усиливать активность его промотора [24], а EVP4593 блокирует проведение сигнала NF- κ B, возможным результатом аппликации EVP4593 может стать снижение экспрессии mHtt и, как следствие, уменьшение его токсических функций. Тем не менее, для подтверждения подобного предположения требуются дополнительные исследования.

Особый интерес представляет изучение влияния экспрессии mHtt на SOCE, выполненное на БХ-специфичных нейронах человека, дифференцированных из iPSC и экспрессирующих mHtt с низким количеством Q в тракте. Несмотря на то что полиглутаминовый тракт mHtt в этой модели заболевания содержал всего 40–47Q, что находится на границе с нормой, изменения в SOCE оказались столь же существенными, как и в других моделях, где длина тракта превышала 100Q [73]. При этом соединение EVP4593 снижало амплитуду SOCE как при патологии, так и в контроле, а также оказывало нейропротекторный эффект при воздействии ингибитора протеасом MG132 [73].

В целом, проведенные исследования показывают, что нарушения SOCE носят систематический ха-

рактер и наблюдаются в различных клеточных моделях БХ (рис. 5) [16, 73, 111]. Данный факт может говорить о том, что нарушения SOCE предшествуют, по-видимому, иным патологическим процессам, происходящим при БХ и, возможно, являются одним из центральных механизмов, лежащих в основе нейродегенерации. Таким образом, SOCE можно считать перспективной мишенью для разработки подходов к терапии БХ, а полученные на различных клеточных моделях данные позволяют надеяться на создание лекарственного средства на основе соединения EVP4593.

Предполагается, что увеличение SOCE влияет непосредственно на способность митохондрий запасать Ca^{2+} , так как митохондрии находятся в непосредственной близости от области выброса Ca^{2+} из ЭР [121]. Митохондрия является одним из главных регуляторов внутриклеточного уровня Ca^{2+} . При значительном увеличении $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле в непосредственной близости от митохондрии происходит активация низкоаффинного митохондриального Ca^{2+} -унипортера (MCU), опосредуя приток Ca^{2+} в матрикс. Митохондрии высвобождают Ca^{2+} с помощью $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника [122] или, в случае перегрузки кальцием, через мегапоры (PTP), активация которых приводит к скачку мембранного потенциала, разрыву наружной мембраны и высвобождению цитохрома c и каспаз, следствием чего является апоптотическая гибель клетки [123, 124]. Вовлеченность митохондриальной дисфункции в патогенез БХ подтверждается, в частности, тем, что 3-нитропропионовая кислота, используемая в качестве ингибитора комплекса II дыхательной цепи митохондрий, вызывает нарушения, характерные для БХ [125]. Еще одно доказательство важной роли митохондрий в патогенезе БХ – нейропротекторный эффект ингибиторов проницаемости митохондриальной мембраны, показанный как на клеточных, так и на животных моделях [99, 126].

При экспрессии mHtt обнаружены также дефекты митохондриальной морфологии. В клеточной линии, полученной из knock-in мышинных эмбрионов, экспрессирующих mHtt с 111Q, митохондрии более склонны к фрагментации по причине того, что нарушение $[\text{Ca}^{2+}]$ в цитозоле способствует усилению активности кальций-зависимой фосфатазы – кальцинейрина, дефосфорилирующей (и таким образом активирующей) белок Drp1, ответственный за деление митохондрий. В конечном счете, усиленная фрагментация митохондрий увеличивает склонность клеток к апоптозу [106].

Нарушения забуферивания Ca^{2+} и кальциевого обмена в митохондриях зарегистрированы как на ранних, так и на поздних стадиях БХ, что ука-

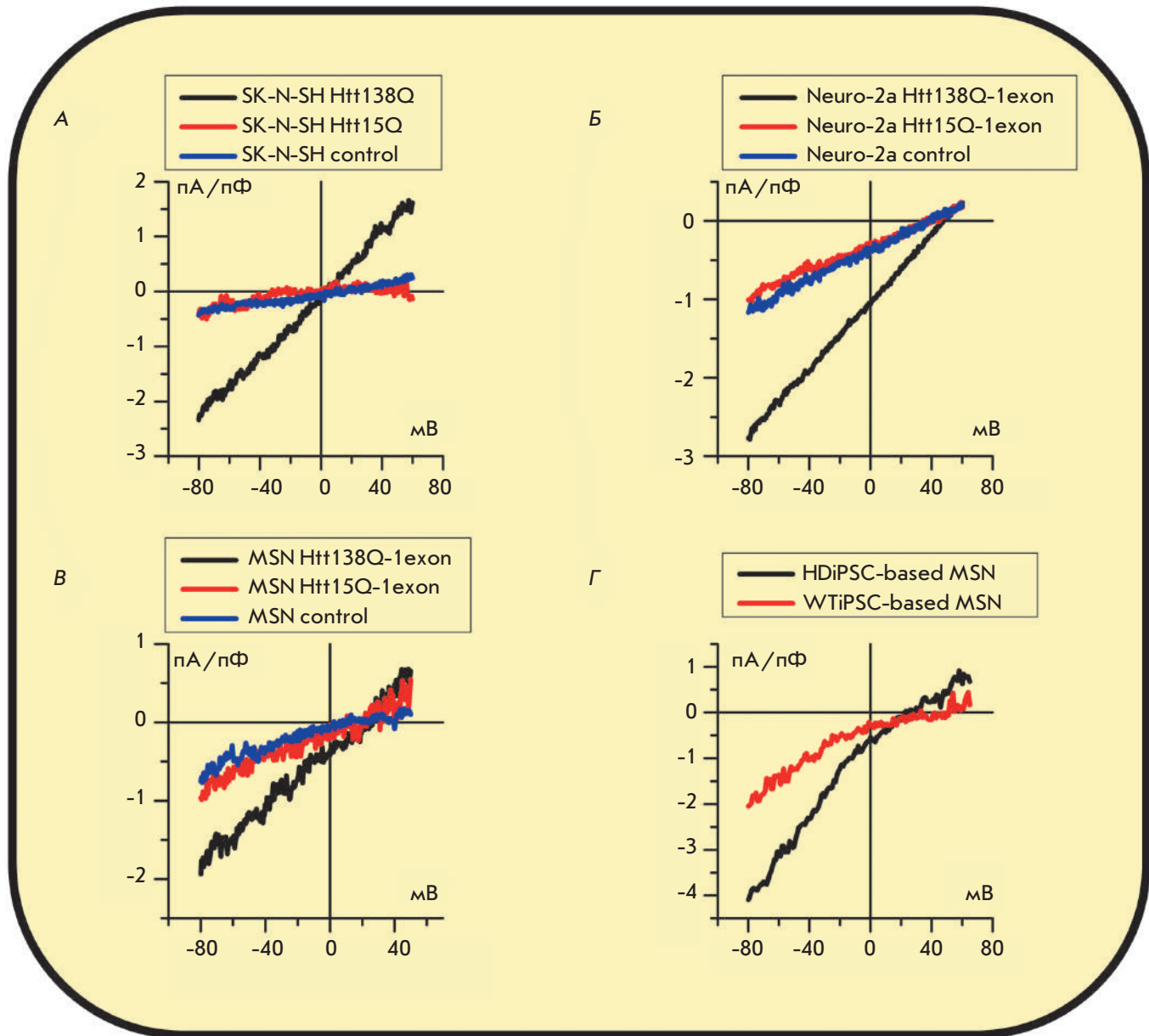


Рис. 5. Патологическое увеличение депо-управляемого входа кальция в различных клеточных моделях болезни Хантингтона. Средние вольт-амперные характеристики депо-управляемых токов, нормированных на емкость клеток на максимуме их развития: *А* – в клетках нейробластомы человека SK-N-SH, экспрессирующих полноразмерный хантингтин 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [111]; *Б* – в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a, экспрессирующих первый экзон хантингтина, содержащий 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [16]; *В* – в клетках первичной культуры нейронов стриатума мыши MSN, экспрессирующих первый экзон хантингтина, содержащий 138Q, 15Q или пустой контрольный вектор [16]; *Г* – в нейронах человека, дифференцированных из Хантингтон-специфичных iPSC или из iPSC дикого типа [73]

зывает на ключевую роль этих нарушений в патогенезе заболевания. Митохондрии, выделенные из клеток мозга пациентов с БХ и из клеток мышей, моделирующих БХ, более чувствительны к нагрузке Ca^{2+} и склонны к образованию мегаспор [127, 128]. Аналогичные результаты получены позднее на им-

мортилизованной линии клеток-предшественников нейронов стриатума, полученной из knock-in мышей KI-Hdh^{Q111} [129]. Тем не менее, восприимчивость митохондрий к кальциевой нагрузке воспроизводилась не во всех экспериментальных моделях. Например, стриатальные митохондрии, полученные из knock-

in мышей, экспрессирующих различные варианты mHtt (80, 92 или 111Q), из мышей R6/2, а также из мышей YAC128 были одинаково, а в некоторых случаях даже менее восприимчивы к Ca^{2+} -нагрузке, чем контрольные образцы дикого типа [130, 131]. Кроме того, чувствительность митохондрий к Ca^{2+} -нагрузке в некоторых моделях БХ снижалась пропорционально возрасту и длине polyQ-тракта [130], что предполагает наличие защитных компенсаторных механизмов. Недавно проведенное изучение изолированных митохондрий и стриатальных нейронов мышей R6/2 также выявило отсутствие дисфункции дыхательной цепи и повышенной чувствительности митохондрий к кальциевой нагрузке [132]. Таким образом, роль митохондрий в патогенезе БХ остается дискуссионной, и необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение молекулярных механизмов заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на длительную историю изучения БХ, проблемы манифестации, моделирования и изучения молекулярных основ заболевания остаются актуальными. В данном обзоре рассмотрены клеточные и животные модели, широко используемые при изучении патологических процессов при БХ, а также для скрининга потенциальных лекарственных средств. Особый интерес представляют модели, основанные на эндогенной экспрессии мутантно-

го хантингтина в нейронах, дифференцированных из пациент-специфичных iPSC. Анализ современных публикаций позволяет сделать вывод о том, что нарушения кальциевой сигнализации являются одним из центральных звеньев, опосредующих развитие патологии и приводящих к гибели нейронов. Один из важнейших сегментов кальциевой сигнализации, нарушенный при БХ, – депо-управляемый вход кальция, патологическое увеличение которого показано на многих упомянутых в обзоре моделях. Вероятно, нарушение содержания кальция в ЭР вкупе с сопряженным избыточным депо-управляемым входом кальция через ПМ может оказывать влияние на митохондрии, которые начинают активировать процессы клеточной гибели, будучи не в силах депонировать излишки кальция.

Подводя итог, необходимо отметить, что изучение нейродегенерации является интенсивно развивающейся научной областью, что дает надежду на составление полной фундаментальной картины процессов нейродегенерации и разработку новых лекарственных средств, эффективных при таких заболеваниях, как БХ, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другие патологии. ●

*Работа поддержана грантом РФ
№14-14-00720 (ЕВК), Программой Президиума РАН
«Молекулярная и клеточная биология» (ЮАК),
стипендиями Президента РФ (ВВВ и АВШ).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Huntington G. // Med. Surg. Rept. Philadelphia. 1872. V. 26. № 15. P. 317–321.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group // Cell. 1993. V. 72. № 6. P. 971–983.
- Vonsattel J.P., DiFiglia M. // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1998. V. 57. № 5. P. 369–384.
- Угрюмов М.В. // Вестник РАМН. 2010. № 8. С. 6–19.
- Sarkar A., Irwin M., Singh A., Riccetti M., Singh A. // Neural Regen. Res. 2016. V. 11. № 5. P. 693–697.
- Zuccato C., Valenza M., Cattaneo E. // Physiol. Rev. 2010. V. 90. № 3. P. 905–981.
- Francelle L., Galvan L., Brouillet E. // Front Cell Neurosci. 2014. V. 8. P. 295.
- Plotkin J.L., Surmeier D.J. // Curr. Opin. Neurobiol. 2015. V. 33. P. 53–62.
- Sepers M.D., Raymond L.A. // Drug Discov. Today. 2014. V. 19. № 7. P. 990–996.
- Margulis J., Finkbeiner S. // Front Cell Neurosci. 2014. V. 8. P. 218.
- Hinckelmann M., Zala D., Saudou F. // Trends Cell Biol. 2013. V. 23. № 12. P. 634–643.
- Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // Nat. Neurosci. 2002. V. 5. № 8. P. 731–736.
- Costa V., Scorrano L. // EMBO J. 2012. V. 31. № 8. P. 1853–1864.
- Reddy P.H., Shirendeb U.P. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1822. № 2. P. 101–110.
- Giacomello M., Oliveros J.C., Naranjo J.R., Carafoli E. // Prion. 2013. V. 7. № 1. P. 76–84.
- Vigot V., Kolobkova Y., Skopin A., Zimina O., Zenin V., Glushankova L., Kaznacheyeva E. // Front. Physiol. 2015. V. 6. P. 337.
- Wu J., Ryskamp D.A., Liang X., Egorova P., Zakharova O., Hung G., Bezprozvanny I. // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 1. P. 125–141.
- Walker F.O. // Lancet. 2007. V. 369. № 9557. P. 218–228.
- Andrew S., Theilmann J., Almqvist E., Norremolle A., Lucotte G., Anvret M., Sorensen S.A., Turpin J.C., Hayden M.R. // Clin. Genet. 1993. V. 43. № 6. P. 286–294.
- Langbehn D.R., Brinkman R.R., Falush D., Paulsen J.S., Hayden M.R., International Huntington's Disease Collaborative Group. // Clin. Genet. 2004. V. 65. № 4. P. 267–277.
- Brinkman R.R., Mezei M.M., Theilmann J., Almqvist E., Hayden M.R. // Am. J. Hum. Genet. 1997. V. 60. № 5. P. 1202–1210.
- Nazé P., Vuillaume I., Destée A., Pasquier F., Sablonnière B. // Neurosci. Lett. 2002. V. 328. № 1. P. 1–4.
- Metzger S., Rong J., Nguyen H.P., Cape A., Tomiuk J., Soehn A.S., Propping P., Freudenberg-Hua Y., Freudenberg J., Tong L., et al. // Hum. Mol. Genet. 2008. V. 17. № 8. P. 1137–1146.
- Bečanović K., Norremolle A., Neal S.J., Kay C., Collins J.A.,

- Arenillas D., Lilja T., Gaudenzi G., Manoharan S., Doty C.N., et al. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 6. P. 807–816.
25. Wild E.J., Boggio R., Langbehn D., Robertson N., Haider S., Miller J.R., Zetterberg H., Leavitt B.R., Kuhn R., Tabrizi S.J., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 5. P. 1979–1986.
26. Hu Y., Chopra V., Chopra R., Locascio J.J., Liao Z., Ding H., Zheng B., Matson W.R., Ferrante R.J., Rosas H.D., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 41. P. 17141–17146.
27. Mastrokoulas A., Ariyurek Y., Goeman J.J., van Duijn E., Roos R.A., van der Mast R.C., van Ommen G.B., den Dunnen J.T., 't Hoen P.A., van Roon-Mom W.M. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2015. V. 23. № 10. P. 1349–1356.
28. Aziz N.A., Anguelova G.V., Marinus J., Lammers G.J., Roos R.A. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2010. V. 16. № 5. P. 345–350.
29. Mesko B., Poliska S., Szegedi A., Szekanez Z., Palatka K., Papp M., Nagy L. // *BMC Med. Genomics.* 2010. V. 3. P. 15.
30. Demougeot C., Garnier P., Mossiat C., Bertrand N., Giroud M., Beley A., Marie C. // *J. Neurochem.* 2001. V. 77. № 2. P. 408–415.
31. Sturrock M., Hao W., Schwartzbaum J., Rempala G.A. // *J. Theor. Biol.* 2015. V. 380. P. 299–308.
32. Wood N.I., Goodman A.O., van der Burg J.M., Gazeau V., Brundin P., Björkqvist M., Petersén A., Tabrizi S.J., Barker R.A., Morton A.J. // *Brain Res. Bull.* 2008. V. 76. № 1–2. P. 70–79.
33. Weir D.W., Sturrock A., Leavitt B.R. // *Lancet Neurol.* 2011. V. 10. № 6. P. 573–590.
34. Chen C.M., Wu Y.R., Cheng M.L., Liu J.L., Lee Y.M., Lee P.W., Soong B.W., Chiu D.T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. V. 359. № 2. P. 335–340.
35. Dalrymple A., Wild E.J., Joubert R., Sathasivam K., Björkqvist M., Petersén A., Jackson G.S., Isaacs J.D., Kristiansen M., Bates G.P., et al. // *J. Proteome Res.* 2007. V. 6. № 7. P. 2833–2840.
36. Ehrnhöfer D.E., Sutton L., Hayden M.R. // *Neuroscientist.* 2011. V. 17. № 5. P. 475–492.
37. Harjes P., Wanker E.E. // *Trends Biochem. Sci.* 2003. V. 28. P. 425–433.
38. Warby S.C., Doty C.N., Graham R.K., Carroll J.B., Yang Y.Z., Singaraja R.R., Overall C.M., Hayden M.R. // *Hum. Mol. Genet.* 2008. V. 17. № 15. P. 2390–2404.
39. Kim M.W., Chelliah Y., Kim S.W., Otwinowski Z., Bezprozvanny I. // *Structure.* 2009. V. 17. № 9. P. 1205–1212.
40. Michalek M., Salnikow E.S., Bechinger B. // *Biophys. J.* 2013. V. 105. № 3. P. 699–710.
41. Vijayvargia R., Epand R., Leitner A., Jung T.Y., Shin B., Jung R., Lloret A., Singh Atwal R., Lee H., Lee J.M., et al. // *Elife.* 2016. pii: e11184.
42. DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. // *Science.* 1997. V. 277. № 5334. P. 1990–1993.
43. Davies S.W., Turmaine M., Cozens B.A., DiFiglia M., Sharp A.H., Ross C.A., Scherzinger E., Wanker E.E., Mangiarini L., Bates G.P. // *Cell.* 1997. V. 90. № 3. P. 537–548.
44. Rockabrand E., Slepko N., Pantalone A., Nukala V.N., Kazantsev A., Marsh J.L., Sullivan P.G., Steffan J.S., Sensi S.L., Thompson L.M. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 1. P. 61–77.
45. Sadri-Vakili G., Cha J.H. // *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2006. V. 2. № 6. P. 330–338.
46. Gutekunst C.A., Li S.H., Yi H., Mulroy J.S., Kuemmerle S., Jones R., Rye D., Ferrante R.J., Hersch S.M., Li X.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 7. P. 2522–2534.
47. Juenemann K., Weisse C., Reichmann D., Kaether C., Calkhoven C.F., Schilling G. // *Neurotox. Res.* 2011. V. 20. № 2. P. 120–133.
48. Saudou F., Finkbeiner S., Devys D., Greenberg M.E. // *Cell.* 1998. V. 95. № 1. P. 55–66.
49. Arrasate M., Mitra S., Schweitzer E.S., Segal M.R., Finkbeiner S. // *Nature.* 2004. V. 431. № 7010. P. 805–810.
50. Stefani M. // *Prog. Neurobiol.* 2012. V. 99. № 3. P. 226–245.
51. Carter R.J., Lione L.A., Humby T., Mangiarini L., Mahal A., Bates G.P., Dunnett S.B., Morton A.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 8. P. 3248–3257.
52. Li H., Li S.H., Cheng A.L., Mangiarini L., Bates G.P., Li X.J. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 7. P. 1227–1236.
53. Menalled L.B., Chesselet M.F. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2002. V. 23. № 1. P. 32–39.
54. Woodman B., Butler R., Landles C., Lupton M.K., Tse J., Hockley E., Moffitt H., Sathasivam K., Bates G.P. // *Brain Res. Bull.* 2007. V. 72. № 2–3. P. 83–97.
55. Li X.J., Li S. // *J. Genet. Genomics.* 2012. V. 39. № 6. P. 239–245.
56. Li Z., Karlovich C.A., Fish M.P., Scott M.P., Myers R.M. // *Hum. Mol. Genet.* 1999. V. 8. № 9. P. 1807–1815.
57. Marsh J.L., Walker H., Theisen H., Zhu Y.Z., Fielder T., Purcell J., Thompson L.M. // *Hum. Mol. Genet.* 2000. V. 9. № 1. P. 13–25.
58. Kahsai L., Zars T. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2011. V. 99. P. 139–167.
59. Morley J.F., Brignull H.R., Weyers J.J., Morimoto R.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 16. P. 10417–10422.
60. Parker J.A., Connolly J.B., Wellington C., Hayden M., Dausset J., Neri C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 23. P. 13318–13323.
61. Giorgini F., Guidetti P., Nguyen Q., Bennett S.C., Muchowski P.J. // *Nat. Genet.* 2005. V. 37. № 5. P. 526–531.
62. Kochneva-Pervukhova N.V., Alexandrov A.I., Ter-Avanesyan M.D. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 1. e29832.
63. Duennwald M.L., Lindquist S. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 23. P. 3308–3319.
64. Colle D., Hartwig J.M., Soares F.A., Farina M. // *Brain Res. Bull.* 2012. V. 87. № 4–5. P. 397–405.
65. Smith D.L., Portier R., Woodman B., Hockley E., Mahal A., Klunk W.E., Li X.J., Wanker E., Murray K.D., Bates G.P. // *Neurobiol. Dis.* 2001. V. 8. № 6. P. 1017–1026.
66. Li S.H., Cheng A.L., Li H., Li X.J. // *J. Neurosci.* 1999. V. 19. № 13. P. 5159–5172.
67. Sarantos M.R., Papanikolaou T., Ellerby L.M., Hughes R.E. // *J. Huntingtons Dis.* 2012. V. 1. № 2. P. 195–210.
68. Milnerwood A.J., Kaufman A.M., Sepers M.D., Gladding C.M., Zhang L., Wang L., Fan J., Coquinco A., Qiao J.Y., Lee H., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 48. № 1. P. 40–51.
69. Doria J.G., Silva F.R., de Souza J.M., Vieira L.B., Carvalho T.G., Reis H.J., Pereira G.S., Dobransky T., Ribeiro F.M. // *Br. J. Pharmacol.* 2013. V. 169. № 4. P. 909–921.
70. Reinhart P.H., Kaltenbach L.S., Essrich C., Dunn D.E., Eudailey J.A., DeMarco C.T., Turmel G.J., Whaley J.C., Wood A., Cho S., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2011. V. 43. № 1. P. 248–256.
71. Ebert A.D., Shelley B.C., Hurley A.M., Onorati M., Castiglioni V., Patitucci T.N., Svendsen S.P., Mattis V.B., McGivern J.V., Schwab A.J., et al. // *Stem Cell Res.* 2013. V. 10. № 3. P. 417–427.
72. Carri A.D., Onorati M., Lelos M.J., Castiglioni V., Faedo A., Menon R., Camnasio S., Vuono R., Spaiardi P., Talpo F., et al. // *Development.* 2013. V. 140. № 2. P. 301–312.
73. Nekrasov E.D., Vigont V.A., Klyushnikov S.A., Lebedeva O.S., Vassina E.M., Bogomazova A.N., Chestkov I.V., Semashko T.A., Kiseleva E., Suldina L.A., et al. // *Mol. Neurodegener.* 2016. V. 11. P. 27. doi: 10.1186/s13024-016-0092-5.
74. HD iPSC Consortium. // *Cell Stem Cell.* 2012. V. 11. № 2. P. 264–278.

75. Camnasio S., Delli Carri A., Lombardo A., Grad I., Mariotti C., Castucci A., Rozell B., Lo Riso P., Castiglioni V., Zuccato C., et al. // *Neurobiol. Dis.* 2012. V. 46. № 1. P. 41–51.
76. Guo X., Disatnik M.H., Monbureau M., Shamloo M., Mochly-Rosen D., Qi X. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 12. P. 5371–5388.
77. Charbord J., Poydenot P., Bonnefond C., Feyeux M., Casagrande F., Brinon B., Francelle L., Auregan G., Guillemier M., Cailleret M., et al. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 9. P. 1816–1828.
78. Jeon I., Lee N., Li J.Y., Park I.H., Park K.S., Moon J., Shim S.H., Choi C., Chang D.J., Kwon J., et al. // *Stem Cells.* 2012. V. 30. № 9. P. 2054–2062.
79. Bezprozvanny I. // *Trends Mol. Med.* 2009. V. 15. № 3. P. 89–100.
80. Ryazantseva M., Skobeleva K., Glushankova L., Kaznacheeva E. // *J. Neurochem.* 2016. V. 136. № 5. P. 1085–1095.
81. Abeti R., Abramov A.Y. // *Pharmacol. Res.* 2015. V. 99. P. 377–381.
82. Saris N.E., Carafoli E. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2005. V. 70. № 2. P. 187–194.
83. Naranjo J.R., Mellström B. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 38. P. 31674–31680.
84. Bao J., Sharp A.H., Wagster M.V., Becher M., Schilling G., Ross C.A., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 10. P. 5037–5042.
85. Kreutz M.R., Naranjo J.R., Koch K.W., Schwaller B. // *Front. Mol. Neurosci.* 2012. V. 5. P. 92.
86. Dudek N.L., Dai Y., Muma N.A. // *Brain Pathol.* 2010. V. 20. № 1. P. 176–189.
87. Menzies F.M., Garcia-Arencibia M., Imarisio S., O’Sullivan N.C., Ricketts T., Kent B.A., Rao M.V., Lam W., Green-Thompson Z.W., Nixon R.A., et al. // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. № 3. P. 433–444.
88. Luthi-Carter R., Hanson S.A., Strand A.D., Bergstrom D.A., Chun W., Peters N.L., Woods A.M., Chan E.Y., Kooperberg C., Krainc D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2002. V. 11. № 17. P. 1911–1926.
89. Hodges A., Strand A.D., Aragaki A.K., Kuhn A., Sengstag T., Hughes G., Elliston L.A., Hartog C., Goldstein D.R., Thu D., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 6. P. 965–977.
90. Kuhn A., Goldstein D.R., Hodges A., Strand A.D., Sengstag T., Kooperberg C., Becanovic K., Pouladi M.A., Sathasivam K., Cha J.H., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 15. P. 1845–1861.
91. Czeredys M., Gruszczynska-Biegala J., Schacht T., Methner A., Kuznicki J. // *Front. Mol. Neurosci.* 2013. V. 6. P. 42.
92. Cesca F., Bregant E., Peterlin B., Zadel M., Dubsky de Wittenau G., Siciliano G., Ceravolo R., Petrozzi L., Pualetto G., Verriello L., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 4. e0125259.
93. Ledo F., Kremer L., Mellström B., Naranjo J.R. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 17. P. 4583–4592.
94. Savignac M., Pintado B., Gutierrez-Adan A., Palczewska M., Mellström B., Naranjo J.R. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 20. P. 3555–3564.
95. Kashani A.H., Qiu Z., Jurata L., Lee S.K., Pfaff S., Goebels S., Nave K.A., Ghosh A. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. № 32. P. 8398–8408.
96. Sun Y., Savanenin A., Reddy P.H., Liu Y.F. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 27. P. 24713–24718.
97. Fan M.M., Fernandes H.B., Zhang L.Y., Hayden M.R., Raymond L.A. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 14. P. 3768–3779.
98. Fan M.M., Raymond L.A. // *Prog. Neurobiol.* 2007. V. 81. № 5–6. P. 272–293.
99. Tang T.S., Slow E., Lupu V., Stavrovskaya I.G., Sugimori M., Llinás R., Kristal B.S., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 7. P. 2602–2607.
100. Shehadeh J., Fernandes H.B., Zeron Mullins M.M., Graham R.K., Leavitt B.R., Hayden M.R., Raymond L.A. // *Neurobiol. Dis.* 2006. V. 21. № 2. P. 392–403.
101. Dau A., Gladding C.M., Sepers M.D., Raymond L.A. // *Neurobiol. Dis.* 2014. V. 62. P. 533–542.
102. Kaltenbach L.S., Romero E., Becklin R.R., Chettier R., Bell R., Phansalkar A., Strand A., Torcassi C., Savage J., Hurlburt A., et al. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 5. e82.
103. Swayne L.A., Chen L., Hameed S., Barr W., Charlesworth E., Colicos M.A., Zamponi G.W., Braun J.E. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2005. V. 30. № 3. P. 339–351.
104. Romero E., Cha G.H., Verstreken P., Ly C.V., Hughes R.E., Bellen H.J., Botas J. // *Neuron.* 2008. V. 57. № 1. P. 27–40.
105. De Mario A., Scarlatti C., Costiniti V., Primerano S., Lopreato R., Cali T., Brini M., Giacomello M., Carafoli E. // *PLoS Curr.* 2016. V. 8. doi: 10.1371/currents.hd37fbc1c9a27503dc845594ee4a7316c3.
106. Costa V., Giacomello M., Hudec R., Lopreato R., Ermak G., Lim D., Malorni W., Davies K.J., Carafoli E., Scorrano L. // *EMBO Mol. Med.* 2010. V. 2. № 12. P. 490–503.
107. Tang T.S., Tu H., Chan E.Y., Maximov A., Wang Z., Wellington C.L., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Neuron.* 2003. V. 39. № 2. P. 227–239.
108. Zhang H., Li Q., Graham R.K., Slow E., Hayden M.R., Bezprozvanny I. // *Neurobiol. Dis.* 2008. V. 31. № 1. P. 80–88.
109. Tang T.S., Guo C., Wang H., Chen X., Bezprozvanny I. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 5. P. 1257–1266.
110. Bauer P.O., Hudec R., Ozaki S., Okuno M., Ebisui E., Mikoshiba K., Nukina N. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 416. № 1–2. P. 13–17.
111. Wu J., Shih H., Vigont V., Hrdlicka L., Diggins L., Singh C., Mahoney M., Chesworth R., Shapiro G., Ahlijanian M., et al. // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. № 6. P. 777–793.
112. Egorova P., Popugaeva E., Bezprozvanny I. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015. V. 40. P. 127–133.
113. Glushankova L.N., Zimina O.A., Vigont V.A., Mozhaeva G.N., Bezprozvanny I.B., Kaznacheeva E.V. // *Dokl. Biol. Sci.* 2010. V. 433. P. 293–295.
114. Kuang X.L., Liu Y., Chang Y., Zhou J., Zhang H., Li Y., Qu J., Wu S. // *Cell Calcium.* 2016. V. 59. № 4. P. 172–180.
115. Vigont V.A., Zimina O.A., Glushankova L.N., Kolobkova J.A., Ryazantseva M.A., Mozhayeva G.N., Kaznacheeva E.V. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4. P. 40–47.
116. Liao Y., Erxleben C., Yildirim E., Abramowitz J., Armstrong D.L., Birnbaumer L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 11. P. 4682–4687.
117. Cheng K.T., Ong H.L., Liu X., Ambudkar I.S. // *Curr. Top Membr.* 2013. V. 71. P. 149–179.
118. Dolmetsch R.E., Xu K., Lewis R.S. // *Nature.* 1998. V. 392. № 6679. P. 933–936.
119. Chang W.S. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2006. V. 27. № 7. P. 813–820.
120. Khoshnan A., Ko J., Watkin E.E., Paige L.A., Reinhart P.H., Patterson P.H. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. № 37. P. 7999–8008.
121. Kipanyula M.J., Contreras L., Zampese E., Lazzari C., Wong A.K., Pizzo P., Fasolato C., Pozzan T. // *Aging Cell.* 2012. V. 11. № 5. P. 885–893.
122. Carafoli E. // *Biochem. Soc. Symp.* 1974. № 39. P. 89–109.
123. Giacomello M., Drago I., Pizzo P., Pozzan T. // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14. № 7. P. 1267–1274.
124. Giacomello M., Oliveros J.C., Naranjo J.R., Carafoli E. // *Prion.* 2013. V. 7. № 1. P. 76–84.
125. Brouillet E., Jacquard C., Bizat N., Blum D. // *J. Neurochem.* 2005. V. 95. № 6. P. 1521–1540.

126. Wang H., Lim P.J., Karbowski M., Monteiro M.J. // *Hum. Mol. Genet.* 2009. V. 18. № 4. P. 737–752.
127. Panov A.V., Gutekunst C.A., Leavitt B.R., Hayden M.R., Burke J.R., Strittmatter W.J., Greenamyre J.T. // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 5. № 8. P. 731–736.
128. Choo Y.S., Johnson G.V., MacDonald M., Detloff P.J., Lesort M. // *Hum. Mol. Genet.* 2004. V. 13. № 14. P. 1407–1420.
129. Lim D., Fedrizzi L., Tartari M., Zuccato C., Cattaneo E., Brini M., Carafoli E. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 9. P. 5780–5789.
130. Brustovetsky N., LaFrance R., Purl K.J., Brustovetsky T., Keene C.D., Low W.C., Dubinsky J.M. // *J. Neurochem.* 2005. V. 93. № 6. P. 1361–1370.
131. Oliveira J.M., Jekabsons M.B., Chen S., Lin A., Rego A.C., Gonçalves J., Ellerby L.M., Nicholls D.G. // *J. Neurochem.* 2007. V. 101. № 1. P. 241–249.
132. Hamilton J., Pellman J.J., Brustovetsky T., Harris R.A., Brustovetsky N. // *Hum. Mol. Genet.* 2016. pii: ddw133. (Epub).

УДК 577.218

Белки с цинковыми пальцами типа C2H2 – самый многочисленный и наименее изученный класс транскрипционных факторов высших эукариот

А. А. Федотова, А. Н. Бончук, В. А. Могила, П. Г. Георгиев*

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

*E-mail: georgiev_p@mail.ru

Поступила в редакцию 27.10.2016

Принята к печати 22.02.2017

РЕФЕРАТ С появлением методов полногеномного анализа стало возможным широкомасштабное изучение распределения транскрипционных факторов на регуляторных элементах в геноме (энхансерах, промоторах, сайленсерах и инсуляторах), а также выявление ключевых принципов организации хромосом. Однако белковые факторы, отвечающие за архитектуру хромосом и организацию регуляторных доменов, остаются почти неисследованными. В настоящем обзоре предпринята попытка обобщить данные, которые касаются обширного класса белков, имеющих кластеры доменов цинковых пальцев C2H2-типа (C2H2-белки). К этому классу относится хорошо исследованный консервативный белок CTCF, ключевой, согласно современным представлениям, для формирования архитектуры хромосом позвоночных. Отличительными особенностями C2H2-белков являются специфичное и эффективное связывание с уникальными длинными последовательностями ДНК и быстрое распространение в процессе эволюции в пределах таксонов. Приведенные в обзоре данные позволяют предложить модель, согласно которой многие C2H2-белки выполняют функции, сходные с CTCF в организации архитектуры хромосом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА KRAB-домен, ZAD-домен, SCAN-домен, CTCF, архитектурные белки, транскрипционные факторы.

СОКРАЩЕНИЯ а.о. – аминокислотный остаток (при числе); C2H2-белки – белки, содержащие кластеры цинковых пальцев C2H2-типа; ТАД – топологически ассоциированные домены; ТФ – транскрипционный фактор.

ВВЕДЕНИЕ

В результате проведенных за последние годы полногеномных исследований внутри- и межхромосомных взаимодействий установлено, что хромосомы человека, мыши и дрозофилы организованы в большие топологические домены (ТАД) [1–4]. Внутри топологических доменов могут происходить дистанционные взаимодействия между промоторами, энхансерами и сайленсерами, что определяет регуляцию экспрессии генов [5, 6]. Однако механизмы, обеспечивающие организацию и поддержание архитектуры хромосом, остаются почти неизученными [7]. Предполагается, что существует особый класс архитектурных белков, инактивация которых значительно влияет на распределение меж- и внутрихромосомных контактов [8, 9].

У позвоночных описан высококонсервативный транскрипционный фактор (ТФ) CTCF, который

считается основным архитектурным белком хромосом [10, 11]. Вместе с когезиновым комплексом CTCF участвует в организации границ топологических доменов, а также поддерживает дистанционные взаимодействия между регуляторными элементами внутри доменов [12–14]. Белок CTCF содержит кластер доменов цинковых пальцев C2H2-типа, часть из которых определяет высокоспецифичное связывание белка с ДНК. Белки с цинковыми пальцами C2H2-типа (C2H2-белки) появились рано в процессе эволюции и найдены у многих эукариотических организмов [15, 16]. Многие из них структурно сходны с CTCF. C2H2-белки можно разделить на три группы [17]: 1) белки, имеющие один-два или много C2H2-доменов, распределенных неупорядоченно, 2) белки, содержащие три C2H2-домена, организованные в кластер на С-конце, 3) белки, содержащие более трех

C2H2-доменов в одном или нескольких кластерах. Наиболее хорошо описана группа консервативных ТФ с тремя C2H2-доменами, многие из которых играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов у всех высших эукариот [18, 19]. Настоящий обзор посвящен намного хуже исследованной группе ТФ, содержащих более трех C2H2-доменов.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ДОМЕНА C2H2-ТИПА

Цинковые пальцы типа C2H2 (Cys2-His2) – одни из наиболее часто встречаемых доменов в составе ТФ высших эукариот. Классический C2H2-домен длиной 28–30 а.о. состоит из β-шпильки (антипараллельный β-лист, состоящий из двух β-тяжей) и следующей за ней α-спирали, которые формируют левозакрученную ββα-структуру (рис. 1А). Стабилизация структуры цинкового пальца достигается с помощью координационной связи атома цинка с двумя консервативными остатками цистеина с одного конца β-листа и двумя консервативными остатками гистидина с С-концевой части α-спирали. Пары цистеинов и гистидинов являются консервативными, так же как гидрофобное ядро, формирующее α-спираль. Остальные аминокислотные остатки в составе C2H2-доменов отличаются значительной вариабельностью.

Одной из первых была расшифрована структура комплекса из трех тандемно расположенных C2H2-доменов белка Zif268 млекопитающих [20]. Показано, что три цинковых пальца образуют полукруг, располагаясь в большой бороздке ДНК (рис. 1А). Каждый из трех C2H2-доменов связывается с тремя-четырьмя нуклеотидами ДНК, используя аминокислоты

в одних и тех же позициях α-спирали (рис. 1Б) – аргинин в позиции –1, а также аминокислотные остатки в позициях 2, 3 и 6. Биохимическое и структурное изучение C2H2-доменов подтвердило ключевую роль аминокислот в этих позициях для специфичного связывания с ДНК. Согласно канонической модели, аминокислоты в положении 6, 3 и –1 отвечают за узнавание первого, второго и третьего нуклеотида с 5'-конца соответственно, а аминокислота в позиции 2 узнает четвертый нуклеотид, который находится на комплементарной цепи (рис. 1Б).

Структурные исследования C2H2-доменов позволили описать новый принцип распознавания ДНК. Отличительной особенностью белков с C2H2-доменами является их специфическое связывание с длинными последовательностями ДНК (20–40 п.н.), что отличает этот класс белков от всех других ТФ, которые обычно узнают сравнительно короткие вырожденные ДНК. Обычно тандемные C2H2-домены, участвующие в узнавании ДНК, разделены консервативными участками, состоящими из 5 а.о. [21]. Разработаны алгоритмы, которые позволяют с высокой степенью вероятности предсказывать последовательность, с которой может связываться кластер C2H2-доменов, и, наоборот, подбирать комбинации C2H2-доменов, узнающих целевые последовательности ДНК [22, 23]. Однако в больших кластерах (более трех C2H2-доменов) интерференция между соседними C2H2-доменами усложняет точное предсказание сайта связывания [24].

В отличие от универсального механизма взаимодействия C2H2-доменов с ДНК, контакты с белками и РНК могут осуществляться с помощью разных ком-

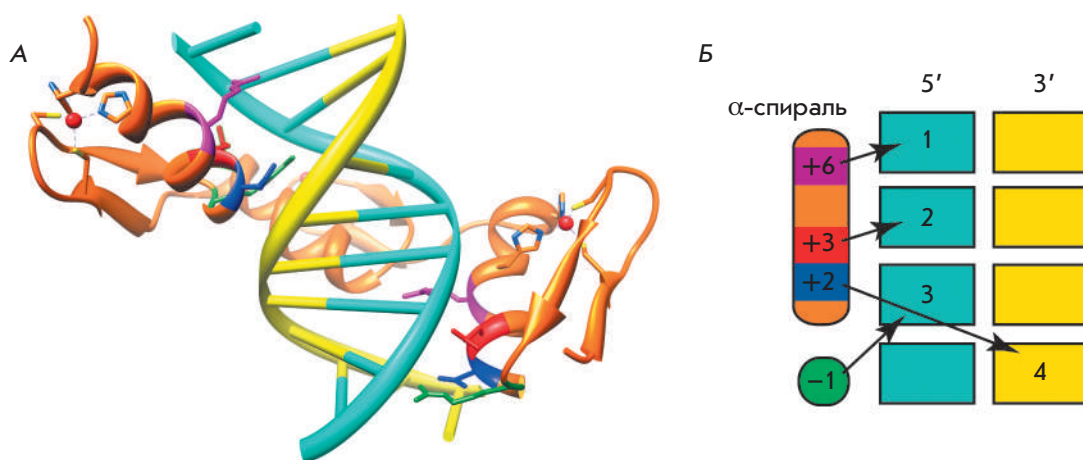


Рис. 1. Модель специфического связывания C2H2-доменов с ДНК. А – кристаллическая структура комплекса трех цинковых пальцев белка Zif268 и ДНК [20]. Цветом обозначены аминокислотные остатки, участвующие в специфическом узнавании ДНК (–1 – зеленый, +2 – синий, +3 – красный, +6 – фиолетовый). Б – модель узнавания нуклеотидов сайта связывания аминокислотами α-спирали. Адаптировано из [24]

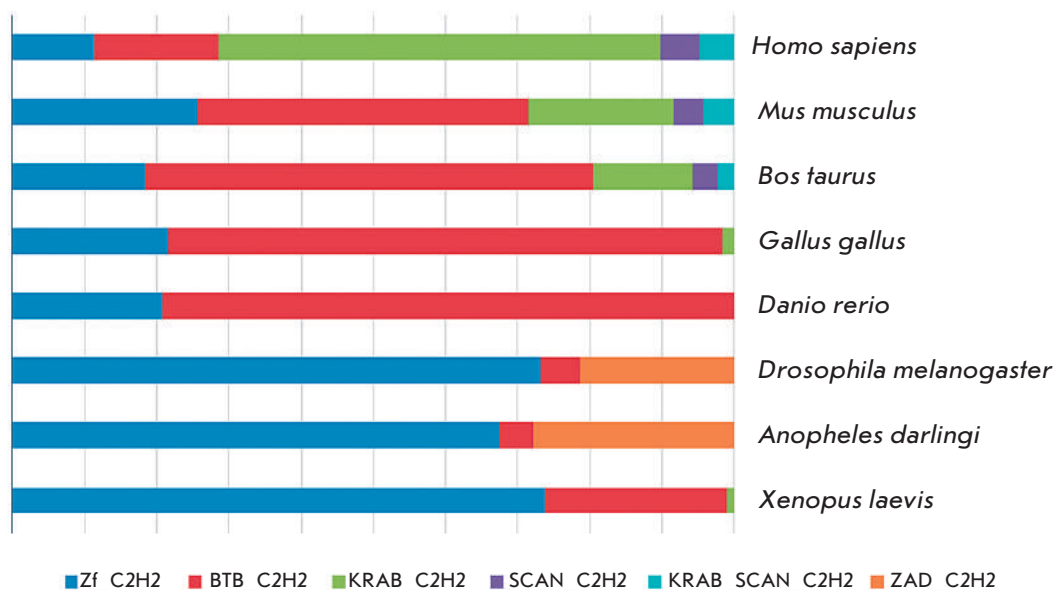


Рис. 2. Соотношение различных вариантов С2Н2-белков у различных видов высших эукариот: человек (*Homo sapiens*), мышь (*Mus musculus*), дикий бык (*Bos taurus*), курица (*Gallus gallus*), данио (*Danio rerio*), дрозофила (*Drosophila melanogaster*), малярийный комар (*Anopheles darlingi*), гладкая шпорцевая лягушка (*Xenopus laevis*). Данные получены из базы Uniprot

бинаций аминокислот, что описано в других обзорах [25, 26]. Обычно С2Н2-кластеры находятся в центре или на С-конце белка. Большая часть белков, содержащих С2Н2-кластер в центральном положении, не имеют других консервативных доменов. В то же время белки с кластером на С-конце часто содержат дополнительные N-концевые домены (рис. 2). У позвоночных можно выделить KRAB- и SCAN-домены, а у насекомых – ZAD-домен [27, 28]. Небольшая группа С2Н2-белков имеет на N-конце консервативный BTB/POZ-домен. Этот домен часто встречается в составе разных классов белков, поэтому мы исключили описание этой группы С2Н2-белков из настоящего обзора. Обобщенную информацию по BTB-содержащим белкам можно найти в подробных обзорах [29, 30].

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ТОЛЬКО КЛАСТЕР С2Н2-ДОМЕНОВ

Группа ТФ, которые содержат только кластер С2Н2-доменов, включает наиболее изученный и консервативный белок СТСФ (СССТС-связывающий фактор) [31], впервые описанный как негативный регулятор экспрессии гена *myc* [32]. Позже сайт связывания СТСФ был найден в составе инсулятора, находящегося на границе β-глобинового локуса курицы [33]. Сайты связывания СТСФ часто расположены на границах хромосомных районов с разным эпигенетическим статусом и транскрипционной активностью, а также на границах топологически ассоциированных доменов (ТАД), пространственно разделяющих хромосомы на районы,

внутри которых происходит взаимодействие регуляторных элементов [34–37].

Белок СТСФ – один из немногих консервативных белков, содержащих кластер С2Н2-доменов. Гомолог СТСФ у дрозофилы (dСТСФ) также часто находится на границах ТАД и в составе инсуляторов [38, 39]. В модельных трансгенных системах dСТСФ поддерживает дистанционные взаимодействия между промотором репортерного гена и активатором GAL4 [40, 41]. На N-конце белка dСТСФ обнаружен домен, способный к гомодимеризации (рис. 3А), который, вероятно, нужен для поддержания дистанционных взаимодействий между удаленными друг от друга сайтами связывания белка dСТСФ [42]. Попытки найти аналогичный димеризующийся домен в белках СТСФ позвоночных пока не привели к результату. В *in vitro* экспериментах показано, что С-концевой домен СТСФ связывается с кластером С2Н2-доменов [43]. Однако специфичность такого взаимодействия не доказана.

Согласно общепринятой модели, когезиновый комплекс, необходимый для спаривания гомологичных хромосом в процессе клеточного деления [44], связывается с белком СТСФ и участвует в поддержании специфичных дистанционных взаимодействий между его сайтами в интерфазных хромосомах (рис. 3Б). В С-концевом домене СТСФ человека картирован участок, который взаимодействует с одним из белков когезинового комплекса [44].

Связывание СТСФ с ДНК, консервативное даже между насекомыми и млекопитающими, подробно изучено у многих высших эукариот [15, 45]. С2Н2-домены 4–7 белка СТСФ (рис. 3А) участвуют в свя-

зывании с основным консенсусным сайтом [46, 47]. Примерно 20% сайтов содержат второй мотив из 10 п.н., для связывания с которым нужны С2Н2-домены 9–11 [47, 48]. Предполагается, что второй мотив, расположенный на расстоянии 5–6 п.н., увеличивает стабильность связывания СТСФ с ДНК.

Транскрипционный фактор СТСФ вовлечен во многие процессы, такие, как эмбриональное развитие, инактивация X-хромосомы у самок, регуляция рекомбинации между генными кластерами при сборке зрелых генов иммуноглобулинов, регуляция альтернативного сплайсинга [34–37, 49–51]. Показано, что СТСФ взаимодействует с большим количеством белков (рис. 3А), таких, как Smad [52], факторы основного комплекса транскрипции TFII-I [53] и TAF-3 [54], хеликаза р68, содержащая домен с DEAD-боксом [55], нуклеофосмин, Kaiso [56], ТФ YB-1, YY1 и Oct4 [57–59], хеликаза CHD8 [60], Su(z)12 – компонент Polycomb-комплекса 2 (PRC2) [61], компонент Sin3A деацетилазного комплекса [62], CENP-E [48] и многие другие белки [49]. В большинстве случаев в белок-белковых взаимодействиях участвуют отдельные С2Н2-домены белка СТСФ [49]. Вероятно, участие СТСФ в различных процессах (активация и репрессия транскрипции, организация дистанционных взаимодействий, формирование ТАД) во многом определяется формированием альтернативных комплексов с белками-партнерами.

Получены экспериментальные данные, показывающие, что с СТСФ связывается большое количество РНК, модулирующих его активность. РНК-связывающий домен СТСФ представляет собой комбинацию участка С-концевого домена и двух С2Н2-доменов (10 и 11), которые *in vitro* неспецифично узнают РНК [63, 64]. Предполагается, что взаимодействие с некоторыми РНК может увеличивать способность СТСФ формировать мультимерные комплексы [63] или снижать стабильность взаимодействия СТСФ с ДНК [11]. Активность СТСФ также регулируется различными посттрансляционными модификациями: поли(ADP)-рибозилированием [65], фосфорилированием [66] и сумоилированием [67].

Белок СТСФ достаточно хорошо изучен и служит примером ТФ, включающего кластер С2Н2-доменов и неструктурированные N- и С-концевые участки. Большая часть других С2Н2-белков имеет аналогичную структуру, но при этом их функции и свойства пока не исследованы. Можно предположить, что некоторые С2Н2-белки могут выполнять функции, сходные с СТСФ. Интересно, что у дрозофилы мутанты по гену *ctcf* доживают до взрослой стадии, что предполагает присутствие в геномах насекомых других транскрипционных факторов, замещающих функции СТСФ [42].

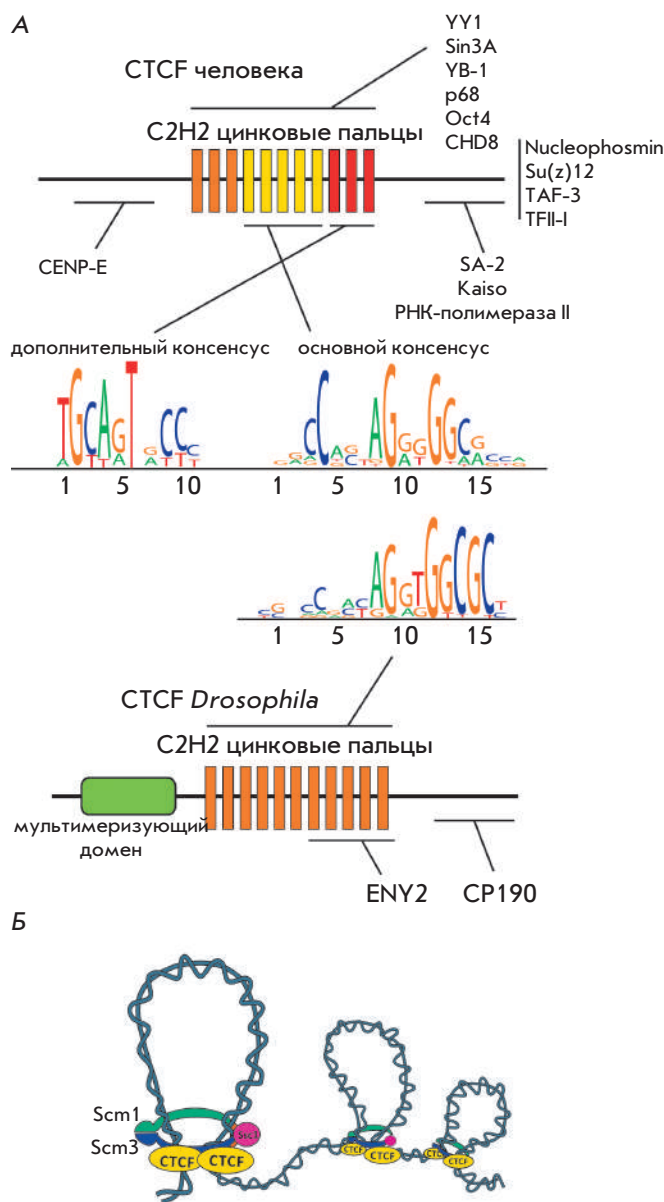


Рис. 3. Сравнение структуры и свойств белков СТСФ человека и дрозофилы. А – доменная структура белков СТСФ человека и *D. melanogaster*. Отмечены домены, участвующие в белок-белковых взаимодействиях и узнавании ДНК. Белки СТСФ дрозофилы [135] и человека [46] имеют похожие консенсусные сайты связывания. Б – механизм дистанционных взаимодействий при участии когезинового комплекса и белка СТСФ

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ С КЛАСТЕРОМ С2Н2-ДОМЕНОВ И N-КОНЦЕВЫМ КРАВ-ДОМЕНОМ

Около одной трети белков человека с кластером С2Н2-доменов содержат на N-конце КРАВ-домен (Krüppel-associated box) (рис. 4А) [68]. В общей сложности у человека найдено 742 разных С2Н2-белка

с КРАВ-доменом, которые кодируются 423 генами [69]. При этом 384 гена сгруппированы в 25 хромосомных кластеров, и только 39 КРАВ-С2Н2-белков кодируются одиночно расположенными генами. Белки с КРАВ-доменами обнаружены только у четвероногих животных. Кластеризация на хромосомах и распространение в пределах крупных таксонов позволяют предположить, что данное семейство генов произошло в результате дупликаций, которые закрепились в процессе эволюционного отбора [70]. КРАВ-домен состоит приблизительно из 75 а.о. и структурно может быть разделен на два субдомена – А и В, которые, как предсказано, сворачиваются в две амфипатические α -спирали (рис. 4Б). Субдомены КРАВ-А и КРАВ-В всегда кодируются отдельными экзонами. В результате альтернативного сплайсинга образуются мРНК, кодирующие либо только субдомен КРАВ-А, либо одновременно оба субдомена – КРАВ-А и КРАВ-В, разделенные спейсером переменной длины. У человека белки КРАВ могут содержать от 2 до 40 С2Н2-доменов. В отличие от генов других семейств, С2Н2-домены КРАВ-белков чаще всего кодируются одним экзоном [71].

Белки КРАВ-С2Н2 широко представлены в геномах четвероногих и многие из них участвуют в репрессии транскрипции [70]. Универсальный и хорошо изученный механизм репрессии связан с привлечением белка КАР-1 (КРАВ-Associated Protein-1), единственного описанного кофактора всех исследованных КРАВ-белков, репрессирующих транс-

крипцию. КРАВ-А-домен непосредственно взаимодействует с КАР-1, который, в свою очередь, служит платформой для привлечения репрессорных комплексов (рис. 4В). Пять аминокислот (рис. 4Б), консервативных во всех КРАВ-А-доменах млекопитающих (DV в положении 6,7 и MLE в положениях 36–38), нужны для связывания КАР-1 [72, 73]. Функциональная роль КРАВ-В-субдомена остается неизученной. Предполагается, что этот домен увеличивает эффективность привлечения КАР-1-зависимого репрессорного комплекса [74]. На N-конце белка КАР-1 находится домен RBCC (Ring Finger/Box/Coiled-Coil), который обеспечивает связывание КАР-1 с КРАВ-доменом. Центральная часть КАР-1 содержит гидрофобный пентапептид, взаимодействующий с Chromo-Shadow (CS)-доменом белка HP1. На C-конце белка расположены два PHD-домена, которые рекрутируют комплексы, участвующие в деацетилировании (NURD) и метилировании (SETDB1) гистонов [70, 75–77]. Репрессия, инициируемая в районе связывания КРАВ-С2Н2-белков, может распространяться в окружающие участки генома на десятки тысяч нуклеотидов в результате последовательного внесения метки H3K9me3 и связывания с ней репрессора HP1 [78–80]. Пик экспрессии белка КАР-1 приходится на ранние эмбриональные стадии, и репрессия транскрипции, осуществляемая КРАВ-С2Н2-белками, критична для раннего эмбрионального развития. На более поздних стадиях репрессия может поддерживаться в соматических

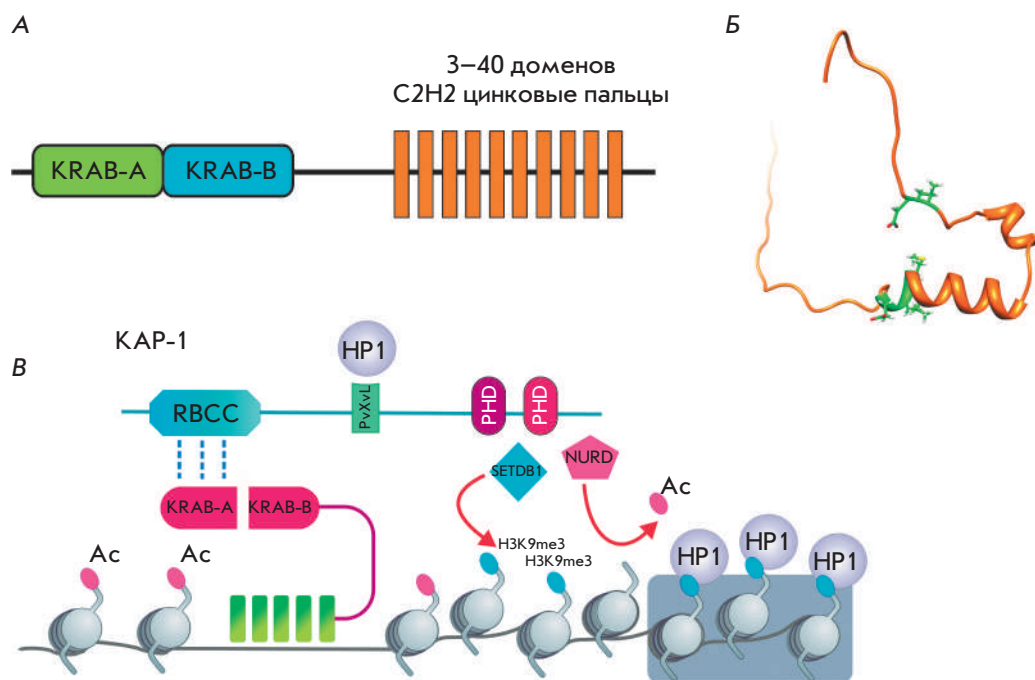


Рис. 4. Структура и свойства КРАВ-домена. А – типичная доменная организация КРАВ-С2Н2-белков. Б – структура КРАВ-А – зеленым отмечены 5 а.о., консервативных во всех КРАВ-А-доменах млекопитающих (DV в положении 6,7 и MLE в положениях 36–38) и необходимых для связывания КАР-1 [PDB 1V65]. В – схема привлечения КАР-1 и репрессорных комплексов

клетках с помощью эпигенетических механизмов без непосредственного участия KRAB-C2H2-белков [81, 82].

Большая часть KRAB-C2H2-белков видов и родоспецифичны. У некоторых позвоночных, птиц, ящериц и лягушек KRAB-A-домен имеет множественные замены аминокислот, необходимых для взаимодействия с KAP-1 [31, 72]. Это можно объяснить либо тем, что KRAB-домен у них выполняет другие функции, либо эти классы позвоночных имеют измененный KAP-1, который сохраняет способность взаимодействовать с KRAB-доменом. В целом, эволюционный анализ консервативности KRAB-C2H2-белков показал, что у позвоночных каждого класса происходило независимое формирование семейства генов KRAB-C2H2, что подтверждает высокую эволюционную скорость появления новых генов этого класса.

Известны только три гена KRAB-C2H2, входящих в один кластер и общих для всех исследованных видов позвоночных. Эти гены кодируют C2H2-белки, содержащие KRAB-домен с измененной структурой, который перестает связывать репрессор KAP-1 и участвует в стимуляции транскрипции [31, 83, 84]. Наиболее интересен высококонсервативный ген *Meisetz* (PRDM9), который имеет не только модифицированный KRAB-домен, но и домен SET [85, 86]. С помощью совместного действия SET-и KRAB-доменов происходит рекрутирование H3K4-метилтрансферазы, отвечающей за триметилирование гистона H3 по лизину 4 (H3K4me3). Модификация H3K4me3 в области промоторов обычно коррелирует с активной транскрипцией. Биоинформатический анализ показал, что часть KRAB-домена, кодируемого геном *Meisetz*, имеет гомологию с KRI-мотивом, присутствующим в геномах всех хорошо изученных эукариот, включая арабидопсис, рис, грибы и дрожжи [31, 86]. Широкое распространение мотива KRI предполагает, что KRAB-домен белка *Meisetz* мог произойти из этого мотива в результате присоединения дополнительных аминокислотных остатков. Приобрести функции репрессора KRAB-домен мог в результате случайных мутаций, которые позволили репрессору связываться с KAP-1, что закрепилось в процессе эволюции.

Экспериментально показано, что у позвоночных TF класса KRAB-C2H2 играют важную роль во многих процессах эмбрионального развития, клеточной дифференцировки и пролиферации, регуляции клеточного цикла и апоптоза [70, 73]. Сайты связывания KRAB-C2H2-белков коррелируют с участками открытого (свободного от нуклеосом) хроматина, что объясняется связыванием с активными регуляторными районами генов [87]. Полногеномные исследова-

ния показывают, что белки KRAB-C2H2 связываются с энхансерами и промоторами генов и могут в некоторых случаях активировать транскрипцию [88–90]. Способность KRAB-C2H2-белков активировать транскрипцию должна коррелировать с супрессией взаимодействия KRAB-домена с белком KAP-1. Механизм такой супрессии пока остается неисследованным, но, вероятно, связан с обратимыми модификациями аминокислотных остатков KRAB-домена. Важную роль могут играть и C2H2-домены, которые потенциально способны рекрутировать отдельные TF и целые комплексы, позитивно/негативно регулирующие транскрипцию.

Интересной функцией обладает уже описанный выше белок *Meisetz* (PRDM9), который экспрессируется только в гонадах млекопитающих [91]. Оказалось, что большая часть горячих точек рекомбинации у млекопитающих содержит вероятный сайт связывания белка PRDM9 [92]. Быстрые эволюционные изменения в первичной структуре C2H2-доменов и их количестве привели к тому, что у разных млекопитающих PRDM9 связывается с разными нуклеотидными последовательностями ДНК [91, 93–96]. Связывание PRDM9 приводит к формированию свободного от нуклеосом района и модификации H3K4me3 окружающих нуклеосом [97]. Предполагается, что комплекс SPO11, индуцирующий двухцепочечные разрывы, одновременно узнает гистоновую метку H3K4me3 и непосредственно связывается с белком PRDM9 [98].

Недавно была открыта новая функциональная роль KRAB-C2H2-белков в репрессии транскрипции чужеродной ДНК, прежде всего эндогенных ретровирусов, мобильных элементов LINE и SINE [79, 87, 99, 100]. Мобильные элементы составляют значительную часть генома млекопитающих, и репрессия их транскрипции жизненно необходима [101]. Разные KRAB-C2H2-белки связываются с регуляторными областями мобильных элементов и ретровирусов определенного типа и индуцируют их эпигенетическую репрессию. Существует гипотеза, согласно которой вновь возникшие белки KRAB-C2H2 закрепляются эволюционным отбором, так как играют критическую роль в подавлении экспрессии новых мобильных элементов, в то время как более консервативные KRAB-C2H2 участвуют в регуляции экспрессии клеточных генов [79].

Другим объяснением быстрой эволюции генов, кодирующих KRAB-C2H2-белки, может быть их ключевая роль в контроле экспрессии генов, определяющих развитие нервной [102] и кровеносной [103] систем у млекопитающих. Например, многие гены, кодирующие KRAB-C2H2-белки, специфичные для человека и приматов, активно транскрибируются

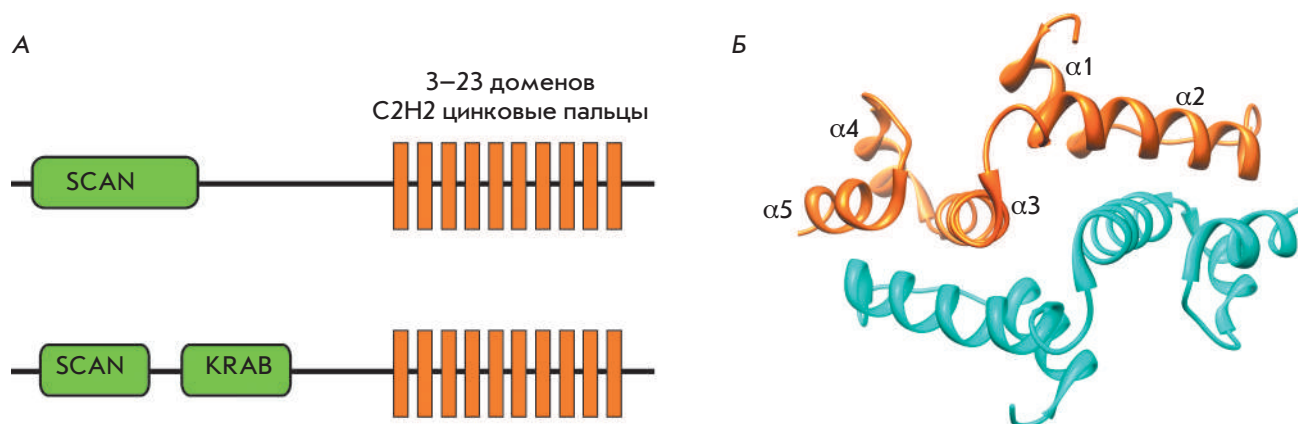


Рис. 5. Структура и свойства SCAN-домена. А – типичная доменная организация SCAN-C2H2- и SCAN-KRAB-C2H2-белков. Б – кристаллическая структура димера SCAN-домена белка Zfp206 [110]

в мозге [102]. Однако не существует прямой корреляции между количеством генов KRAB-C2H2 и усложнением организма. Так, например, опоссум имеет в 2 раза больше генов KRAB-C2H2, чем человек [31]. Можно надеяться, что появление новых технологий получения специфичных антител, полногеномного анализа и мутаций отдельных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 позволит в ближайшем будущем прояснить функциональную роль KRAB-C2H2-белков.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ С КЛАСТЕРОМ C2H2-ДОМЕНОВ И N-КОНЦЕВЫМ SCAN-ДОМЕНОМ

SCAN-домен был впервые описан в составе ТФ ZNF174 человека [114] (рис. 5А). В дальнейшем белки с доменами такого типа обнаружили и у представителей ряда других классов позвоночных [104]. У человека, мыши и коровы найдено 71, 38 и 28 SCAN-C2H2-белков соответственно [94]. Гены, кодирующие SCAN-белки, обычно располагаются в геноме небольшими кластерами (по два–семь) [104]. Находящиеся в кластерах SCAN-домены имеют более высокую степень гомологии между собой, что предполагает их появление в результате дубликации генов и последующей адаптивной эволюции. Примерно половина генов кодирует одновременно SCAN- и KRAB-домены и обычно находится в больших кластерах вместе с генами, кодирующими только KRAB-C2H2-белки (рис. 5А) [27, 94].

Структура SCAN-домена имеет высокую степень сходства с С-концевыми доменами белка капсида вируса иммунодефицита человека [105] и белка Gag ретротранспозонов семейства *gypsy/Ty3* [27]. На основе этих данных предположили, что исходно SCAN-домены возникли из капсидных белков ретровирусов

у низших позвоночных, далее в процессе эволюции этот домен приобрел новую функцию в составе ТФ, содержащих кластеры C2H2-доменов [106]. KRAB-домен в комбинации со SCAN-доменом присутствует у млекопитающих и ящериц, но его нет у курицы и лягушки.

На сегодняшний день описаны пространственные структуры SCAN-доменов белков Zfp206 [107], PEG3 [108], ZNF24, ZNF174 [105] и MZF-1 [109], которые имеют высокую степень сходства (рис. 5Б). Особенности пространственной структуры можно рассмотреть на примере SCAN-домена белка Zfp206 [107], который формирует антипараллельный гомодимер. Каждый мономер в составе гомодимера состоит из пяти α -спиралей. Ядро внутренней поверхности гомодимера образуется упаковкой второй α -спирали одного мономера вокруг третьей и пятой α -спиралей противоположного мономера и наоборот. N-Концевая первая α -спираль обеспечивает дополнительные контакты одного мономера с третьей α -спиралью противоположного мономера (рис. 5Б). Все SCAN-домены могут гомодимеризоваться, но только некоторые SCAN-домены способны образовывать гетеродимеры [104, 111–113]. Первая α -спираль SCAN-домена отличается наибольшей вариабельностью последовательности гидрофобных аминокислотных остатков и рассматривается как возможный кандидат, детерминирующий образование гетеродимеров между различными SCAN-доменами. Так, показана способность SCAN-домена белка Zfp206 к гетеродимеризации с аналогичным доменом Zfp110 [107]. Замена первой α -спирали на α -спираль гетерологичного SCAN-домена ZNF174 или ее удаление приводят к потере способности этих SCAN-доменов к гетеродимеризации.

Известно, что KRAB-A-домен рекрутирует репрессорный комплекс, тогда как данные о влиянии SCAN-домена на транскрипцию отсутствуют [104, 111]. Существуют только отрывочные сведения о функциональной роли ТФ SCAN-C2H2. Например, ТФ ZNF263 человека, содержащий SCAN- и KRAB-домены и 9 C2H2-доменов, преимущественно связывается с промоторными областями и способен участвовать как в активации, так и в репрессии транскрипции [89]. Другой представитель семейства – белок ZNF658, также содержит SCAN- и KRAB-домены и участвует в активации экспрессии генов рРНК, которые транскрибируются РНК-полимеразой I [115]. Можно предположить, что основная функция SCAN-белков связана со способностью к формированию гомо- и гетеродимеров между SCAN-доменами.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ С КЛАСТЕРОМ C2H2-ДОМЕНОВ И N-КОНЦЕВЫМ ZAD-ДОМЕНОМ

ZAD (zinc-finger-associated domain)-домен (рис. 6А) обнаружен на N-конце C2H2-белков многих членистоногих [28]. У позвоночных найден только один белок, содержащий на N-конце структуру, имеющую сходство с ZAD-доменом [116]. В геномах *Anopheles gambiae*, *Drosophila melanogaster* и *Apis mellifera* (медоносная пчела) найдено 147, 98 и 29 ZAD-C2H2-белков соответственно [116], тогда как у ракообразных (*Daphnia pulex*) обнаружено только четыре гена, кодирующих ZAD-подобные домены. Обычно гены, кодирующие ZAD-домены с более высокой гомологией, образуют небольшие кластеры. Предполагается, что эти гены возникли в результате множественных дубликаций исходных копий с последующим их закреплением в результате положительного отбора [28, 116]. Вероятно, эволюционный процесс шел очень бы-

стро, так как только у нескольких белков ZAD-C2H2 найдены очевидные гомологи у удаленных друг от друга видов дрозофилы [116].

Размер ZAD-домена варьирует в пределах 71–97 а.о. Множественное выравнивание последовательностей 32 членов семейства показало, что этот домен состоит из четырех консервативных блоков, соединенных варьирующими по длине районами [28]. Отличительной особенностью ZAD-доменов является присутствие двух инвариантных пар цистеинов, участвующих в координации иона цинка.

К настоящему моменту получена кристаллическая структура только одного ZAD-домена белка Grauzone (Grau) [117], которая может быть прототипом для всех ZAD-структур (рис. 6Б). N-Концевая часть ZAD-домена представляет собой глобулярную структуру вокруг иона цинка, а C-концевой стебель сформирован длинной α -спиралью 2 ($\alpha 2$), которая составляет почти одну треть от всех аминокислот в ZAD-домене. Сворачивание ZAD-домена в значительной степени зависит от координации ионом цинка двух пар цистеинов, разделенных приблизительно 50 а.о., что приводит к стягиванию участков $\beta 2$ - $\alpha 2$ и N-конца к центру домена.

В кристалле две молекулы ZAD-домена ассоциированы в виде антипараллельного димера. Большая часть аминокислотных остатков, консервативных в ZAD-семействе [28], отвечает за контакты между двумя субъединицами. ZAD-домен Grau имеет отрицательно заряженную поверхность, что указывает на его неспособность связывать ДНК [117]. Предполагается, что основной функцией ZAD-домена является образование гомодимеров C2H2-белков [118]. ZAD-домены также участвуют в регуляции ядерной локализации некоторых ZAD-C2H2-белков [119].

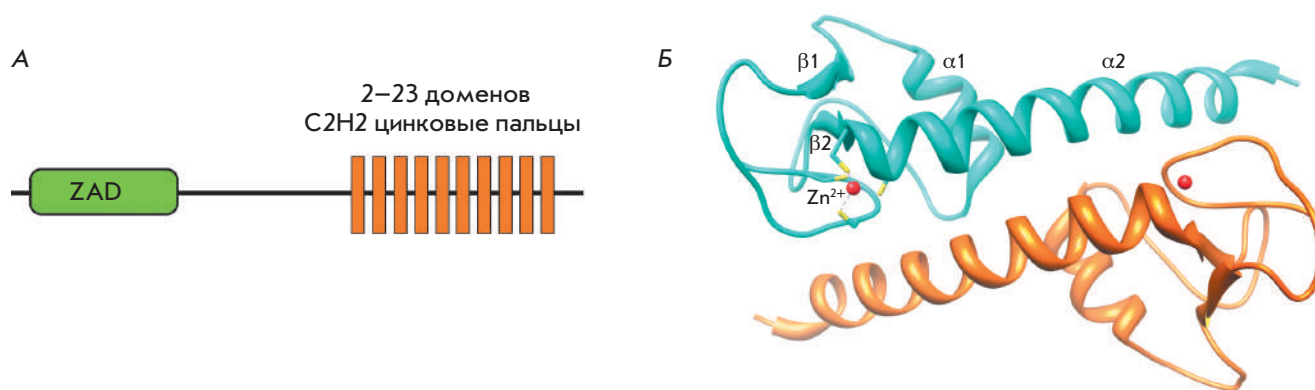


Рис. 6. Структура и свойства ZAD-домена. А – типичная доменная организация ZAD-C2H2-белков. Б – кристаллическая структура димера ZAD-домена белка Grau [117]

Белки с ZAD-доменами составляют примерно одну треть от общего числа белков с C2H2-кластерами и одну десятую часть от всех ТФ в геноме *D. melanogaster* [28]. К настоящему моменту изучены функции только небольшой части ТФ ZAD-C2H2. Большинство ZAD-C2H2-белков экспрессируются в процессе оогенеза и в раннем эмбриогенезе [116]. На важную функциональную роль ZAD-C2H2-белков в процессе развития дрозофилы указывают результаты ряда исследований.

Белок, связывающий мотив 1 (Motif 1 Binding Protein, M1BP), экспрессируется на высоком уровне во всех тканях и на всех стадиях развития дрозофилы и является ключевым в организации архитектуры более 2000 промоторов дрозофилы, имеющих характерный мотив (T/C)GG(T/C)CACACTG [120].

В трансгенных линиях дрозофилы три ZAD-C2H2-белка – Pita, ZIPIC и Zw5 – проявляют свойства инсуляторных/архитектурных белков: блокируют взаимодействие между энхансером и промотором и поддерживают дистанционные взаимодействия [118, 121–124]. ZAD-домены этих белков формируют только стабильные гомодимеры [118]. Интересно, что фрагменты ДНК, содержащие сайты связывания разных ZAD-C2H2-белков не поддерживают дистанционные взаимодействия, что предполагает ключевую роль димеризации ZAD-доменов в организации специфичных контактов между удаленными участками хроматина. Действительно, ZAD-домен белка ZIPIC нужен для поддержания дистанционных взаимодействий между активатором GAL4 и промотором репортерного гена в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [118]. Как и в случае M1BP, сайты связывания белков ZIPIC, Pita и Zw5 преимущественно находятся в непосредственной близости от стартов транскрипции [118, 125], что предполагает архитектурную функцию этих белков в организации промоторов. Нуль-мутации в генах, кодирующих белки Pita и Zw5, приводят к поздней эмбриональной – ранней личиночной летальности, что указывает на важную роль этих белков в процессе эмбрионального развития [121, 126].

Белок Grau экспрессируется на всех стадиях развития дрозофилы, он обнаруживается в ядрах питающих и фолликулярных клеток, окружающих ооцит [127, 128]. Мутации гена этого белка приводят к остановке оогенеза на стадии II мейоза, что связано с ролью Grau в активации промотора гена *cortex*, регулирующего мейоз в ооцитах [127, 128]. Белок Serendipity delta (Sry δ) связывается с промотором ключевого гена раннего эмбриогенеза *bicoid* и стимулирует его транскрипцию [129]. Нуль-мутации в гене *sry* δ проявляются как эмбриональные летали, что указывает на значимость Sry δ в раннем развитии дрозофилы [130].

Белок Trade Embargo (Trem) экспрессируется преимущественно в половых клетках дрозофилы и, вероятно, выполняет сходную функцию с белком PRDM9 у млекопитающих [95, 97, 131]. Белок Trem определяет места посадки белка Mei-P22, который участвует в индукции разрывов на мейотических хромосомах [131]. Белок Mei-P22 вместе со своим партнером, Mei-W68, участвует в образовании двухцепочечных разрывов, инициирующих кроссинговер в процессе мейоза [132–134]. Согласно модели, Trem совместно с партнерами создает области открытого хроматина, которые привлекают с помощью специфичных белок-белковых взаимодействий комплекс Mei-P22/Mei-W68, индуцирующий двухцепочечные разрывы [131].

В целом, имеющиеся данные показывают, что группа ТФ ZAD-C2H2 играет важную роль в организации структуры и функциональной активности промоторов, рекрутировании белковых комплексов и формировании архитектуры хромосом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время нерешенными остаются многие вопросы, связанные с регуляцией транскрипции генов, организацией структуры регуляторных элементов и механизмами дистанционных взаимодействий. Также совершенно очевидно, что CTCF позвоночных не может быть единственным и ключевым ДНК-связывающим белком, определяющим архитектуру хромосом позвоночных [7].

Отличие от хорошо изученных ТФ других классов, белки C2H2 специфично связываются с длинными участками ДНК, достигающими нескольких десятков пар нуклеотидов. Белки C2H2 могут эффективно связываться с ДНК в виде мономеров, в отличие от большинства других ТФ, которые связываются с короткими палиндромными последовательностями как гомо- или гетеродимеры. Часть C2H2-доменов в комбинации с неструктурированными участками C2H2-белков может обеспечивать многообразные взаимодействия с белковыми комплексами, отдельными ТФ и РНК. Таким образом, C2H2-белки можно рассматривать в качестве перспективных кандидатов на роль организаторов архитектуры регуляторных элементов, таких, как промоторы, энхансеры, инсуляторы и сайленсеры. К сожалению, отсутствие достаточного количества экспериментальных данных не позволяет подтвердить правильность этого предположения для позвоночных. С другой стороны, всесторонне изученный белок CTCF позвоночных обладает рядом свойств (специфичное связывание с сайтом на ДНК, формирование открытых участков хроматина, рекрутирование белковых комплексов, организация дис-

танционных взаимодействий), которые могут быть экстраполированы на другие С2Н2-белки.

Наконец, многие С2Н2-белки имеют гомодимеризующиеся домены. Интересно, что у членистоногих и позвоночных произошло распространение разных доменов – ZAD и SCAN соответственно. Основное объединяющее свойство ZAD- и SCAN-доменов – их способность к преимущественному формированию гомодимеров. Показано, что гомодимеризующиеся ZAD-домены трех ZAD-С2Н2-белков (Pita, ZIPIC, Zw5) определяют специфичность дистанционных взаимодействий [118]. Вероятно, аналогичными свойствами обладают и другие ZAD-С2Н2-белки. Пока получены только отдельные данные о роли SCAN-С2Н2-белков в организации активных промоторов позвоночных. Возможно, что, помимо ZAD- и SCAN-доменов, С2Н2-белки имеют и другие домены, способные к мультимеризации, как, например, N-концевой домен белка dCTCF дрозофилы [42].

Таким образом, имеющиеся фрагментарные данные уже сейчас позволяют предложить модель, согласно которой С2Н2-белки играют роль посредников в передаче информации от нуклеотидной последовательности регуляторных элементов (промоторов, энхансеров, сайленсеров) к белковым комплексам, которые определяют свойства регуляторных элементов. Предполагается, что исследование отдельных представителей этого обширного класса ТФ, выяснение функциональной роли ZAD-, SCAN- и КРАВ-доменов, идентификация новых белков-партнеров и димеризующихся доменов позволит оценить реальный вклад С2Н2-белков в формирование архитектуры хромосом и структуры регуляторных элементов. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dixon J.R., Selvaraj S., Yue F., Kim A., Li Y., Shen Y., Hu M., Liu J.S., Ren B. // Nature. 2012. V. 485. P. 376–380.
- Nora E.P., Lajoie B.R., Schulz E.G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., van Berkum N.L., Meisig J., Sedat J., et al. // Nature. 2012. V. 485. P. 381–385.
- Razin S.V., Gavrilov A.A., Vassetzky Y.S., Ulianov S.V. // Transcription. 2016. V. 7. P. 84–90.
- Dekker J., Rippe K., Dekker M., Kleckner N. // Science. 2002. V. 295. P. 1306–1311.
- Rao S.S., Huntley M.H., Durand N.C., Stamenova E.K., Bochkov I.D., Robinson J.T., Sanborn A.L., Machol I., Omer A.D., Lander E.S., et al. // Cell. 2014. V. 159. P. 1665–1680.
- Lupianez D.G., Kraft K., Heinrich V., Krawitz P., Brancati F., Klopocki E., Horn D., Kayserili H., Opitz J.M., Laxova R., et al. // Cell. 2015. V. 161. P. 1012–1025.
- Maksimenko O., Georgiev P. // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 28.
- Bouwman B.A., de Laat W. // Genome Biol. 2015. V. 16. P. 154.
- Dekker J., Mirny L. // Cell. 2016. V. 164. P. 1110–1121.
- Merkenschlager M., Nora E.P. // Ann. Rev. Genom. Human Genet. 2016. V. 17. P. 17–43.
- Ghirlando R., Felsenfeld G. // Genes Dev. 2016. V. 30. P. 881–891.
- Handoko L., Xu H., Li G., Ngan C.Y., Chew E., Schnapp M., Lee C.W., Ye C., Ping J.L., Mulawadi F., et al. // Nat. Genet. 2011. V. 43. P. 630–638.
- Gibcus J.H., Dekker J. // Mol. Cell. 2013. V. 49. P. 773–782.
- Zuin J., Dixon J.R., van der Reijden M.I., Ye Z., Kolovos P., Brouwer R.W., van de Corput M.P., van de Werken H.J., Knoch T.A., van IJcken W.F., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. 996–1001.
- Heger P., Marin B., Bartkuhn M., Schierenberg E., Wiehe T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 17507–17512.
- Разин С.В., Борунова В.В., Максименко О.Г., Кантидзе О.Л. // Биохимия. 2012. Т. 77. С. 277–288.
- Iuchi S. // Cell. Mol. Life Sci. 2001. V. 58. P. 625–635.
- Pearson R.C., Funnell A.P., Crossley M. // IUBMB Life. 2011. V. 63. P. 86–93.
- Swamyathan S.K. // Hum. Genomics. 2010. V. 4. P. 263–270.
- Pavletich N.P., Pabo C.O. // Science. 1991. V. 252. P. 809–817.
- Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 2000. V. 29. P. 183–212.
- Garton M., Najafabadi H.S., Schmitges F.W., Radovani E., Hughes T.R., Kim P.M. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 9147–9157.
- Persikov A.V., Singh M. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. P. 97–108.
- Vandevenne M., Jacques D.A., Artuz C., Nguyen C.D., Kwan A.H., Segal D.J., Matthews J.M., Crossley M., Guss J.M., Mackay J.P. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. P. 10616–10627.
- Brayer K.J., Segal D.J. // Cell Biochem. Biophys. 2008. V. 50. P. 111–131.
- Brayer K.J., Kulshreshtha S., Segal D.J. // Cell Biochem. Biophys. 2008. V. 51. P. 9–19.
- Emerson R.O., Thomas J.H. // J. Virol. 2011. V. 85. P. 12043–12052.
- Chung H.R., Schafer U., Jackle H., Bohm S. // EMBO Repts. 2002. V. 3. P. 1158–1162.
- Perez-Torrado R., Yamada D., Defossez P.A. // Bioessays. 2006. V. 28. P. 1194–1202.
- Stogios P.J., Chen L., Prive G.G. // Protein Sci. 2007. V. 16. P. 336–342.
- Liu H., Chang L.H., Sun Y., Lu X., Stubbs L. // Genome Biol. Evol. 2014. V. 6. P. 510–525.
- Lobanenkova V.V., Nicolas R.H., Adler V.V., Paterson H., Klenova E.M., Polotskaja A.V., Goodwin G.H. // Oncogene. 1990. V. 5. P. 1743–1753.
- Bell A.C., West A.G., Felsenfeld G. // Cell. 1999. V. 98. P. 387–396.
- Chaumeil J., Skok J.A. // Curr. Opin. Immunol. 2012. V. 24. P. 153–159.
- Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // Development. 2012. V. 139. P. 1045–1057.
- Holwerda S., de Laat W. // Front. Genet. 2012. V. 3. P. 217.
- Merkenschlager M., Odom D.T. // Cell. 2013. V. 152. P. 1285–1297.
- Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G. // Cell. 2012. V. 148. P. 458–472.

39. Pirrotta V., Li H.B. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2012. V. 22. P. 101–109.
40. Kyrchanova O., Toshchakov S., Podstreshnaya Y., Parshikov A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 4188–4195.
41. Kyrchanova O., Ivlieva T., Toshchakov S., Parshikov A., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 3042–3052.
42. Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., Ivlieva T., Mogila V., Deshpande G., Wolle D., Schedl P., Georgiev P. // *BMC Biol.* 2015. V. 13. P. 63.
43. Pant V., Kurukuti S., Pugacheva E., Shamsuddin S., Mariano P., Renkawitz R., Klenova E., Lobanenko V., Ohlsson R. // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. P. 3497–3504.
44. Xiao T., Wallace J., Felsenfeld G. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. P. 2174–2183.
45. Vietri Rudan M., Barrington C., Henderson S., Ernst C., Odom D. T., Tanay A., Hadjur S. // *Cell Rep.* 2015. V. 10. P. 1297–1309.
46. Schmidt D., Schwalie P.C., Wilson M.D., Ballester B., Goncalves A., Kutter C., Brown G.D., Marshall A., Flicek P., Odom D.T. // *Cell.* 2012. V. 148. P. 335–348.
47. Nakahashi H., Kwon K.R., Resch W., Vian L., Dose M., Stavreva D., Hakim O., Pruett N., Nelson S., Yamane A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 3. P. 1678–1689.
48. Xiao T., Wongtrakongate P., Trainor C., Felsenfeld G. // *Cell Rep.* 2015. V. 12. P. 1704–1714.
49. Ohlsson R., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Chromosoma.* 2010. V. 119. P. 351–360.
50. Wendt K.S., Yoshida K., Itoh T., Bando M., Koch B., Schirghuber E., Tsutsumi S., Nagae G., Ishihara K., Mishiro T., et al. // *Nature.* 2008. V. 451. P. 796–801.
51. Proudhon C., Hao B., Raviram R., Chaumeil J., Skok J.A. // *Adv. Immunol.* 2015. V. 128. P. 123–182.
52. Bergstrom R., Savary K., Moren A., Guibert S., Heldin C. H., Ohlsson R., Moustakas A. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 19727–19737.
53. Pena-Hernandez R., Marques M., Hilmi K., Zhao T., Saad A., Alaoui-Jamali M.A., del Rincon S.V., Ashworth T., Roy A.L., Emerson B.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. E677–686.
54. Liu Z., Scannell D.R., Eisen M.B., Tjian R. // *Cell.* 2011. V. 146. P. 720–731.
55. Yao H., Brick K., Evrard Y., Xiao T., Camerini-Otero R.D., Felsenfeld G. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. P. 2543–2555.
56. Defosse P.A., Kelly K.F., Filion G.J., Perez-Torrado R., Magdinier F., Menoni H., Nordgaard C.L., Daniel J.M., Gilson E. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 43017–43023.
57. Klenova E., Scott A.C., Roberts J., Shamsuddin S., Lovejoy E.A., Bergmann S., Bubb V.J., Royer H.D., Quinn J.P. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 5966–5973.
58. Donohoe M.E., Zhang L.F., Xu N., Shi Y., Lee J.T. // *Mol. Cell.* 2007. V. 25. P. 43–56.
59. Donohoe M.E., Silva S.S., Pinter S.F., Xu N., Lee J.T. // *Nature.* 2009. V. 460. P. 128–132.
60. Ishihara K., Oshimura M., Nakao M. // *Mol. Cell.* 2006. V. 23. P. 733–742.
61. Li T., Hu J.F., Qiu X., Ling J., Chen H., Wang S., Hou A., Vu T.H., Hoffman A.R. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 6473–6482.
62. Lutz M., Burke L.J., Barreto G., Goeman F., Greb H., Arnold R., Schultheiss H., Brehm A., Kouzarides T., Lobanenko V., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. P. 1707–1713.
63. Saldana-Meyer R., Gonzalez-Buendia E., Guerrero G., Narendra V., Bonasio R., Recillas-Targa F., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2014. V. 28. P. 723–734.
64. Kung J.T., Kesner B., An J.Y., Ahn J.Y., Cifuentes-Rojas C., Colognori D., Jeon Y., Szanto A., del Rosario B.C., Pinter S.F., et al. // *Mol. Cell.* 2015. V. 57. P. 361–375.
65. Guastafierro T., Catizone A., Calabrese R., Zampieri M., Martella O., Bacalini M.G., Reale A., Di Girolamo M., Miccheli M., Farrar D., et al. // *Biochem. J.* 2013. V. 449. P. 623–630.
66. Klenova E.M., Chernukhin I.V., El-Kady A., Lee R.E., Pugacheva E.M., Loukinov D.I., Goodwin G.H., Delgado D., Filippova G.N., Leon J., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 2221–2234.
67. MacPherson M.J., Beatty L.G., Zhou W., Du M., Sadowski P.D. // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. P. 714–725.
68. Bellefroid E.J., Poncelet D.A., Lecocq P.J., Revelant O., Martial J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 3608–3612.
69. Huntley S., Baggott D.M., Hamilton A.T., Tran-Gyamfi M., Yang S., Kim J., Gordon L., Branscomb E., Stubbs L. // *Genome Res.* 2006. V. 16. P. 669–677.
70. Lupo A., Cesaro E., Montano G., Zurlo D., Izzo P., Costanzo P. // *Curr. Genomics.* 2013. V. 14. P. 268–278.
71. Shannon M., Kim J., Ashworth L., Branscomb E., Stubbs L. // *DNA Seq.* 1998. V. 8. P. 303–315.
72. Margolin J.F., Friedman J.R., Meyer W.K., Vissing H., Thiesen H. J., Rauscher F. J., 3rd // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 4509–4513.
73. Urrutia R. // *Genome Biol.* 2003. V. 4. P. 231.
74. Vissing H., Meyer W.K., Aagaard L., Tommerup N., Thiesen H.J. // *FEBS Lett.* 1995. V. 369. P. 153–157.
75. Lechner M.S., Begg G.E., Speicher D.W., Rauscher F.J., 3rd // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 6449–6465.
76. Schultz D.C., Ayyanathan K., Negorev D., Maul G.G., Rauscher F.J., 3rd // *Genes Dev.* 2002. V. 16. P. 919–932.
77. Sripathy S.P., Stevens J., Schultz D.C. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. P. 8623–8638.
78. Groner A.C., Meylan S., Ciuffi A., Zangger N., Ambrosini G., Denervaud N., Bucher P., Trono D. // *PLoS Genet.* 2010. V. 6. P. e1000869.
79. Wolf G., Macfarlan T.S. // *Cell.* 2015. V. 163. P. 30–32.
80. Ying L., Lin J., Qiu F., Cao M., Chen H., Liu Z., Huang Y. // *FEBS J.* 2015. V. 282. P. 174–182.
81. Wiznerowicz M., Jakobsson J., Szulc J., Liao S., Quazzola A., Beermann F., Aebischer P., Trono D. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 34535–34541.
82. Rowe H.M., Friedli M., Offner S., Verp S., Mesnard D., Marquis J., Aktas T., Trono D. // *Development.* 2013. V. 140. P. 519–529.
83. Okumura K., Sakaguchi G., Naito K., Tamura T., Igarashi H. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 5025–5032.
84. Conroy A.T., Sharma M., Holtz A.E., Wu C., Sun Z., Weigel R.J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 9326–9334.
85. Hayashi K., Yoshida K., Matsui Y. // *Nature.* 2005. V. 438. P. 374–378.
86. Birtle Z., Ponting C.P. // *Bioinformatics.* 2006. V. 22. P. 2841–2845.
87. Najafabadi H.S., Albu M., Hughes T.R. // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. P. 2879–2881.
88. Losson R., Nielsen A.L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1799. P. 463–468.
89. Frieze S., Lan X., Jin V.X., Farnham P.J. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 1393–1403.
90. Yang L., Wang H., Kornblau S.M., Graber D.A., Zhang N., Matthews J.A., Wang M., Weber D.M., Thomas S.K., Shah J.J., et al. // *Oncogene.* 2011. V. 30. P. 1329–1340.
91. Parvanov E.D., Petkov P.M., Paigen K. // *Science.* 2010. V. 327. P. 835.

92. Smagulova F, Gregoretto I.V., Brick K., Khil P., Camerini-Otero R.D., Petukhova G.V. // *Nature*. 2011. V. 472. P. 375–378.
93. Oliver P.L., Goodstadt L., Bayes J.J., Birtle Z., Roach K.C., Phadnis N., Beatson S.A., Lunter G., Malik H.S., Ponting C.P. // *PLoS Genet*. 2009. V. 5. P. e1000753.
94. Thomas J.H., Emerson R.O., Shendure J. // *PLoS One*. 2009. V. 4. P. e8505.
95. Baudat F., Buard J., Grey C., Fledel-Alon A., Ober C., Przeworski M., Coop G., de Massy B. // *Science*. 2010. V. 327. P. 836–840.
96. Berg I.L., Neumann R., Lam K.W., Sarbajna S., Odenthal-Hesse L., May C.A., Jeffreys A.J. // *Nat. Genet*. 2010. V. 42. P. 859–863.
97. Baker C.L., Walker M., Kajita S., Petkov P.M., Paigen K. // *Genome Res*. 2014. V. 24. P. 724–732.
98. Brick K., Smagulova F., Khil P., Camerini-Otero R.D., Petukhova G.V. // *Nature*. 2012. V. 485. P. 642–645.
99. Castro-Diaz N., Ecco G., Coluccio A., Kapopoulou A., Yazdanpanah B., Friedli M., Duc J., Jang S.M., Turelli P., Trono D. // *Genes Dev*. 2014. V. 28. P. 1397–1409.
100. Turelli P., Castro-Diaz N., Marzetta F., Kapopoulou A., Raclot C., Duc J., Tieng V., Quenneville S., Trono D. // *Genome Res*. 2014. V. 24. P. 1260–1270.
101. Richardson S.R., Doucet A.J., Kopera H.C., Moldovan J.B., Garcia-Perez J.L., Moran J.V. // *Microbiol Spectr*. 2015. V. 3. P. MDNA3-0061-2014.
102. Nowick K., Gernat T., Almaas E., Stubbs L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 22358–22363.
103. Barde I., Rauwel B., Marin-Florez R.M., Corsinotti A., Laurenti E., Verp S., Offner S., Marquis J., Kapopoulou A., Vanicek J., et al. // *Science*. 2013. V. 340. P. 350–353.
104. Sander T.L., Haas A.L., Peterson M.J., Morris J.F. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 12857–12867.
105. Ivanov D., Stone J.R., Maki J.L., Collins T., Wagner G. // *Mol. Cell*. 2005. V. 17. P. 137–143.
106. Sander T.L., Stringer K.F., Maki J.L., Szauter P., Stone J.R., Collins T. // *Gene*. 2003. V. 310. P. 29–38.
107. Liang Y., Huimei Hong F., Ganesan P., Jiang S., Jauch R., Stanton L.W., Kolatkar P.R. // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. P. 8721–8732.
108. Rimsa V., Eadsforth T.C., Hunter W.N. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e69538.
109. Peterson F.C., Hayes P.L., Waltner J.K., Heisner A.K., Jensen D.R., Sander T.L., Volkman B.F. // *J. Mol. Biol*. 2006. V. 363. P. 137–147.
110. Liang Y., Choo S.H., Rossbach M., Baburajendran N., Palasingam P., Kolatkar P.R. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun*. 2012. V. 68. P. 443–447.
111. Williams A.J., Blacklow S.C., Collins T. // *Mol. Cell. Biol*. 1999. V. 19. P. 8526–8535.
112. Schumacher C., Wang H., Honer C., Ding W., Koehn J., Lawrence Q., Coulis C. M., Wang L.L., Ballinger D., Bowen B.R., et al. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. P. 17173–17179.
113. Porsch-Ozcurumez M., Langmann T., Heimerl S., Borsukova H., Kaminski W.E., Drobnik W., Honer C., Schumacher C., Schmitz G. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 12427–12433.
114. Stone J.R., Maki J.L., Blacklow S.C., Collins T. // *J. Biol. Chem*. 2002. V. 277. P. 5448–5452.
115. Ogo O.A., Tyson J., Cockell S.J., Howard A., Valentine R.A., Ford D. // *Mol. Cell. Biol*. 2015. V. 35. P. 977–987.
116. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. // *Mol. Biol. Evol*. 2007. V. 24. P. 1934–1943.
117. Jauch R., Bourenkov G.P., Chung H.R., Urlaub H., Reidt U., Jackle H., Wahl M.C. // *Structure*. 2003. V. 11. P. 1393–1402.
118. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O., Bonchuk A., Penin A.A., Lando A.S., Eliseeva I.A., Kulakovskiy I.V., Maksimenko O., Georgiev P. // *Nucl. Acids Res*. 2016. V. 44. P. 7228–7241.
119. Zolotarev N.A., Maksimenko O.G., Georgiev P.G., Bonchuk A.N. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 3. P. 97–102.
120. Li J., Gilmour D.S. // *EMBO J*. 2013. V. 32. P. 1829–1841.
121. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // *Genes Dev*. 1999. V. 13. P. 2098–2107.
122. Blanton J., Gaszner M., Schedl P. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. P. 664–675.
123. Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., et al. // *Genome Res*. 2012. V. 22. P. 2188–2198.
124. Kyrchanova O., Leman D., Parshikov A., Fedotova A., Studitsky V., Maksimenko O., Georgiev P. // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e62690.
125. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa M.K., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., et al. // *Genome Res*. 2015. V. 25. P. 89–99.
126. Laundrie B., Peterson J.S., Baum J.S., Chang J.C., Fileppo D., Thompson S.R., McCall K. // *Genetics*. 2003. V. 165. P. 1881–1888.
127. Chen B., Harms E., Chu T., Henrion G., Strickland S. // *Development*. 2000. V. 127. P. 1243–1251.
128. Chu T., Henrion G., Haegeli V., Strickland S. // *Genesis*. 2001. V. 29. P. 141–152.
129. Payre F., Noselli S., Lefrere V., Vincent A. // *Development*. 1990. V. 110. P. 141–149.
130. Crozatier M., Kongsuwan K., Ferrer P., Merriam J.R., Lengyel J.A., Vincent A. // *Genetics*. 1992. V. 131. P. 905–916.
131. Lake C.M., Nielsen R.J., Hawley R.S. // *PLoS Genet*. 2011. V. 7. P. e1002005.
132. McKim K.S., Hayashi-Hagihara A. // *Genes Dev*. 1998. V. 12. P. 2932–2942.
133. Jang J.K., Sherizen D.E., Bhagat R., Manheim E.A., McKim K.S. // *J. Cell. Sci*. 2003. V. 116 (Pt 15). P. 3069–3077.
134. Liu H., Jang J. K., Kato N., McKim K.S. // *Genetics*. 2002. V. 162. P. 245–258.

УДК 577.152.314, 577.151.02

Моделирование структуры и скрининг ингибиторов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 человека

И. В. Гущина^{1*}, Д. К. Нилов^{2*}, А. Л. Захаренко³, О. И. Лаврик^{3,4}, В. К. Швядас^{1,2*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8⁴Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

*Авторы, внесшие равный вклад в представленную работу.

*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 01.09.2016

Принята к печати 18.11.2016

РЕФЕРАТ Фермент репарации тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) является потенциальной молекулярной мишенью для противоопухолевой терапии. С использованием методов квантовой и молекулярной механики создана модель Tdp1 человека, учитывающая ионизационные состояния аминокислотных остатков активного центра и их взаимодействие с субстратом и конкурентными ингибиторами. В активном центре фермента идентифицированы полости, обеспечивающие связывание олигонуклеотида и фосфотиروزина и представляющие интерес для дизайна ингибиторов. При помощи разработанной молекулярной модели обнаружены новые ингибиторы Tdp1, сульфогруппа которых способна занимать положение 3'-фосфатной группы субстрата с образованием водородных связей с Lys265, Lys495 и другими аминокислотными остатками участка связывания фосфотиروزина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА докинг, ингибитор, молекулярное моделирование, тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Tdp1 – тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; Top1 – топоизомераза I; КМ – квантово-механический; ММ – молекулярно-механический.

ВВЕДЕНИЕ

Для снятия локальных напряжений ДНК-спирали в процессе репликации и транскрипции необходимо внесение одноцепочечных разрывов, которые осуществляются топоизомеразой I (Top1) [1, 2]. Однако в результате различных повреждений ДНК (разрывы цепи, повреждения азотистых оснований), а также под действием ингибиторов Top1 могут накапливаться ковалентные комплексы Top1-ДНК, в которых каталитический тирозин связан с 3'-концевым фосфатом [3, 4]. Восстановление исходной структуры ДНК и обеспечение репликации происходят в результате гидролиза таких комплексов тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (Tdp1) – важным ферментом репарации ДНК, обнаруженным у человека и других эукариотических организмов [5–8].

Субстратом Tdp1 служит предварительно подвергшийся протеолизу комплекс Top1-ДНК, в котором Top1 представлена коротким пептидным фрагментом [9]. Tdp1 обладает широкой субстратной

специфичностью, поскольку Top1 вносит разрывы на различных участках цепи ДНК (хотя предпочтение отдается 3'-фосфодиэфирной связи тимидина) [10]. Активный центр Tdp1 располагается в центральной части субстратсвязывающей бороздки. Узкий участок бороздки с одной стороны от активного центра положительно заряжен и участвует в связывании цепи ДНК. Более широкий участок бороздки с другой стороны связывает пептидный фрагмент субстрата. В активном центре Tdp1 положение 3'-фосфатной группы субстрата стабилизируется водородными связями с остатками Lys265 и Lys495. Предполагается, что карбоксамидные группы Asn283 и Asn516 также вовлечены в связывание фосфата [11, 12]. Расщепление фосфодиэфирной связи между 3'-фосфатом и остатком тирозина осуществляется с участием боковых цепей His263 и His493 по механизму S_N2 (рис. 1) [13, 14]. В результате нуклеофильной атаки His263 образуется переходное состояние с фосфатом в конформации тригональной бипирами-

ды (в апикальных вершинах располагаются $N^{\epsilon 2}$ -атом His263 и тирозильный кислород). Остаток His493 выступает в роли донора протона для остатка тирозина в составе уходящей группы. Протонирование $N^{\delta 1}$ -атомов His263 и His493 стабилизируется водородными связями с боковыми цепями Glu538 и Gln294 соответственно. При этом непротонированное состояние $N^{\epsilon 2}$ -атома His263 может быть обусловлено близким расположением заряженных аминогрупп Lys265 и Lys495, а заряженное состояние His493 – близостью боковой цепи Asp288.

Камптотецин и его производные (иринотекан, топотекан) вызывают образование необратимых ковалентных комплексов Top1-ДНК и используются для повреждения ДНК опухолевых клеток [3]. Подавление репарации таких комплексов с помощью ингибиторов Tdp1 является перспективным путем усиления противоопухолевой активности камптотецинов, что подтверждается чувствительностью *TDP1*-дефицитных клеток к химиотерапии [15–17]. Хотя известно несколько соединений, подавляющих активность фермента, разработка лекарственных средств на основе ингибиторов Tdp1 пока далека от доклинической или клинической стадии. Так, ванадат-ион VO_4^{3-} , образующий координационную связь с His263 и имитирующий переходное состояние реакции, был использован при изучении механизма действия фермента и получении кристаллов комплексов Tdp1 с различными олигонуклеотидами и пептидными фрагментами [10, 13]. Вещества, ингибирующие Tdp1, обнаружены путем *in vitro* скрининга библиотек низкомолекулярных соединений среди стероидных производных [18], инденоизохинолинов [19, 20], миметиков фосфотирозина [21], тиоксотиазолидинонов [22], бензопентатиепинов [23] и диазаадамантанов [24]. Перечисленные соединения предположительно конкурируют за участок связывания субстрата, однако структуры фермент-ингибиторных комплексов неизвестны и не вполне понятна природа специфических взаимодействий этих веществ с остатками активного центра. Исследование взаимодействия некоторых ингибиторов с Tdp1 с использованием молекулярного докинга привело к противоречивым результатам, которые плохо согласуются с экспериментальными данными по ингибирующей активности соединений [25, 26]. Это дает основание предположить, что модели белка, построенные на основе кристаллических структур, нуждаются в уточнении и дополнительной оптимизации. В нескольких работах при оценке состояния ионизации боковых цепей гистидина [22] и лизина [18, 27] в активном центре не учитывали их молекулярное окружение и механизм реакции, что также ставит под вопрос достоверность моделирования. Очевидно,

что для изучения участков связывания потенциальных ингибиторов и адекватного описания взаимодействий необходима качественная модель Tdp1 человека, которая учитывала бы все особенности структурной организации активного центра. Целью настоящей работы было построение молекулярной модели Tdp1 с использованием гибридных методов квантовой и молекулярной механики и ее апробирование для компьютерного скрининга конкурентных ингибиторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание модели белка

Молекулярную модель Tdp1 человека конструировали на основе кристаллической структуры 1nop (цепи A, C, D) [14]. Координаты неразрешенных петель в белке восстанавливали с помощью программы Swiss-PDBViewer 4.1 (осуществляет наложение структур) [28] и веб-сервера ModLoop (предсказывает положение недостающих тяжелых атомов) [29]. Координаты петли 425–434 перенесли из структуры 1qzq после ее наложения на 1nop, а координаты петли 560–567, которая отсутствует во всех структурах Tdp1, были предсказаны по аминокислотной последовательности.

Далее с использованием AmberTools 1.2 (<http://ambermd.org>) и пакета Amber 12 [30, 31], установленного на суперкомпьютере МГУ [32], моделировали фермент-субстратный комплекс Tdp1. Молекулу субстрата конструировали на основе структурного аналога из 1nop (ковалентный комплекс олигонуклеотид-ванадат-пептид), для чего атом ванадия заменили на фосфор. Для молекулярно-механического описания фосфотирозинового участка в молекуле субстрата использовали параметры из базы данных AMBER parameter database [33]. Остальные части субстрата и белок описывали с использованием силового поля *ff99SB* [34]. В структуру фермент-субстратного комплекса добавляли атомы водорода и помещали в ячейку воды (модель растворителя TIP3P, минимальное расстояние от белка до края ячейки – 12 Å). Для нейтрализации положительного суммарного заряда, обусловленного ионогенными группами белка и субстрата, в ячейку добавляли ионы хлора. Минимизацию энергии полученной системы проводили в две стадии. На первой стадии (2500 шагов по методу наискорейшего спуска, затем 2500 шагов по методу сопряженных градиентов) координаты белка и субстрата фиксировали позиционными ограничениями 2 ккал/(моль·Å²) на тяжелых атомах. На второй стадии (5000 шагов наискорейшего спуска, 5000 шагов по методу сопряженных градиентов) систему разделяли на кванто-

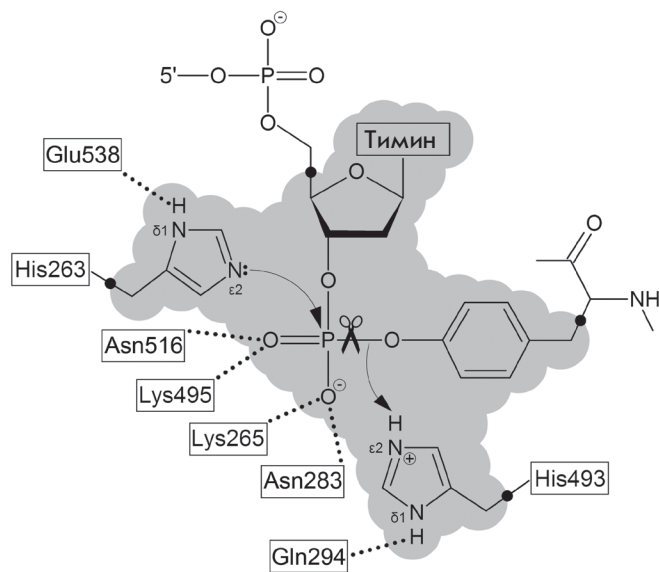


Рис. 1. Строение активного центра Tdp1. Остатки Lys265, Asn283, Lys495 и Asn516 участвуют в связывании фосфатной группы субстрата. В ходе реакции осуществляется нуклеофильная атака остатком His263 и перенос протона с His493 на уходящую группу. Серым цветом показан квантово-механический (КМ) регион, заданный при проведенном нами моделировании фермент-субстратного комплекса

во-механический (КМ) и молекулярно-механический (ММ) регионы. КМ-регион, включающий фрагмент субстрата и боковые цепи His263 и His493 (см. рис. 1), описывали полуэмпирическим гамильтонианом RM1 [35, 36] с использованием линкерных атомов на границе региона. Расчеты проводили с использованием периодических граничных условий и метода PME (Particle Mesh Ewald) для учета дальнедействующих электростатических взаимодействий.

Поиск связывающих карманов в полученной структуре Tdp1 осуществляли с помощью программ focket 2.0 и rocketZebra [37, 38], полости определяли в виде кластеров альфа-сфер (сферы, контактирующие с четырьмя атомами и при этом не содержащие внутренних атомов). Для детектирования полостей небольшого размера минимальное число альфа-сфер в полости уменьшали с 35 до 30, а максимальное расстояние между альфа-сферами на этапе кластеризации уменьшали с 2.5 до 2.4 Å. При поиске полостей не принимали в рассмотрение атомы водорода.

Компьютерный скрининг

Компьютерный скрининг ингибиторов Tdp1 проводили среди низкомолекулярных соеди-

нений из коммерческой библиотеки Vitas-M (<http://www.vitasmlab.com>). Протонирование и оптимизацию структуры соединений проводили согласно ранее описанной методике [39]. С использованием программы ACD/Spectrus DB 14.0 (<http://www.acdlabs.com>) из библиотеки отобрали соединения, содержащие сульфогруппу и удовлетворяющие правилу трех (молекулярная масса < 300, log P ≤ 3, доноры водородной связи ≤ 3, акцепторы водородной связи ≤ 3, вращаемые связи ≤ 3) [40, 41]. Из модели фермент-субстратного комплекса Tdp1 удаляли субстрат и молекулы воды, с помощью программы Lead Finder 1.1.15 [42, 43] строили потенциальную решетку (карту потенциала взаимодействия), охватывающую область активного центра. После этого проводили молекулярный докинг соединений в активный центр Tdp1 с использованием генетического алгоритма в режиме extra precision. Полученные структуры комплексов с ингибиторами оптимизировали по методике, примененной к фермент-субстратному комплексу Tdp1. При этом КМ-регион включал молекулу ингибитора и боковые цепи His263 и His493, молекулярно-механические параметры ингибиторов брали из силового поля GAFF [44]. Найденные позиции визуализировали с помощью программы VMD 1.9.2 [45].

Измерение ферментативной активности

Рекомбинантный белок Tdp1 человека экспрессировали в системе *Escherichia coli* и выделяли согласно [46]. Плазмида pET 16B Tdp1 была предоставлена д-ром К.У. Кальдекотт (Университет Сассекса, Великобритания). Фермент очищали хроматографией на никелевом сорбенте NTA-Ni²⁺-сефароза CL-6B с последующей доочисткой на фосфоцеллюлозе P-11. Ферментативную активность измеряли с использованием сконструированного ранее биосенсора 5'-(5,6 FAM-аас gtc agg gtc ttc c-BHQ1)-3', где FAM – флуорофор, BHQ1 – тушитель флуоресценции [23, 47]. Определение активности Tdp1 по отщеплению 3'-концевого заместителя BHQ1 проводили в следующих условиях: 50 mM Трис-НСl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 7 mM β-меркаптоэтанол, 50 нМ биосенсор, 1.3 нМ Tdp1, 26°C. Скорость реакции при различных концентрациях ингибиторов STK370528 (Sigma-Aldrich) и STK376552 (Vitas-M Laboratory, Ltd.) измеряли на флуориметре POLARstar OPTIMA (BMG LABTECH, Германия). Измерения проводили в двух независимых экспериментах. Значения IC₅₀ (концентрация ингибитора, при которой активность фермента снижается на 50% [48]) определяли с помощью программы MARS Data Analysis 2.0 (BMG LABTECH).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модель белка

При построении молекулярной модели Tdp1 человека для поиска конкурентных ингибиторов необходимо было выбрать подходящую кристаллическую структуру фермента, учесть ионизационные свойства важных для катализа аминокислотных остатков, а также воспроизвести оптимальную для взаимодействия с субстратом конформацию этих остатков. В базе данных Protein Data Bank представлены структуры апоформы Tdp1 (PDB ID 1jy1, 1qzq), а также комплексов с различными аналогами переходного состояния (1mu7, 1mu9, 1nop, 1rff, 1rfi, 1rg1, 1rg2, 1rh0, 1rgt, 1rgu). В качестве исходной структуры для моделирования был выбран комплекс с аналогом, наиболее близким по строению к природному субстрату, 1nop, в котором ванадат ковалентно связан с каталитическим остатком His263. В результате замены атома ванадия на фосфор получили стартовую структуру субстрата, представляющего олигонуклеотид 5'-GTT-3', присоединенный к пептиду KLNLYL через боковую цепь тирозина.

Важным этапом моделирования было восстановление неразрешенных петель 425–434 и 560–567, поскольку для дальнейшей оптимизации структуры необходима белковая цепь без разрывов. К структуре Tdp1 с достроенными петлями добавили атомы водорода, при этом в боковой цепи His263 водород был присоединен к N⁰¹-атому, а боковые цепи His493, Lys265 и Lys495 были заряжены. Координаты субстрата и добавленных атомов водорода оптимизировали с помощью двухстадийной минимизации энергии. На первой стадии провели молекулярно-механическую минимизацию с целью удаления наибольших напряжений в системе. На второй стадии для более точного описания взаимодействия субстрата с каталитическими остатками His263 и His493 использовали полуэмпирический гамильтониан RM1, эффективность которого была показана при симуляции биологических молекул [49, 50]. В табл. 1 приведены наиболее важные межатомные расстояния в активном центре стартовой и оптимизированной модели Tdp1. Исходное положение атомов фосфата в стартовой модели соответствует координатам ванадата в его комплексе с ферментом, являющемся аналогом переходного состояния. В результате оптимизации структуры фосфат приобретает тетраэдрическую конфигурацию, а расстояние между фосфором и His263 увеличивается с 2.0 до 2.7 Å, что означает переход активного центра в основное состояние. Водородные связи фосфатной группы с другими остатками не претерпевают существенных изменений. Это свидетельствует о том, что как в ос-

Таблица 1. Взаимодействия 3'-концевой фосфатной группы субстрата с остатками активного центра в стартовой и оптимизированной модели Tdp1 человека

Взаимодействие	Расстояние, Å	
	Стартовая модель	Оптимизированная модель
PO ₄ :P ... His263:NE2	2.0	2.7
PO ₄ :O _{bridging} ... His493:NE2	2.6	2.6
PO ₄ :O ... Lys265:NZ	2.8	2.7
PO ₄ :O ... Lys495:NZ	2.8	2.7
PO ₄ :O ... Asn283:ND2	3.0	2.8
PO ₄ :O ... Asn516:ND2	3.2	3.0

новном, так и в переходном состоянии в связывании субстрата участвуют боковые цепи Asn283 и Asn516, которые вместе с заряженными аминокислотными группами Lys265 и Lys495 образуют сеть водородных связей с 3'-фосфатной группой. После удаления субстрата из оптимизированной структуры получили модель Tdp1 для докинга низкомолекулярных соединений, в которой ориентация остатков активного центра способна обеспечить множественные взаимодействия с конкурентными ингибиторами.

Анализ поверхности субстратсвязывающей бороздки в модели Tdp1 позволил определить важные участки взаимодействия с потенциальными ингибиторами. Можно выделить две полости, обеспечивающие связывание олигонуклеотида и фосфотирозина, на границе которых располагаются боковые цепи His263 и Asn516 (рис. 2). Полость связывания олигонуклеотида представляет собой обширный участок, площадь поверхности которого составляет 666 Å². Среди аминокислотных остатков на этом участке можно отметить пары Ser400–Ser518 и Ser403–Ala520, которые участвуют в связывании второй и третьей фосфатной группы с 3'-конца. Полость связывания фосфотирозина существенно меньше по размеру (206 Å²), но при этом в ее формировании принимают участие все ключевые остатки активного центра – His263, His493, Lys265, Lys495, Asn283, Asn516, а также остатки Tyr204, Pro461 и Trp590, образующие гидрофобные контакты.

Большинство известных ингибиторов Tdp1 лишены отрицательно заряженных элементов структуры. Поэтому вполне возможно, что полость фосфотирозина, приспособленная для размещения 3'-концевого фосфата, не вовлечена в связывание этих соединений. Данное предположение подтверждается при моделировании связывания методом молекулярного

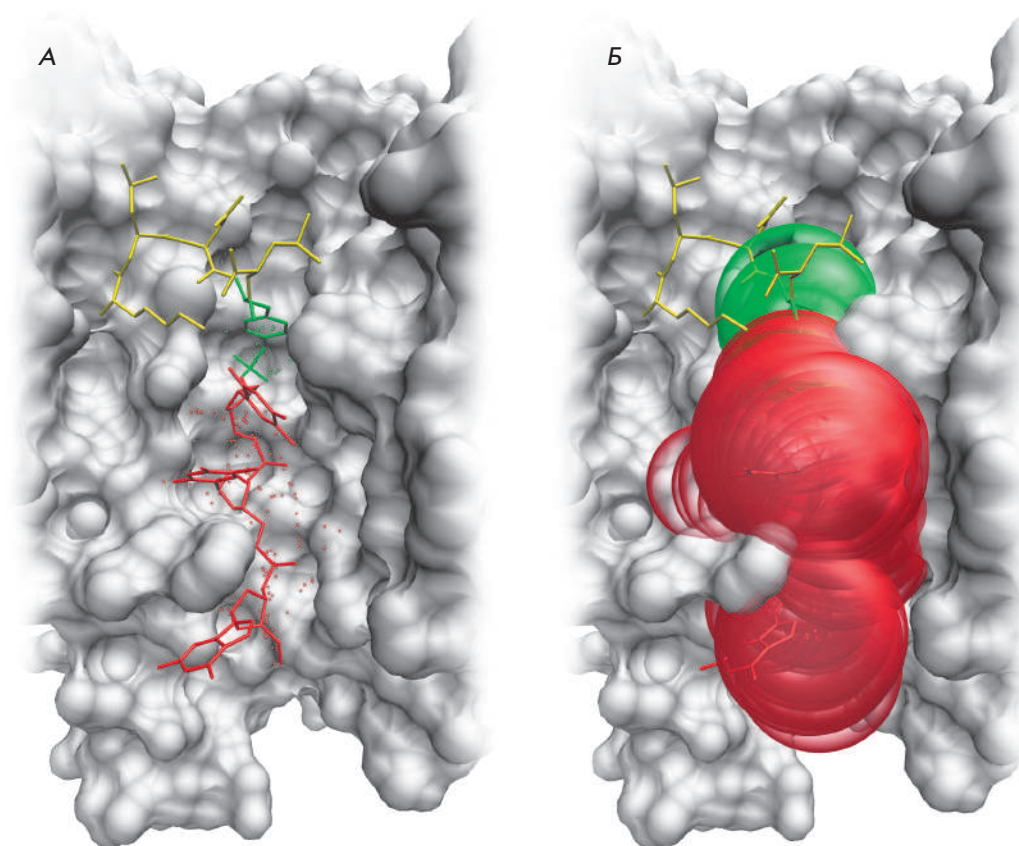


Рис. 2. Субстратсвязывающая бороздка в модели Tdp1 человека. А — взаимодействие молекулы субстрата с участками связывания олигонуклеотида и фосфотиروزина. Олигонуклеотид показан красным цветом, фосфотиروزин — зеленым, остальная часть пептида — желтым. Полости помечены точками, которые соответствуют центрам альфа-сфер. Б — расположение альфа-сфер в участках связывания олигонуклеотида и фосфотиروزина

докинга. Так, производные диазаадамантина, об ингибиторных свойствах которых сообщено недавно [24], располагаются на участке олигонуклеотида в активном центре модели Tdp1. Трициклический фрагмент занимает место третьего остатка рибозы с 3'-конца, а протяженный гидрофобный заместитель ориентирован в сторону участка связывания фосфотиروزина, однако с ним не взаимодействует (рис. 3А).

Скрининг ингибиторов

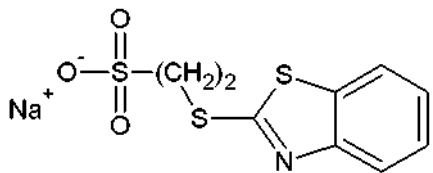
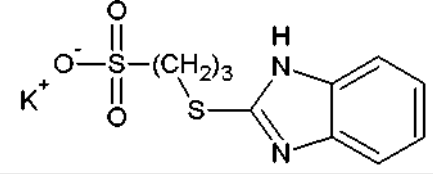
Наличие кластера консервативных остатков Lys265, Lys495, Asn283, Asn516, формирующих участок связывания фосфотиروزина, приводит к эффективному электростатическому взаимодействию фермента с субстратом и может быть важным структурным фактором, способным обеспечить связывание конкурентных ингибиторов, содержащих соответствующие заряженные функциональные группы. Такой функциональной группой могла бы быть сульфогруппа SO_3^- , являющаяся структурным аналогом фосфатной группы. Для проверки данного предположения из библиотеки низкомолекулярных соединений были отобраны сульфоновые кислоты и их соли (71 соединение), удовлетворяющие правилу трех, которое определяет диапазон физико-хими-

ческих параметров для молекулярных фрагментов (небольших молекул, используемых для первичного скрининга и последующей оптимизации структуры). Соединения докировали в активный центр модели Tdp1 и проверяли их способность к образованию водородных связей с Lys265, Lys495, Asn283, Asn516, а также других взаимодействий с участками связывания ДНК и пептида.

В результате проведенного скрининга были выбраны наиболее перспективные ингибиторы STK370528 и STK376552, в которых сульфогруппа соединена с гетероциклическим фрагментом с помощью тиоэфирного линкера (табл. 2, рис. 3Б). Конформацию аминокислотных остатков, взаимодействующих с STK370528 и STK376552 в полученных фермент-ингибиторных комплексах, затем оптимизировали с использованием гамильтониана RM1. Повторный молекулярный докинг с уточненными моделями белка показал, что STK370528 является более эффективным ингибитором и характеризуется лучшей энергией связывания ΔG^{recalc} (см. данные в табл. 2).

Ингибиторные свойства соединений по отношению к рекомбинантной форме Tdp1 человека изучали с использованием биосенсора, позволяющего определять активность фермента в режиме реального вре-

Таблица 2. Соединения, отобранные в результате компьютерного скрининга ингибиторов Tdp1 человека

Соединение	Химическая структура	ΔG^{calc} , ккал/моль	ΔG^{recalc} , ккал/моль	IC_{50} , мкМ
STK370528		-7.5	-8.7	83 ± 24
STK376552		-8.4	-8.0	686 ± 14

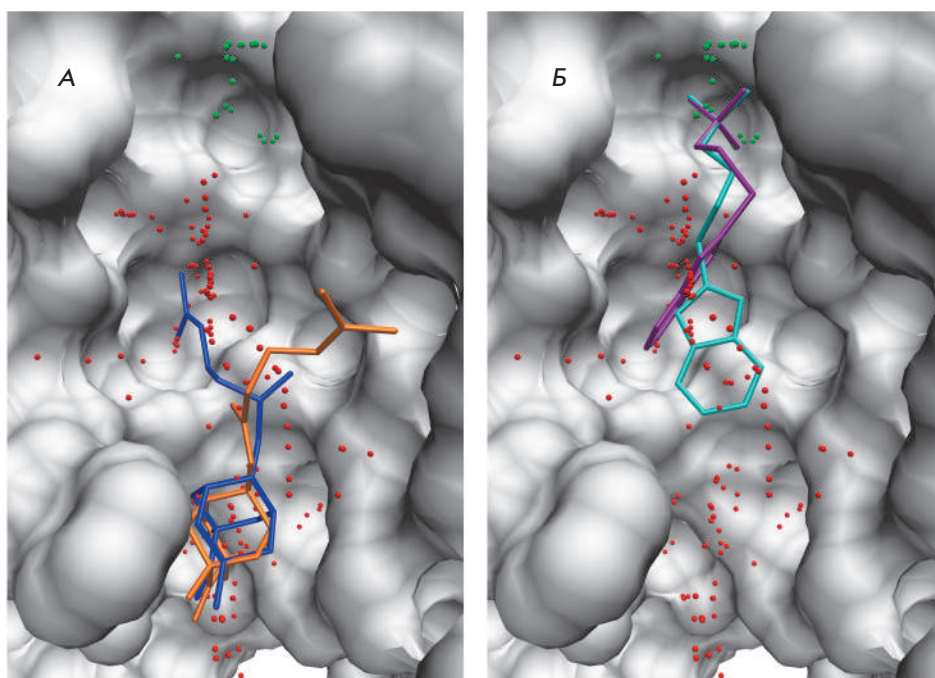


Рис. 3. Взаимодействие ингибиторов с субстрат-связывающей бороздкой в модели Tdp1 человека. А — связывание производных диазаадамантиана. Б — связывание сульфопроизводных STK370528 и STK376552. Полости олигонуклеотида и фосфотиросина помечены альфа-сферами красного и зеленого цвета соответственно

мени – олигонуклеотида с флуорофором на 5'-конце и тушителем флуоресценции на 3'-конце. Метод основан на способности Tdp1 удалять с 3'-конца ДНК объемные аддукты различного происхождения [17], в том числе тушитель флуоресценции BHQ1 (Black Hole Quencher 1) [51]. После удаления BHQ1 в результате активности фермента происходит разгорание 5'-концевого флуорофора, и интенсивность флуоресценции зависит от количества расщепленного субстрата. На рис. 4 приведен типичный график зависимости скорости реакции от концентрации STK370528. Значения IC_{50} составили 83 мкМ для STK370528 и 686 мкМ для STK376552. Таким образом экспериментальное исследование подтвердило выводы молекулярно-

го моделирования и показало, что выбранные соединения являются ингибиторами Tdp1, подавляющими каталитическую активность фермента в микромолярном диапазоне концентраций.

Сульфогруппа ингибиторов способна занять положение 3'-фосфатной группы субстрата и образовать водородные связи с аминокислотными остатками Lys265, Lys495, Asn283, Asn516 и His493, формирующими участок связывания фосфотиросина (рис. 5). Расположение гетероциклического фрагмента на участке связывания олигонуклеотида приводит к дополнительным взаимодействиям. В случае STK370528 бензотиазольная группа образует водородную связь с Asn516, а также гидрофоб-

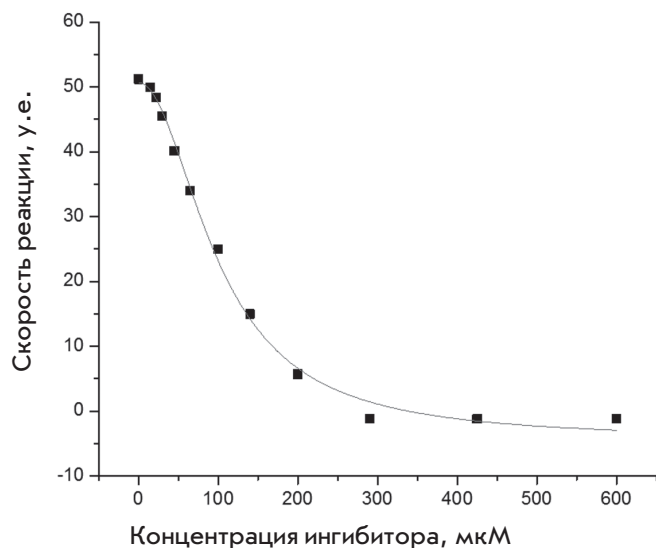


Рис. 4. Изменение скорости реакции, катализируемой Tdp1, при добавлении ингибитора STK370528

ные контакты с боковыми цепями Ala520 и Ala521. Гибкий линкер в структуре ингибиторов обеспечивает соединение групп, расположенных на различных участках активного центра Tdp1. В соединении STK376552 линкер удлиннен на одно метиленовое звено, что приводит к нарушению взаимодействия с Asn516 и Ala521 и снижению ингибирующей способности STK376552 по сравнению с STK370528.

Важную роль в связывании и ориентации ингибиторов в активном центре Tdp1 играют электростатические взаимодействия с заряженными остатками Lys265, Lys495 и His493. В случае незаряженных сульфонов (метилового и фенилового эфиров STK370528) эффективность взаимодействия с остатками активного центра снижается, что подтверждается большим числом возможных ориентаций ингибитора в активном центре фермента при молекулярном моделировании. Моделирование связывания инденоизохинолиновых сульфонов, которые ранее рассматривались в качестве потенциальных ингибиторов, однако не проявили активности в отношении Tdp1 [25], также свидетельствует о том, что этерифицированная сульфогруппа не способна обеспечить взаимодействие с участком связывания фосфотирозина.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование показало, что созданная молекулярная модель фермента репарации Tdp1, учитывающая особенности структурной организации активного центра, адекватно описывает харак-

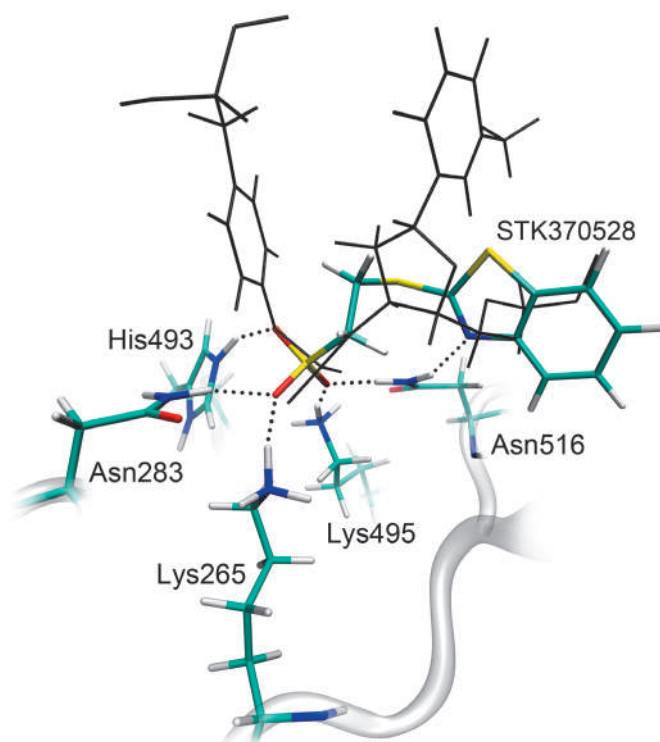


Рис. 5. Расположение ингибитора STK370528 в активном центре молекулярной модели Tdp1 человека. Пунктирными линиями показаны водородные связи, важные для стабилизации положения сульфогруппы. Серым цветом показаны координаты субстрата в модели фермент-субстратного комплекса

тер связывания низкомолекулярных соединений и позволяет отбирать конкурентные по отношению к субстрату ингибиторы с помощью компьютерного скрининга. На основе детального анализа межмолекулярных взаимодействий из компьютерной библиотеки соединений выбраны сульфонаты STK370528 и STK376552, подавляющие активность фермента в микромолярном диапазоне концентраций. Показано, что структурная организация и локализация участков связывания олигонуклеотида и фосфотирозина в субстратсвязывающей бороздке являются важными факторами, которые необходимо учитывать при создании новых ингибиторов Tdp1, а также оптимизации их структуры. ●

Работа поддержана грантом Президента РФ для молодых ученых (МК-7630.2016.4). Биохимические испытания ингибиторов Tdp1 поддержаны проектом комплексной программы СО РАН № П.2П/VI.57-4 (0309-2015-0023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Champoux J.J. // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 369–413.
2. Wang J.C. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. P. 430–440.
3. Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer.* 2006. V. 6. P. 789–802.
4. Lebedeva N., Rechkunova N., Boiteux S., Lavrik O. // *IUBMB Life.* 2008. V. 60. P. 130–134.
5. Pommier Y., Redon C., Rao V.A., Seiler J.A., Sordet O., Takemura H., Antony S., Meng L., Liao Z., Kohlhagen G., et al. // *Mutat. Res.* 2003. V. 532. P. 173–203.
6. Murai J., Huang S.Y., Das B.B., Dexheimer T.S., Takeda S., Pommier Y. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 12848–12857.
7. Jakobsen A.K., Lauridsen K.L., Samuel E.B., Proszek J., Knudsen B.R., Hager H., Stougaard M. // *Exp. Mol. Pathol.* 2015. V. 99. P. 56–64.
8. Interthal H., Pouliot J.J., Champoux J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 12009–12014.
9. Deb ethune L., Kohlhagen G., Grandas A., Pommier Y. // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 1198–1204.
10. Davies D.R., Interthal H., Champoux J.J., Hol W.G. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. P. 829–837.
11. Davies D.R., Interthal H., Champoux J.J., Hol W.G. // *Structure.* 2002. V. 10. P. 237–248.
12. Raymond A.C., Rideout M.C., Staker B., Hjerrild K., Burgin A.B., Jr. // *J. Mol. Biol.* 2004. V. 338. P. 895–906.
13. Davies D.R., Interthal H., Champoux J.J., Hol W.G.J. // *J. Mol. Biol.* 2002. V. 324. P. 917–932.
14. Davies D.R., Interthal H., Champoux J.J., Hol W.G.J. // *Chem. Biol.* 2003. V. 10. P. 139–147.
15. Dexheimer T.S., Antony S., Marchand C., Pommier Y. // *Anticancer Agents Med. Chem.* 2008. V. 8. P. 381–389.
16. Beretta G.L., Cossa G., Gatti L., Zunino F., Perego P. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. P. 1500–1508.
17. Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C. // *Drug Metab. Rev.* 2014. V. 46. P. 494–507.
18. Dexheimer T.S., Gediya L.K., Stephen A.G., Weidlich I., Antony S., Marchand C., Interthal H., Nicklaus M., Fisher R.J., Njar V.C., et al. // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 7122–7131.
19. Conda-Sheridan M., Reddy P.V., Morrell A., Cobb B.T., Marchand C., Agama K., Chergui A., Renaud A., Stephen A.G., Bindu L.K., et al. // *J. Med. Chem.* 2013. V. 56. P. 182–200.
20. Nguyen T.X., Abdelmalak M., Marchand C., Agama K., Pommier Y., Cushman M. // *J. Med. Chem.* 2015. V. 58. P. 3188–3208.
21. Marchand C., Lea W.A., Jadhav A., Dexheimer T.S., Austin C.P., Inglese J., Pommier Y., Simeonov A. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. P. 240–248.
22. Sirivolu V.R., Vernekar S.K., Marchand C., Naumova A., Chergui A., Renaud A., Stephen A.G., Chen F., Sham Y.Y., Pommier Y., et al. // *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 8671–8684.
23. Zakharenko A., Khomenko T., Zhukova S., Koval O., Zakharova O., Anarbaev R., Lebedeva N., Korchagina D., Komarova N., Vasiliev V., et al. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. P. 2044–2052.
24. Захаренко А.Л., Пономарев К.Ю., Суслов Е.В., Корчагина Д.В., Волчо К.П., Васильева И.А., Салахутдинов Н.Ф., Лаврик О.И. // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 731–736.
25. Nguyen T.X., Morrell A., Conda-Sheridan M., Marchand C., Agama K., Birmingham A., Stephen A.G., Chergui A., Naumova A., Fisher R., et al. // *J. Med. Chem.* 2012. V. 55. P. 4457–4478.
26. Dean R.A., Fam H.K., An J., Choi K., Shimizu Y., Jones S.J., Boerkoel C.F., Interthal H., Pfeifer T.A. // *J. Biomol. Screen.* 2014. V. 19. P. 1372–1382.
27. Weidlich I.E., Dexheimer T., Marchand C., Antony S., Pommier Y., Nicklaus M.C. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. P. 182–189.
28. Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis.* 1997. V. 18. P. 2714–2723.
29. Fiser A., Sali A. // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. P. 2500–2501.
30. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., 3rd, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., et al. AMBER 12. University of California, San Francisco. 2012.
31. Case D.A., Cheatham T.E., 3rd, Darden T., Gohlke H., Luo R., Merz K.M., Jr., Onufriev A., Simmerling C., Wang B., Woods R.J. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1668–1688.
32. Воеводин В.Л., Жуматий С.А., Соболев С.И., Антонов А.С., Брызгалов П.А., Никитенко Д.А., Стефанов К.С., Воеводин Вад.В. // *Открытые системы.* 2012. Т. 7. С. 36–39.
33. Homeyer N., Horn A.H., Lanig H., Sticht H. // *J. Mol. Model.* 2006. V. 12. P. 281–289.
34. Hornak V., Abel R., Okur A., Strockbine B., Roitberg A., Simmerling C. // *Proteins.* 2006. V. 65. P. 712–725.
35. Rocha G.B., Freire R.O., Simas A.M., Stewart J.J.P. // *J. Comp. Chem.* 2006. V. 27. P. 1101–1111.
36. Walker R.C., Crowley M.F., Case D.A. // *J. Computat. Chem.* 2008. V. 29. P. 1019–1031.
37. Le Guilloux V., Schmidtke P., Tuffery P. // *BMC Bioinformatics.* 2009. V. 10. P. 168.
38. Suplatov D., Kirilin E., Arbatsky M., Takhaviev V., Švedas V. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. W344–W349.
39. Нилов Д.К., Прохорова Е.А., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2015. Т. 7. № 2. С. 62–68.
40. Congreve M., Carr R., Murray C., Jhoti H. // *Drug Discov. Today.* 2003. V. 8. P. 876–877.
41. Lipinski C.A. // *Drug Discov. Today Technol.* 2004. V. 1. P. 337–341.
42. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Chem. Inf. Model.* 2008. V. 48. P. 2371–2385.
43. Novikov F.N., Stroylov V.S., Stroganov O.V., Kulkov V., Chilov G.G. // *J. Mol. Model.* 2009. V. 15. P. 1337–1347.
44. Wang J., Wolf R.M., Caldwell J.W., Kollman P.A., Case D.A. // *J. Comput. Chem.* 2004. V. 25. P. 1157–1174.
45. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Mol. Graph.* 1996. V. 14. P. 33–38.
46. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. P. 683–686.
47. Johansson M.K., Fidder H., Dick D., Cook R.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 6950–6956.
48. Neubig R.R., Spedding M., Kenakin T., Christopoulos A. // *Pharmacol. Rev.* 2003. V. 55. P. 597–606.
49. Seabra G. de M., Walker R.C., Roitberg A.E. // *J. Phys. Chem. A.* 2009. V. 113. P. 11938–11948.
50. Халиуллин И.Г., Нилов Д.К., Шаповалова И.В., Швядас В.К. // *Acta Naturae.* 2012. Т. 4. № 2. С. 83–89.
51. Jensen P.W., Falconi M., Kristoffersen E.L., Simonsen A.T., Cifuentes J.B., Marcussen L.B., Frohlich R., Vagner J., Harmsen C., Juul S., et al. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 48. P. 230–237.

УДК 577.352

Дипольные модификаторы – регуляторы латеральной гетерогенности липидных мембран

С. С. Ефимова, О. С. Остроумова*

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

*E-mail: osostroumova@mail.ru

Поступила в редакцию 19.10.2017

Принята к печати 02.03.2017

РЕФЕРАТ С использованием флуоресцентной конфокальной микроскопии гигантских одноламеллярных липосом, изготовленных из тройных смесей, содержащих холестерин (Хол), фосфолипиды с низкой (ДОФХ, ПОФХ или ДПОФХ) и липиды с высокой (сфингомиелин (СМ) или тетрамиристоилкардиолипин (ТМКЛ)) температурой плавления ацильных цепей, изучены паттерны фазового разделения везикул в мембранах до и после введения в суспензию биологически активных низкомолекулярных соединений амфифильной природы, называемых дипольными модификаторами. Показано, что независимо от вида тугоплавкого липида в ряду ПОФХ, ДОФХ и ДПОФХ содержание липосом, демонстрирующих фазовое разделение, уменьшается. При замене в составе везикул тугоплавкой компоненты, СМ на ТМКЛ, наблюдается усиление фазовой сегрегации липидов. Учитывая, что первый случай соответствует уменьшению толщины мембранных областей, обогащенных легкоплавкими фосфолипидами и находящихся в неупорядоченной жидкой фазе, а второй – снижению толщины упорядоченных липидных доменов, включающих различные тугоплавкие липиды, полученные результаты позволяют связывать сценарий доменной организации везикул с величиной несоответствия между толщиной углеводородного остова мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии. Дипольные модификаторы, флавоноиды и стирилпиридиновые красители, ослабляют фазовую сегрегацию мембран, включающих СМ, Хол, ПОФХ или ДОФХ. Остальные протестированные трехкомпонентные липидные системы к действию модификаторов практически не чувствительны. Выдвинуто предположение о связи наблюдаемых эффектов со способностью дипольных модификаторов влиять на величину несоответствия между толщиной мембраны в различном агрегатном состоянии за счет разжижения неупорядоченных и (или) упорядоченных липидных доменов при погружении в мембрану, глубина которого зависит от гидрофобности молекул модификаторов, формы липидов, образующих домены, и плотности их упаковки. Наибольший эффект среди проверенных модификаторов вызывает флоретин, RH 421 и RH 237.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА латеральная неоднородность мембран, липидные бислои, липидные домены, дипольные модификаторы, стирилпиридиновые красители, фазовое разделение, флавоноиды, халконы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДОФХ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДПОФХ – 1,2-дипальмитолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; СМ – сфингомиелин из мозга свиней; ТМКЛ – 1,1',2,2'-тетрамиристоилкардиолипин; Хол – холестерин.

ВВЕДЕНИЕ

Липидный бислой мембраны может иметь доменную структуру в результате сосуществования не смешиваемых липидных фаз, находящихся в различных агрегатных состояниях. Однокомпонентные липидные бислои при температуре ниже температуры плавления липида (T_m) пребывают в твердокристаллическом состоянии. В зависимости от наклона липидных молекул и способа упаковки углеводородных хвостов в твердом бислое выделяют несколько типов фаз: кристаллическую, гель-фазу и промежуточную риппл-фазу, характерную для некоторых

липидов, в частности, насыщенных фосфохолинов [1]. При температуре выше температуры основного фазового перехода липиды в бислое находятся в жидкоподобном состоянии. Фазовое поведение смеси липидов с различной температурой плавления существенно усложняется и в определенном температурном диапазоне (между температурами плавления индивидуальных липидов) в бислое может наблюдаться фазовое разделение: сосуществование твердой (s_o) и жидкой фаз (l_d), обогащенных липидом с высокой и низкой температурой плавления соответственно. Добавление к таким смесям некото-

рых стеринов, в частности холестерина, усиливает их фазовую сегрегацию: возникает промежуточная жидкая упорядоченная фаза (l_o). Установлено, что коэффициент латеральной диффузии липидов в l_o -фазе в 2–3 раза меньше по сравнению с l_a -областями [2]. Считается, что биологическим мембранам также свойственна латеральная сегрегация компонентов. Хотя гель-домены не относятся к уникальным свойствам модельных мембран (они обнаружены и в плазматических мембранах живых клеток [3]), принято думать, что фазовое разделение в биологических мембранах представлено в основном двумя жидкими фазами ($l_a + l_o$) [4]. Поскольку в этом случае латеральной сегрегации подвержены не только мембранные липиды, но и белки, значительное распространение приобрела модель, согласно которой в биологических мембранах возникают белок-липидные нанодомены (рафты). Эти области обогащены тугоплавкими липидами и стеринами и находятся в l_o -состоянии. Интерес к рафтам вызван их предполагаемым участием в таких жизненно важных процессах, как сортировка и доставка белков, клеточная сигнализация, иммунный ответ и др. [5–16]. Однако даже само существование рафтов в клеточных мембранах до сих пор остается дискуссионным. Считается, что сложности с обнаружением рафтов в клеточных мембранах связаны с тем, что их размер может варьировать от единиц до сотен нанометров, и они чрезвычайно динамичны. В липидных же бислоях упорядоченные домены могут достигать значительно больших размеров, что делает возможным их визуализацию методами флуоресцентной микроскопии. Для этого используют гигантские одноламеллярные липосомы [17]. Фазовое разделение в липосомах можно наблюдать, если ввести в мембрану флуоресцентно меченные липиды. Большинство подобных меток предпочитают неупорядоченную жидкокристаллическую фазу, поэтому упорядоченные домены остаются неокрашенными.

Низкомолекулярные соединения амфифильной природы, называемые дипольными модификаторами, в частности некоторые флавоноиды, способны влиять на баланс между фазами. Согласно работе [18], введение в суспензию липосом из бинарных смесей (ДОФХ : СМ (80 : 20 мол. %), ДОФХ : ДМФХ (50 : 50 мол. %) или ДОФХ : ДДФХ (50 : 50 мол. %)) флавоноидов, флоретина или биоханина А сопровождается уменьшением относительного числа липидных везикул, имеющих гель-домены. Сходное действие в отношении трехкомпонентных бислоев из ПОФХ, Хол и СМ оказывают флоретин, его гликозид флорицин, кверцетин и мирицетин, а также стирилпиридиновые красители серии RH [19]. Способность указанных дипольных модификаторов влиять на доменную

структуру ПОФХ-мембран, включающих различные стерины и сфинголипиды, была проанализирована в [18], в то время как зависимость наблюдаемых эффектов от вида фосфолипида, образующего неупорядоченную жидкую фазу, не изучена. Цель данной работы состояла в изучении влияния легкоплавкой компоненты на сценарий фазового разделения в липосомах, содержащих Хол и СМ, до и после введения флавоноидов или стирилпиридиновых красителей. Использование различных фосфолипидов, ПОФХ, ДОФХ и ДПОФХ, позволило последовательно изменять толщину обогащенных ими неупорядоченных липидных областей мембраны, находящихся в жидком состоянии. Для варьирования толщины упорядоченных липидных доменов помимо везикул, включающих СМ, были протестированы липидные смеси, содержащие ТМКЛ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

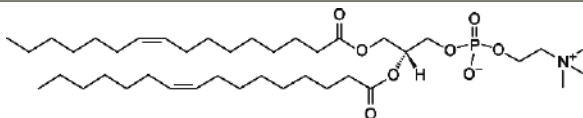
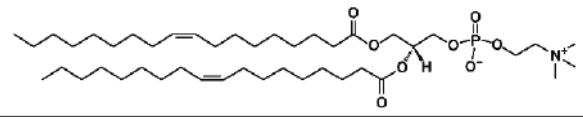
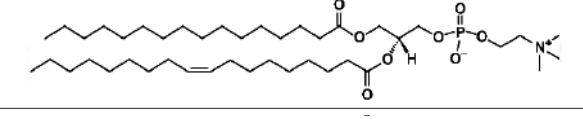
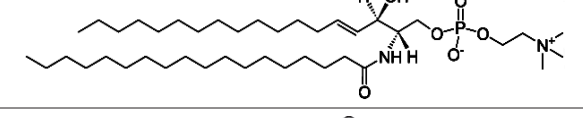
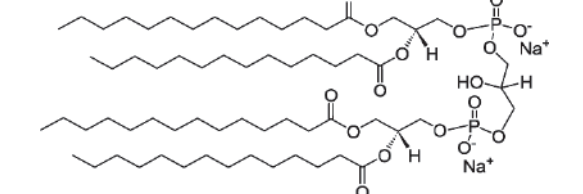
Материалы

В работе использовали следующие реактивы: сорбитол, флоретин, флорицин, кверцетин, мирицетин и RH 421 (Sigma, США); RH 237 (Molecular Probes, США); 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ), 1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ), 1,2-дипальмитолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПОФХ), 1,1',2,2'-тетрамиристоилкардиолипид (ТМКЛ), сфингомиелин из мозга свиней (СМ), холестерин (Хол) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-(лиззамин родамин) (ЛР-ДДФЭ) (Avanti Polar Lipids, США). В таблице представлены некоторые характеристики липидов.

Конфокальная микроскопия гигантских моноламеллярных липосом

Гигантские моноламеллярные липосомы изготавливали методом электроформации с помощью Nanion vesicle prep pro (Германия) на покрытых смесью оксидов индия и титана стеклах (90% оксида индия и 10% оксида титана, размер $29 \times 68 \times 0.9$ мм) с поверхностным удельным сопротивлением 20–30 Ом/см² (стандартный протокол, напряжение 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, 25°C). Латеральное фазовое разделение визуализировали путем введения флуоресцентного зонда ЛР-ДДФЭ в исходный липидный раствор тройных смесей из 40 мол. % фосфолипида с низкой температурой плавления (ДОФХ, ПОФХ или ДПОФХ), 40 мол. % липида с высокой температурой плавления (СМ или ТМКЛ) и 20 мол. % Хол в хлороформе (2 мМ). Концентрация ЛР-ДДФЭ в образце составляла 1 мол. %. Суспензию липосом разделяли на аликвоты. В качестве контроля использова-

Основные характеристики изучаемых липидов

Липид	Химическая структура	C n:m	T _m , °C
ДПОФХ		16 : 1	-36
ДОФХ		18 : 1	-17
ПОФХ		16 : 0–18 : 1	-2
СМ		16 : 1–18 : 0	45
ТМКЛ		14 : 0	47

Примечание. Cn : m – число атомов углерода (n) и число двойных связей (m) в ацильных цепях; T_m – температура главного фазового перехода.

ли аликвоту без модификатора. Экспериментальные образцы содержали 400 мкМ флавоноида (флоретина, флорицина, кверцетина или мирицетина) или 10 мкМ стирилпиридинового красителя (RH 421 или RH 237). Липосомы наблюдали через иммерсионный объектив 100.0 × /1.4 HCX PL в Leica TCS SP5 конфокальной лазерной системы Apo (Leica Microsystems, Германия). Наблюдение препаратов проводили при температуре 25°C. Свечение ЛР-ДПФЭ возбуждали светом с длиной волны 543 нм (гелий-неоновый лазер). Известно, что ЛР-ДПФЭ в бислое с фазовым разделением встраивается преимущественно в жидкую неупорядоченную фазу (l_a) [20]. В то время как жидкая упорядоченная (l_o) и твердая упорядоченная (гель, s_o) фазы остаются неокрашенными [21]. Упорядоченные домены дискриминировали по их морфологии: неокрашенные домены круглой формы считали пребывающими в l_o-состоянии, а неокрашенные области нерегулярной конфигурации относили к s_o-фазе. Образец характеризовали частотой встречаемости (p_i, %) гомогенных и гетерогенных везикул:

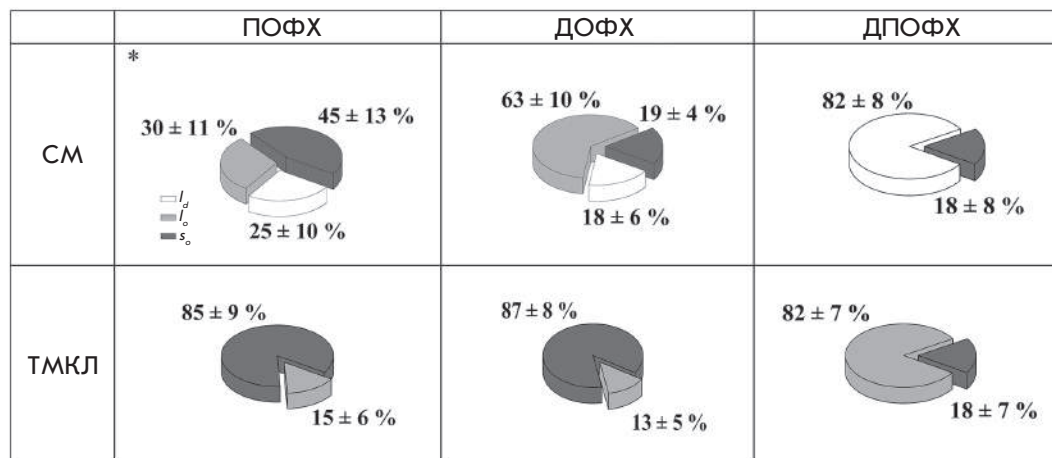
$$p_i = \frac{N_i}{N} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где i – тип фазового разделения липосом (гомогенные l_a-везикулы или липосомы, включающие l_o или s_o-домены); N_i – число везикул в образце с определенным фазовым сценарием (от 0 до 50), N – общее число липосом в образце (50 в каждой системе). Значения p_i для каждой из систем получали путем усреднения величин, определенных в четырех независимых экспериментах. Результаты для каждой из тестируемых липидных систем представляли в виде круговой диаграммы. Погрешности определения доли липосом с определенным типом фазового разделения приведены на диаграммах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1А (верхняя панель) представлены круговые диаграммы, показывающие возможные паттерны фазовой сегрегации мембран липосом, сформированных с участием сфингомиелина (СМ; 40 мол. %), холестерина (Хол; 20 мол. %) и различных легкоплавких фосфолипидов (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ; 40 мол. %). (Соответствующие температуры плавления фосфолипидов указаны в таблице.) Примеры микротографий липидных везикул с тем или иным

А



Б

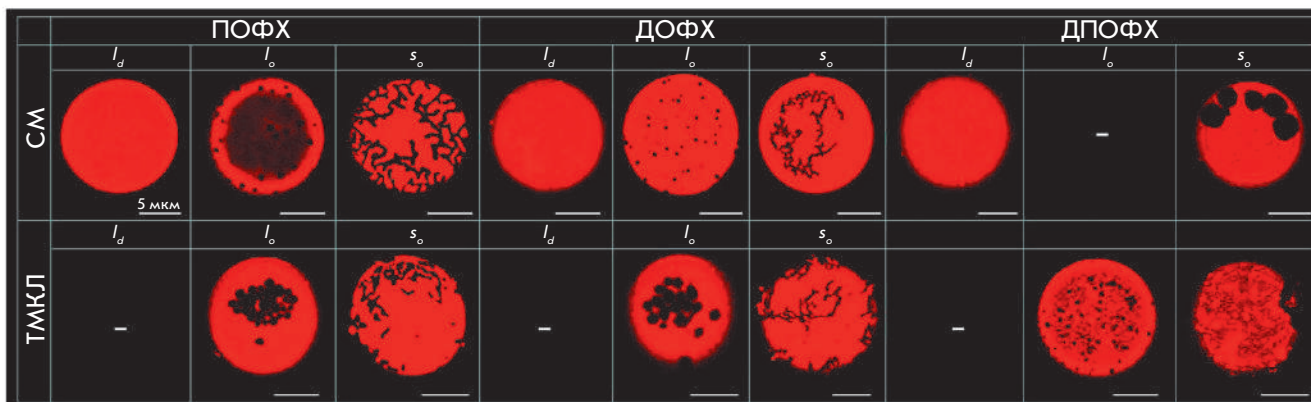


Рис. 1. Круговые диаграммы, показывающие вероятные сценарии фазового разделения в мембранах липосом из смесей сфингомиелина (СМ, 40 мол. %) или тетрамиристоилкардиолипина (ТМКЛ, 40 мол. %) с холестерином (20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) (А), и микрофотографии липосом различного состава, показывающих тот или иной тип фазового разделения в бислое (l_d , l_o , s_o) (Б). Здесь и на рис. 3 и 4 на каждой диаграмме сектор, отвечающий процентному соотношению везикул с твердыми упорядоченными доменами (s_o), окрашен в темно-серый цвет, с жидкими упорядоченными областями (l_o) – в светло-серый цвет, сектор белого цвета характеризует относительное число гомогенно окрашенных флуоресцентным маркером липосом, пребывающих в жидком неупорядоченном состоянии (l_d) без видимого фазового разделения. * – Данные взяты из [19]

видом фазового разделения мембран (l_d , l_o , s_o) представлены на рис. 1Б (верхняя панель). Сценарий фазового разделения в смеси СМ : Хол : ПОФХ изучен нами ранее [19]. Установлено, что 45 ± 13% СМ : Хол : ПОФХ-липосом содержат твердокристаллические домены нерегулярной формы (s_o). Жидкие упорядоченные домены круглой формы (l_o) включают 30 ± 11% ПОФХ : СМ : Хол-везикул. Оставшаяся часть – это гомогенно окрашенные флуоресцентным маркером липосомы (l_d), не показывающие микроскопического фазового разделения. Из рис. 1А (верхняя панель) можно заметить, что замена в мембранообразующей смеси ПОФХ на ДОФХ приводит

к падению доли везикул, включающих s_o -домены (19 ± 4%), и росту числа липосом, содержащих l_o -области (63 ± 10%). В случае ДПОФХ 82 ± 8% везикул гомогенно окрашены, отсутствует видимое фазовое разделение, а оставшаяся часть включает твердые домены. Таким образом, в ряду ПОФХ, ДОФХ, ДПОФХ видимая фазовая сегрегация уменьшается. В указанном ряду толщина углеводородного остова неупорядоченных областей (d_{Ld}), включающих различные легкоплавкие фосфолипиды, снижается, а разница между толщиной гидрофобного региона мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии (Δd) растет (рис. 2, левая часть) [22, 23].

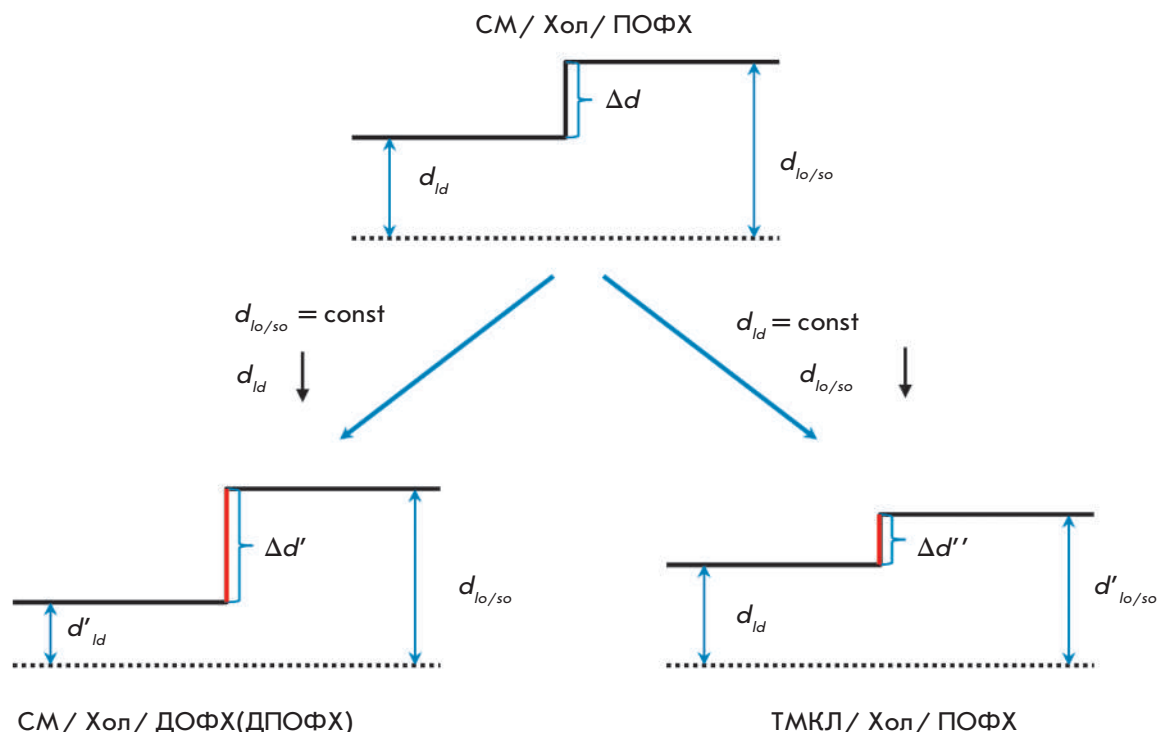


Рис. 2. Схематическое изображение величины несоответствия (Δd) между толщиной углеводородного остова мембраны в упорядоченном (d_{l_o/s_o}) и неупорядоченном состоянии (d_{l_d}) в зависимости от липидного состава бислоя. Пунктирная линия отмечает центр бислоя, сплошная – границу между полярной и неполярной областями мембраны

В результате формирования границ между упорядоченными и неупорядоченными доменами, предполагающее экспонирование части гидрофобного региона водному раствору, становится чрезвычайно невыгодным, и число липосом, характеризующихся выраженной фазовой сегрегацией, падает. Сходный вывод можно сделать, анализируя результаты, представленные на нижней панели рис. 1, которая показывает результаты исследования фазового разделения в мембранах, включающих тетрамиристилкардиолипид (ТМКЛ; 40 мол. %), Хол (20 мол. %) и различные легкоплавкие фосфолипиды (40 мол. %). Можно заметить, что все ТМКЛ-содержащие липосомы независимо от вида легкоплавкого липида характеризуются фазовым разделением (отсутствуют гомогенно окрашенные маркером липосомы, включающие ТМКЛ). Различия между представленными липидными системами заключаются в процентном соотношении везикул, включающих l_o - и s_o -домены. Как отмечено выше, среди протестированных фосфолипидов l_d -фазу с наименьшей толщиной образует ДПОФХ, что соответствует наибольшей величине Δd , а следовательно, наибольшей энергии формирования упорядоченных доменов. Поэтому липосомы, включающие этот фосфолипид, характеризуются

менее выраженной фазовой сегрегацией ($82 \pm 7\%$ имеют l_o -домены) по сравнению с везикулами, содержащими ПОФХ и ДОФХ, которые формируют l_d -фазы с большей толщиной и меньшим значением Δd , в результате чего наблюдается фазовое разделение большинства липосом ($85 \pm 9\%$ и $87 \pm 8\%$ соответственно) по типу l_d/s_o .

Сравнение сценариев фазового поведения систем, включающих различные тугоплавкие липиды, также указывает на ключевую роль величины Δd в регуляции латеральной гетерогенности трехкомпонентных мембран. На рис. 1Б (нижняя панель) приведены микрофотографии ТМКЛ-содержащих липосом, включающих различные легкоплавкие фосфолипиды. На рис. 1А видно, что замена в мембранообразующей смеси СМ на ТМКЛ приводит к усилению фазовой сегрегации мембран. В случае ПОФХ- (левый столбец) и ДОФХ-содержащих бислоев (центральный столбец) увеличивается доля липосом с s_o -доменами, а в случае мембран, включающих ДПОФХ, статистически значимо растет число везикул с l_o -областями (правый столбец). Это обусловлено уменьшением толщины упорядоченной фазы при замене СМ на ТМКЛ, снижением разницы Δd (рис. 2, правая часть) и соответствующим падением

А

Липидный состав везикул (40/20/40 мол. %)	Дипольный модификатор					
	Флоретин	Флорицин	Кверцетин	Мирицетин	RH 421	RH 237
СМ/ Хол/ ПОФХ*						
СМ/ Хол/ ДОФХ						
СМ/ Хол/ ДПОФХ						

Б

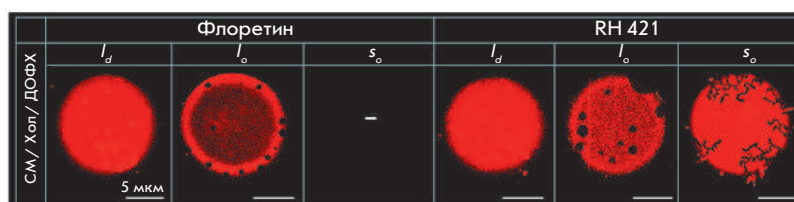


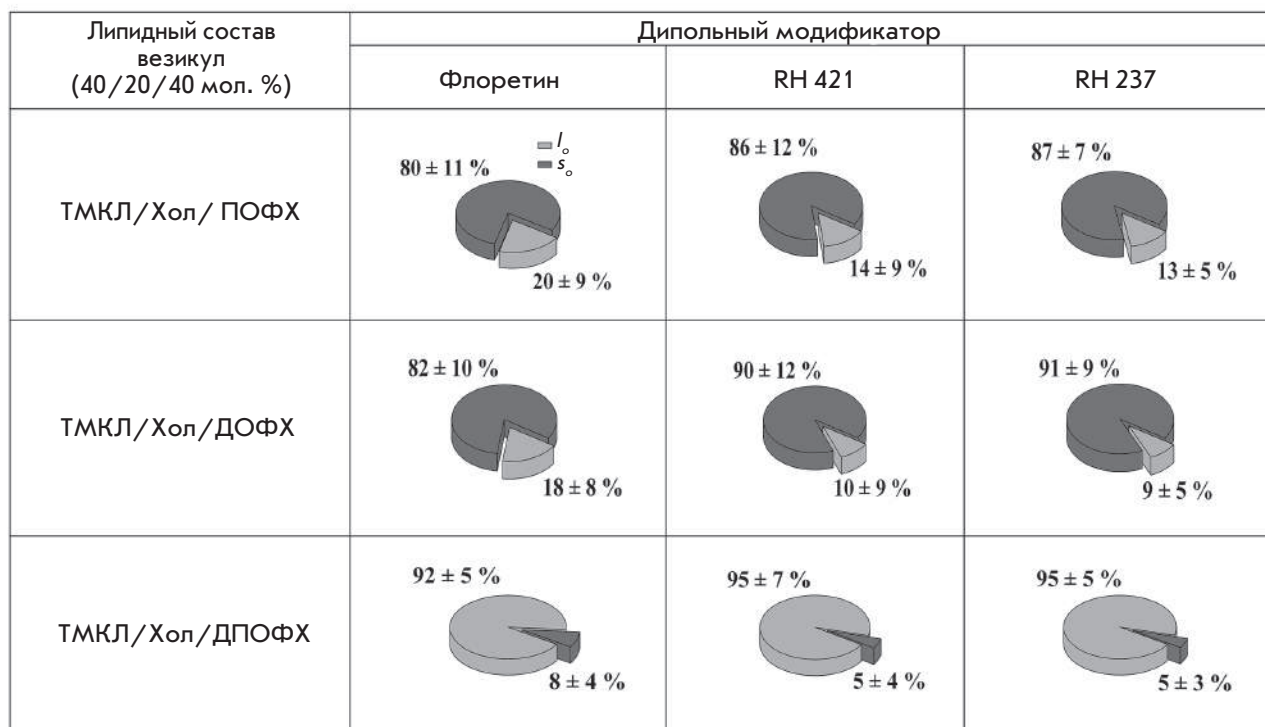
Рис. 3. Круговые диаграммы, показывающие вероятные сценарии фазового разделения в мембранах липосом из смеси сфингомиелина (СМ, 40 мол. %) с холестерином (Хол, 20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) в присутствии дипольных модификаторов (400 мкМ флавоноидов, флоретина, флорицина, кверцетина и мирицетина или 10 мкМ стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237) (А), и микрофотографии СМ/Хол/ДОФХ-липосом с тем или иным типом фазового разделения в бислое (l_d , l_o , s_o) в присутствии флоретина и RH 421 (Б). * – Данные взяты из [19]

энергии образования границ упорядоченных доменов. Таким образом, представленные на рис. 1 результаты позволяют связывать сценарий латеральной гетерогенности трехкомпонентных мембран с величиной несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии: чем меньше Δd , тем сильнее фазовое разделение в бислое.

Учитывая данные о влиянии дипольных модификаторов мембран не только на дипольный потенциал, но и на упаковку мембранообразующих липидов [24–27], мы предположили, что эти агенты способны изменять сценарий фазовой сегрегации. Ранее нами было изучено действие дипольных модификаторов: флоретина, флорицина, кверцетина, мирицетина, RH 421 и RH 237, на сценарий фазового разделения в СМ/Хол/ПОФХ-везикулах [19]. Результаты представлены на рис. 3А (верхняя панель). Видно, что все использованные модификаторы вызывают ослабление фазовой сегрегации мембран, выражающееся в уменьшении доли липосом с гелевыми доменами. При этом при введении флоретина, кверцетина или мирицетина уменьшение числа везикул

с s_o -доменами сопровождается соответствующим ростом процентного содержания гомогенно окрашенных липосом на 40–45%, а в присутствии флорицина, RH 421 и RH 237 – как увеличением доли везикул с l_o -доменами приблизительно на 30–35%, так и незначительным ростом содержания гомогенных липосом (на 5–10%). Наблюдаемый рост относительного числа гомогенно окрашенных ДОФХ-содержащих липосом в присутствии флоретина, флорицина, RH 421 и RH 237 (на 10–30%) и полное исчезновение везикул с s_o -доменами в случае флоретина можно интерпретировать как ослабление фазовой сегрегации мембран после введения дипольных модификаторов, так же как и в случае ПОФХ (рис. 3А, средняя панель). Примеры микрофотографий липидных везикул, включающих ДОФХ, Хол и СМ и показывающих тот или иной сценарий фазовой сегрегации бислоя (l_d , l_o , s_o) в присутствии флоретина и RH 421, представлены на рис. 3Б. Статистически значимых различий в изменении сценария фазовой сегрегации ДОФХ-содержащих мембран в присутствии кверцетина и мирицетина не выявлено.

А



Б

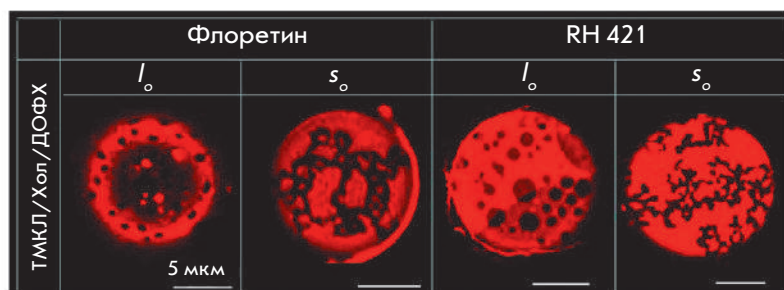


Рис. 4. Круговые диаграммы вероятных сценариев фазового разделения в мембранах липосом из смеси тетра-миристоилкардиолипина (ТМКЛ, 40 мол. %) с холестерином (Хол, 20 мол. %) и различными фосфолипидами (ПОФХ, ДОФХ или ДПОФХ) (40 мол. %) в присутствии дипольных модификаторов (400 мкМ флоретина или 10 мкМ стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237) (А) и микрофотографии ТМКЛ/Хол/ДОФХ-везикул, показывающих фазовое разделение по типу l_o/l_o или l_o/s_o и модифицированных флоретином или RH 421 (Б)

Трансформация сценария фазового разделения СМ-содержащих мембран в присутствии модификаторов может быть обусловлена увеличением величины Δd под действием тестируемых агентов. Наиболее вероятным вариантом развития событий является увеличение площади, занимаемой полярными головками мембранообразующих липидов, вызванное погружением модифицирующих агентов в липидный бислой и диполь-дипольным взаимодействием их молекул. Это приведет к относительному росту под-

вижности углеводородных цепей и вызовет падение температуры плавления липидов, показанное методами дифференциальной сканирующей микрокалориметрии [18, 25, 28]. Подобному «более текучему» состоянию липидов в мембране соответствует меньшая толщина бислоя. В таком случае выраженность эффекта модификатора будет зависеть от формы и гидрофобности его молекул, определяющих глубину погружения агента в бислой. По этой причине наиболее сильное воздействие на латеральную гете-

рогенность мембран оказывает относительно гидрофобный флоретин, в то время как эффекты его более гидрофильных аналогов, гликозида флоридина и высокогидроксилированных флавонолов, кверцетина и мирицетина, менее выражены. Длины молекул стирилпиридиновых красителей, RH 421 и RH 237, достаточно для почти полного пронизывания липидного монослоя, а увеличение площади, приходящейся на одну молекулу липида в мембране, обусловлено, главным образом, электростатическим отталкиванием сульфогрупп молекул красителей, локализованных в полярной области бислоя [27].

Помимо типа модификатора, регуляторную роль играют также геометрические характеристики молекул липидов, образующих фазу, куда встраиваются модифицирующие соединения. В случае липидов, имеющих близкую к цилиндрической форму, ДПОФХ, ПОФХ и СМ [29–31] можно ожидать более выраженного «разжижения» l_d -областей по сравнению с упорядоченными доменами, поскольку встраивание модификаторов в последние области должно быть затруднено ввиду более плотной упаковки липидов. Такой сценарий соответствует случаю, схематически изображенному на левой части рис. 2.

Как видно на нижней панели рис. 3А, в случае ДПОФХ-содержащих мембран не выявлено статистически значимых различий паттернов фазового разделения до и после введения тестируемых модификаторов. Учитывая, что преобладающее число везикул, включающих ДПОФХ, не характеризуется фазовой сегрегацией даже в отсутствие диполь-модифицирующих агентов вследствие наибольшей среди изучаемых липидных систем величины несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии, дальнейший рост Δd не приводит к значимым изменениям особенностей фазового разделения в бислоях.

В отличие от СМ, ТМКЛ имеет форму инвертированного конуса, что обуславливает отрицательную спонтанную кривизну образуемых им монослоев [32]. По всей вероятности, это облегчает встраивание модификаторов, молекулы которых имеют коническую форму, в упорядоченную фазу, обогащенную ТМКЛ. Одновременное «разжижение» как неупорядоченных l_d -областей, так и упорядоченных доменов не приведет к существенному изменению скачка толщины на границе раздела липидных фаз, а следовательно, изменения сценария фазовой сегрегации под действием модификаторов наблюдаться не будут. На рис. 4А можно видеть, что независимо от вида легкоплавкого фосфолипиды, входящего в состав модельных мембран, в присутствии дипольных модификаторов не происходит достоверного увеличения относительного числа ТМКЛ-содержащих липосом с l_o -доменами или появления везикул, не демонстрирующих видимого фазового разделения. Микрофотографии липидных везикул, включающих ДПОФХ, Хол и ТМКЛ и модифицированных флоретином или RH 421, представлены на рис. 4Б.

Таким образом, полученные нами результаты указывают на ключевую роль величины несоответствия толщины мембраны в упорядоченном и неупорядоченном состоянии в регуляции фазового разделения в трехкомпонентных модельных мембранах, а также открывают новые перспективы использования дипольных модификаторов для направленного видоизменения сценария латеральной гетерогенности липидных бислоев. ●

*Работа выполнена за счет гранта Российского
научного фонда (проект № 14-14-00565-П).*

*С.С. Ефимова удостоена стипендии Президента
РФ (СП-69.2015.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cevc G. // Chem. Phys. Lipids. 1991. V. 57. P. 293–307.
2. Almeida P.F., Vaz W.L., Thompson T.E. // Biophys. J. 1993. V. 64. P. 399–412.
3. Aresta-Branco F., Cordeiro A.M., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F., de Almeida R.F. // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. P. 5043–5054.
4. Brown D. // Int. J. Med. Microbiol. 2002. V. 291. P. 433–437.
5. Simons K., Ikonen E. // Nature. 1997. V. 387. P. 569–572.
6. Simons K., Toomre D. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2000. V. 1. P. 31–39.
7. Tsui-Pierchala B.A., Encinas M., Milbrandt J., Johnson E.M. // Trends Neurosci. 2002. V. 25. P. 412–417.
8. Pierce S.K. // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 96–105.
9. Van Laethem F., Leo O. // Curr. Mol. Med. 2002. V. 2. P. 557–570.
10. Morgan M.J., Kim Y.S., Liu Z. // Antioxid. Redox. Signal. 2007. V. 9. P. 1471–1483.
11. Jury E.C., Flores-Borja F., Kabouridis P.S. // Semin. Cell Dev. Biol. 2007. V. 18. P. 608–615.
12. Yoshizaki F., Nakayama H., Iwahara C., Takamori K., Ogawa H., Iwabuchi K. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1780. P. 383–392.
13. Fulop T., Le Page A., Garneau H., Azimi N., Baehl S., Dupuis G., Pawelec G., Larbi A. // Longev. Healthspan. 2012. V. 1. P. 6.
14. Head B.P., Patel H.H., Insel P.A. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1838. P. 532–545.
15. Ratajczak M.Z., Adamiak M. // Leukemia. 2015. V. 29. P. 1452–1457.
16. Farnoud A.M., Toledo A.M., Konopka J.B., Del Poeta M., London E. // Curr. Top. Membr. 2015. V. 75. P. 233–268.
17. Wesołowska O., Michalak K., Jadwiga Maniewska J., Hendrich A.B. // Acta Biochim. Pol. 2009. V. 56. P. 33–39.
18. Ostroumova O.S., Chulkov E.G., Stepanenko O.V., Schagina L.V. // Chem. Phys. Lipids. 2014. V. 178. P. 77–83.
19. Efimova S.S., Malev V.V., Ostroumova O.S. // J. Membr. Biol. 2016. V. 279. P. 97–106.
20. Juhasz J., Davis J.H., Sharom F.J. // Biochem. J. 2010. V. 430. P. 415–423.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

21. Muddana H.S., Chiang H.H., Butler P.J. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. P. 489–497.
22. García-Sáez A.J., Chiantia S., Schwille P. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 33537–33544.
23. Heberle F.A., Petruzielo R.S., Pan J., Drazba P., Kucerka N., Standaert R.F., Feigenson G.W., Katsaras J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. P. 6853–6859.
24. Cseh R., Hetzer M., Wolf K., Kraus J., Bringmann G., Benz R. // *Eur. Biophys. J.* 2000. V. 29. P. 172–183.
25. Tarahovsky Y.S., Muzafarov E.N., Kim Y.A. // *Mol. Cell Biochem.* 2008. V. 314. P. 65–71.
26. Ollila F., Halling K., Vuorela P., Vuorela H., Slotte J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. V. 399. P. 103–108.
27. Apetrei A., Mereuta L., Luchian T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1790. P. 809–816.
28. Cseh R., Benz R. // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 1477–1488.
29. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. 472–479.
30. Bezrukov S.M. // *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2000. V. 5. P. 237–243.
31. Byström T., Lindblom G. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2003. V. 59. P. 2191–2195.
32. Powell G.L., Hui S.W. // *Biophys. J.* 1996. V. 70. P. 1402–1406.

УДК 577.152.342*1'134

Роль инсерционного α -спирализованного домена АТФ-зависимой Lon-протеазы из *E. coli* в функционировании фермента

А. М. Куджаев, А. Г. Андрианова, Е. С. Дубовцева, О. В. Серова, Т. В. Ротанова*

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

*E-mail: tatyana.rotanova@ibch.ru

Поступила в редакцию: 05.07.2016

Принята к печати 20.01.2017

РЕФЕРАТ Мультидоменная АТФ-зависимая протеаза Lon из *Escherichia coli* (Ec-Lon) – один из ключевых ферментов системы контроля качества клеточного протеома. С целью изучения роли инсерционного HI(CC)-домена Ec-Lon получен и охарактеризован рекомбинантный фермент с делецией HI(CC)-домена (Lon-dHI(CC)). Проведено сравнительное исследование АТФ-азной, протеолитической и пептидазной активности интактной Lon-протеазы и Lon-dHI(CC), изучена возможность автолиза обеих форм фермента и их способность к связыванию ДНК. Показано, что HI(CC)-домен необходим для формирования функционально активной структуры Ec-Lon-протеазы и реализации белок-белковых взаимодействий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА AAA⁺-белки, АТФ-зависимый протеолиз, LonA-протеазы, инсерционный α -спирализованный домен, связывание ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ AMPNP – аденозин-5'-(β,γ -имидо)трифосфат; DTDP – 4,4'-дитиодипиридин; Glt – глутарил; Nu – нуклеотид; PerTBE – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl; Suc – сукцинил.

ВВЕДЕНИЕ

АТФ-зависимая Lon-протеаза *Escherichia coli* (Ec-Lon [КФ 3.4.21.53]; MEROPS: клан SJ, семейство S16, ID S16.001) – представитель семейства Lon-протеаз, которое играет ключевую роль в системе контроля качества клеточного протеома, функционирующей во всех доменах жизни [1–4]. Семейство Lon состоит из двух подсемейств – LonA, включающего бактериальные и эукариотические ферменты, и LonB, объединяющего ферменты архей. Протеазы подсемейств А и В различаются доменной организацией субъединиц, а также окружением каталитических остатков протеолитического центра [5]. Ec-Lon относится к подсемейству А, деградирует аномальные и дефектные полипептиды, а также ряд регуляторных клеточных белков по процессивному механизму в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТФ [4–7]. Отличительной характеристикой Ec-Lon, как и других LonA-протеаз, является их способность к связыванию ДНК [8–10].

Субъединица Ec-Lon (784 аминокислотных остатка) состоит из пяти доменов: N-HI(CC)-NB-N-P (рис. 1А), где нуклеотидсвязывающий (NB) и α -спирализованный (Н) домены формируют АТФ-

азный модуль, относящийся к суперсемейству AAA⁺-белков (АТФ-аз, ассоциированных с различными клеточными активностями) [11, 12], С-концевой Р-домен представляет серин-лизиновую пептидгидролазу, а N-концевой и следующий за ним «инсерционный» α -спирализованный домены образуют некаталитическую область (N-HI(CC)), включающую фрагмент последовательности со специфической coiled-coil (CC) конформацией [13, 14]. Определены кристаллические структуры индивидуальных доменов (за исключением HI(CC)-домена) Ec-Lon и некоторых других LonA-протеаз. Пространственные структуры полноразмерных ферментов подсемейства LonA до сих пор не известны.

Двухдоменная организация N-концевой области является уникальной характеристикой Ec-Lon и всего пула LonA-протеаз. От других AAA⁺-белков системы контроля качества, представленных совокупностью АТФ-зависимых протеаз (ClpAP, ClpXP, FtsH, HslUV) и шаперонов-дезагрегас (ClpB, Hsp104), LonA-протеазы отличает наличие вставочного HI(CC)-домена. Ранее нами было показано, что HI(CC)-домен Ec-Lon проявляет выраженное сходство как с Н-доменом собственного

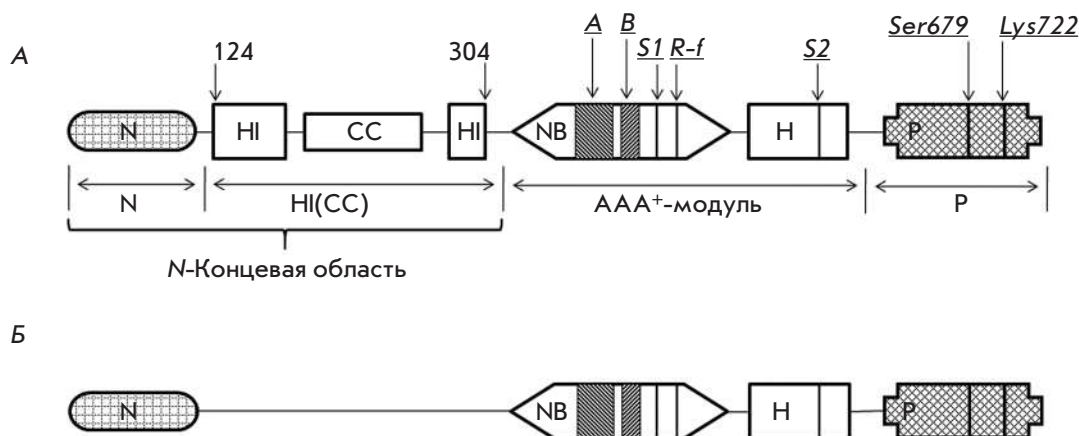


Рис. 1. Доменная организация LonA-протеазы *E. coli* (А) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) (Б). Обозначения доменов: N – N-концевой, HI(CC) – инсерционный α-спирализованный с coiled-coil(CC)-областью, NB – нуклеотидсвязывающий, H – α-спирализованный, P – протеолитический. Компоненты АТР-азного центра: *A* и *B* – мотивы Уолкера, *S1* и *S2* – сенсорные остатки; *R-f* – остаток «аргининовый палец»; компоненты протеолитического центра: *Ser679* и *Lys722* – каталитические остатки

AAA⁺-модуля, так и с α-спирализованным доменом (HI(M)) первого из двух AAA⁺-модулей ClpВ-шаперонов [13, 14]. При этом участие HI(CC)-домена в функционировании Ec-Lon-протеазы, во взаимодействии с нуклеиновыми кислотами и/или в структурной организации фермента до настоящего времени не охарактеризовано.

С целью изучения роли инсерционного HI(CC)-домена в проявлении функциональных свойств Ec-Lon нами проведено сравнительное исследование энзиматических характеристик и способности к связыванию ДНК как интактного фермента (рис. 1А), так и его делеционной формы Lon-dHI(CC), утратившей HI(CC)-домен (рис. 1Б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

В работе использовали коммерческие реактивы фирм Sigma, Bio-Rad, Thermo Scientific (США), Fluka (Швейцария), Boehringer Mannheim (Германия), Pharmacia (Швеция), Difco (Англия), Panreac (Испания) и «Реахим» (Россия).

Получение Ec-Lon (Lon-H₆) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC)

Рекомбинантную форму Ec-Lon, содержащую гексагистиридиновый фрагмент (в составе октапептида LENNNNN) на С-конце белка (Lon-H₆), получали по ранее описанной методике [15].

Делеционную форму Lon-dHI(CC) получали на основе Lon-H₆-протеазы. Методом мегапрай-

мера сконструировали праймеры Lon_d_124-304, Lon_HindIII и Lon_BamHI_rev (соответственно: 5'-TTTTTTGACSTTGCTGCGCGCATCAATG-GTCGGCGACTCCAG-3', 5'-CGCAGAAAGA-AGCTTCAACGG-3' и 5'-GTTCTGCTCTGGA-TCCAGCAC-3'). Амплификацию фрагмента гена проводили в два этапа, используя в качестве матрицы плазмидную ДНК pET28-lon-H₆. На первом этапе с помощью праймеров Lon_d_124-304 и Lon_HindIII получили ПЦР-фрагмент, который использовали в качестве праймера на втором этапе вместе с праймером Lon_BamHI_rev. Полученный фрагмент ДНК длиной около 625 п.н. клонировали в вектор pET28_lon по уникальным сайтам рестрикции HindIII и BamHI.

Секвенирование клонированных ДНК и синтез праймеров осуществлены компанией «ЗАО ЕВРОГЕН» (www.evrogen.ru). Процедуры рестрикции и лигирования проводили согласно протоколам производителей соответствующих ферментов.

Выделение и очистку Lon-H₆ и Lon-dHI(CC) проводили в две стадии методами Ni²⁺-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонок HisTrap FF (тандем 2 × 5 мл, GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии на колонке HiTrap™ Q FF (5 мл, GE Healthcare) согласно ранее описанной методике [15].

Концентрации белков определяли по методу Брэдфорд [16].

Гомогенность белков в препаратах тестировали электрофоретически [17] с использованием коммер-

ческого набора маркеров (M , кДа): β -галактозидаза (116.0), бычий сывороточный альбумин (66.2), овальбумин (45.0), лактатдегидрогеназа (35.0), рестриктаза Bsp98I (25.0), β -лактальбумин (18.4) и лизоцим (14.4).

Очистка ДНК

ДНК очищали согласно протоколу, представленному в руководстве [18].

Определение ферментативных свойств Lon-H₆-протеазы и делеционной формы Lon-dHI(CC)

АТФ-азную активность тестировали по накоплению во времени неорганического фосфата в реакции гидролиза АТФ в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 5 мМ АТФ, 20 мМ MgCl₂ и 1 мкМ фермент, при 37°C [19]. В контрольном опыте фермент заменяли буфером. Начальные скорости реакций определяли по величине оптического поглощения смеси из 200 мкл реакционной среды и 600 мкл реагента (100 мМ Zn(АсО)₂, 15 мМ (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 1% SDS, рН 4.5–5.0) при длине волны 350 нм ($\epsilon_{350} = 7\ 800\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$).

Тиоэстеразная активность. За гидролизом тиобензилового эфира *N*-замещенного трипептида Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl (PepTBE) следили спектрофотометрически при длине волны 324 нм по величине оптического поглощения 4-тиопиридона ($\epsilon_{324} = 16\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$), образующегося в результате взаимодействия продукта гидролиза (бензилтиолата, BzIS⁻) с 4,4'-дитиодипиридином (DTDP) [20]. Гидролиз PepTBE проводили при 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 10% DMSO, 0.2 мМ DTDP, 0.1 мМ PepTBE и 0.2 мкМ фермент. При изучении влияния эффекторов в смесь добавляли нуклеотид до 2.5 мМ и MgCl₂ до 20 мМ.

Протеолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [17]. Реакцию проводили при температуре 37°C в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.1, содержащем 150 мМ NaCl, 20 мкМ β -казеин и 2–6 мкМ фермент, в отсутствие или в присутствии 5 мМ Nu и 20 мМ MgCl₂. Аликвоту реакционной или контрольной смеси (20 мкл) смешивали с 7 мкл лизирующего буфера (0.2 М Трис-НСl, рН 8.9, 4% SDS, 20% глицерин, 0.5 мМ EDTA, 0.8% бромфеноловый синий, 3% β -меркаптоэтанол), кипятили в течение 10 мин, наносили на 12% полиакриламидный гель (ПААГ) для электрофореза.

Автолитическую активность ферментов тестировали электрофоретически [17] в условиях, аналогичных условиям определения протеолитической активности, но в отсутствие β -казеина.

Тестирование комплексов Lon-H₆-протеазы и Lon-dHI(CC) с плазмидной ДНК

За образованием комплексов фермент–ДНК следили по торможению ДНК в агарозном геле (метод GMSA) [21]. 20–25 мкг Lon-H₆ или Lon-dHI(CC) инкубировали в течение 30 мин при 25°C с 500 нг плазмидной ДНК (pET28a) в 25 мкл 20 мМ Трис-НСl-буфера, рН 7.5, содержащего 60 мМ NaCl. Комплексы белок–ДНК анализировали гель-электрофорезом в стандартном 1.0% агарозном геле. Полосы ДНК визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Использованная в работе рекомбинантная Ec-Lon-протеаза, содержащая дополнительный С-концевой октапептид, включающий гексагистиридиновый фрагмент (Lon-H₆), была получена и охарактеризована ранее [15]. На основе Lon-H₆ получена рекомбинантная делеционная форма Lon-dHI(CC) без инсерционного HI(CC)-домена (остатки Glu124–Asn304, рис. 1Б). В препаративных количествах Lon-H₆ (M 88.5 кДа) и ее делеционную форму Lon-dHI(CC) (M 67.5 кДа) выделяли с использованием аффинной хроматографии на Ni-сефарозе и анионообменной хроматографии на Q-сефарозе. Проведено сравнительное изучение ферментативной активности интактной Lon-H₆-протеазы и ее делеционной формы. При этом охарактеризовано три типа активности – АТФ-азная, протеолитическая (субстрат – β -казеин) и пептидазная (субстрат – Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl, PepTBE), а также изучена возможность автолиза препаратов ферментов. Кроме того, методом фенольной экстракции проверено присутствие нуклеиновой кислоты в различных препаратах белка.

АТФ-азная активность делеционной формы Ec-Lon-протеазы

Для тестирования как АТФ-азной, так и других видов активности Lon-H₆-протеазы и ее делеционной формы в качестве стандартных условий были выбраны 37°C и 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1, содержащий 150 мМ NaCl.

Известно, что нативная wt-Ec-Lon проявляет максимальный уровень АТФ-азной активности при равных концентрациях АТФ и Mg²⁺, а избыток ионов магния оказывает ингибирующее влияние на гидролиз АТФ, которое нивелируется связыванием белкового субстрата [22].

Эти же тенденции характерны для интактной Lon-H₆-протеазы (рис. 2А): эффективность гидролиза АТФ ферментом в условиях, близких к физиологическим (соотношение концентраций Nu : Mg²⁺ = 1 : 4), существенно ниже, чем при эквимоллярных концен-

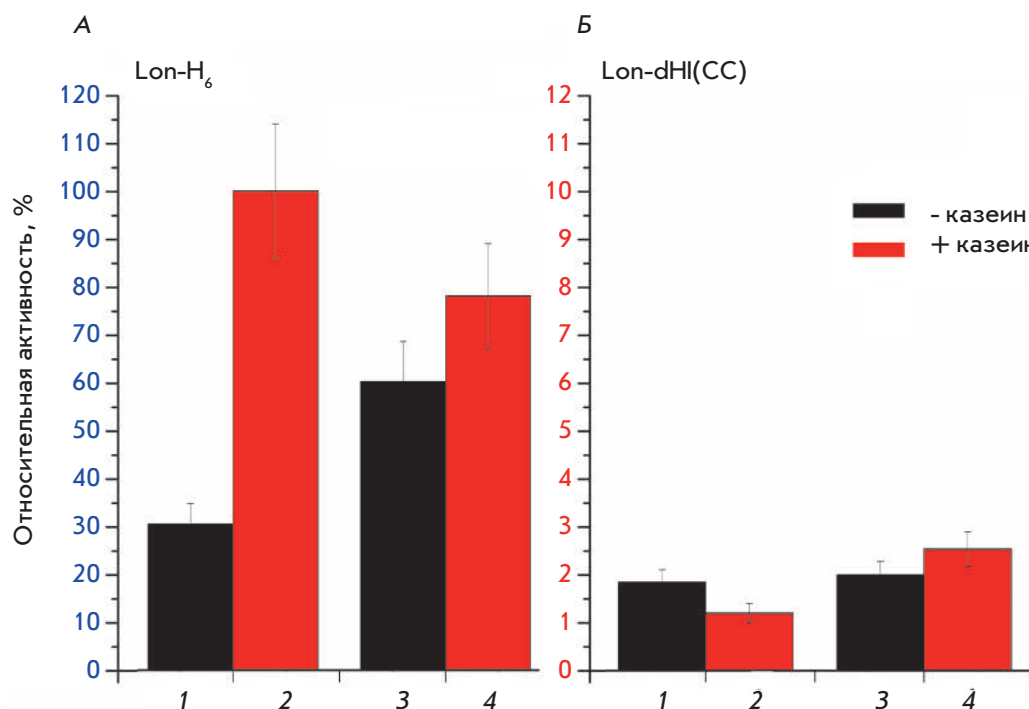


Рис. 2. АТФ-азная активность интактной Lon-H₆-протеазы (А) и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) (Б) в отсутствие (черные столбцы) и в присутствии (красные столбцы) белкового субстрата – β-казеина. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; концентрации: АТФ – 5 мМ; MgCl₂ – 20 (1, 2) или 5 мМ (3, 4); β-казеин – 0 (1, 3) или 0.5 мг/мл (2, 4); фермент – 0.5–1 мкМ

трациях Nu и ионов Mg²⁺. Добавление белкового субстрата (β-казеин) в обоих случаях приводит к значительному возрастанию АТФ-азной активности.

С утратой HI(CC)-домена Lon-протеаза почти полностью теряет способность к гидролизу АТФ: АТФ-азная активность Lon-dHI(CC) снижена по сравнению с активностью интактной Lon-H₆-протеазы более чем в 10 раз и практически не зависит ни от соотношения концентраций нуклеотида и ионов Mg²⁺, ни от добавления белка-субстрата (рис. 2Б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что инсерционный α-спирализованный HI(CC)-домен необходим для формирования АТФ-азного центра Ес-Lon-протеазы и его корректного функционирования.

Активность пептидазного центра делеционной формы Ес-Lon-протеазы

Аналогично Lon-H₆-протеазе Lon-dHI(CC) способна к гидролизу модельного пептидного субстрата ПерТВЕ, однако базовая пептидазная активность делеционной формы составляет около 30% от активности интактного фермента (таблица). Из приведенных в таблице данных следует, что только ионы Mg²⁺ активируют пептидазные центры и Lon-H₆, и Lon-dHI(CC). Влияние нуклеотидных эффекторов на интактный и модифицированный ферменты кардинально различается. Свободные нуклеотиды (кроме ADP) и комплексы Nu-Mg в разной степени (2–11 раз) активируют Lon-H₆-протеазу, а ADP ингибирует ее, тогда как ни один из нуклеотидов прак-

Влияние эффекторов на активность пептидгидролазных центров Lon-H₆ и Lon-dHI(CC)

Эффектор	Lon-H ₆		Lon-dHI(CC)	
	<i>v</i>	<i>n</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
Без эффектора	5.88	1	1.64	1
Mg	33.1	5.62	5.19	3.16
АТФ	47.1	8.01	1.33	0.81
ADP	0.49	0.08	1.79	1.09
АМPPNP*	14.2	2.41	1.82	1.11
АТФ-Mg	63.5	10.8	4.62	2.82
ADP-Mg	10.1	1.73	4.89	2.98
АМPPNP-Mg	58.0	9.86	5.6	3.41

Примечание. Приведены значения удельной скорости гидролиза субстрата ПерТВЕ (*v*, ([S], мкМ)/([E], мкМ)·мин) и *n* – отношение скоростей гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие эффектора (*v*_{эф}/*v*₀), где *n* < 1 соответствует ингибированию (показано курсивом), а *n* > 1 – активации гидролиза (показано жирным шрифтом). Ошибка не превышала 10%. Условия эксперимента: 50 мМ Трис-НСl-буфер, рН 8.1; 0.15 М NaCl; 10% DMSO; 0.1 мМ ПерТВЕ; 0.2 мМ DTDP; 2.5 мМ Nu; 20 мМ MgCl₂; 0.2 мкМ фермент; 37°C.

*Негидролизуемый аналог АТФ, аденозин-5'-(β,γ-имидо)трифосфат.

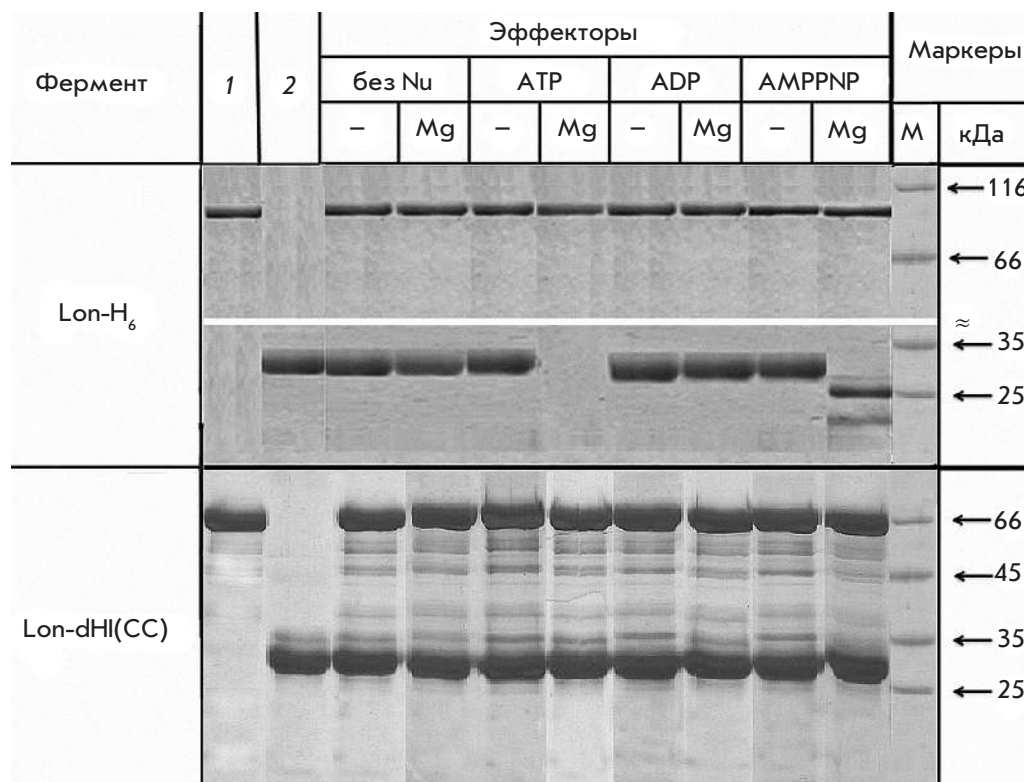


Рис. 3. Гидролиз β -казеина Lon-H₆-протеазой и ее делеционной формой Lon-dHI(CC) в отсутствие и в присутствии эффекторов (электрофорез в 12% ПААГ). Условия эксперимента: 50 мМ Трис-HCl-буфер, pH 8.1; 0.15 М NaCl; 37°C; время реакции 2 ч; концентрации: Nu – 5 мМ; MgCl₂ – 20 мМ; β -казеин – 0.5 мг/мл; Lon-H₆ – 2.5 мкМ; Lon-dHI(CC) – 6 мкМ. 1 – фермент (контроль), 2 – β -казеин (контроль), «←» – в отсутствие ионов Mg²⁺, Mg – в присутствии ионов Mg²⁺, M – маркеры

тически не влияет на гидролиз пептида Lon-dHI(CC)-протеазой, а комплексы Nu-Mg оказывают близкое по величине, но относительно невысокое активирующее воздействие на пептидазный центр фермента, сопоставимое с влиянием ионов Mg²⁺. Из этих данных следует, что форма Lon-dHI(CC) не способна связывать свободные нуклеотиды и слабо взаимодействует с их комплексами с ионами магния. Наиболее действенным эффектором, влияющим на активность пептидазного центра, следует считать ионы магния.

Таким образом, удаление HI(CC)-домена приводит к снижению активности пептидазного центра Eс-Lon-протеазы и к утрате регулирующего влияния АТР-азного центра на пептидазный, которое в интактном ферменте обусловлено природой связанного нуклеотида.

Протеолитическая и автолитическая активности делеционной формы Eс-Lon-протеазы

Протеолитическую активность Lon-H₆ и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) тестировали по гидролизу модельного белкового субстрата – β -казеина – в отсутствие и при наличии ионов Mg²⁺, свободных нуклеотидов и их комплексов. Эффективность гидролиза белка-мишени и процесс накопления продуктов деградации детектировали с помощью гелеэлектрофореза.

Интактная Lon-H₆-протеаза способна гидролизовать β -казеин в двух случаях: по процессивному механизму (без образования крупных промежуточных фрагментов) в условиях сопряжения протеолиза с гидролизом АТР или по непроцессивному механизму в присутствии комплекса негидролизуемого аналога АТР с магнием (рис. 3).

Удаление HI(CC)-домена приводит к полной утрате делеционной формой протеолитической активности по β -казеину, что свидетельствует о важности этого домена для связывания и гидролиза белкового субстрата (рис. 3). При этом на электрофореграмме инкубированной реакционной смеси обнаруживаются полосы, соответствующие полипептидам с молекулярными массами от 40 до 60 кДа, что указывает на возможность самодеградации Lon-dHI(CC) в условиях, используемых при определении гидролиза белка-мишени.

Выявление у Lon-dHI(CC) автолитической активности, сопровождающей потенциальный гидролиз белкового субстрата, потребовало изучения самого процесса автолиза. Показано, что интактная Lon-H₆-протеаза устойчива к самодеградации в присутствии любых нуклеотидных эффекторов (рис. 4). При этом в процессе длительной инкубации (24 ч и более) обнаруживается слабый автолиз Lon-H₆ в отсутствие эффекторов или при наличии ионов

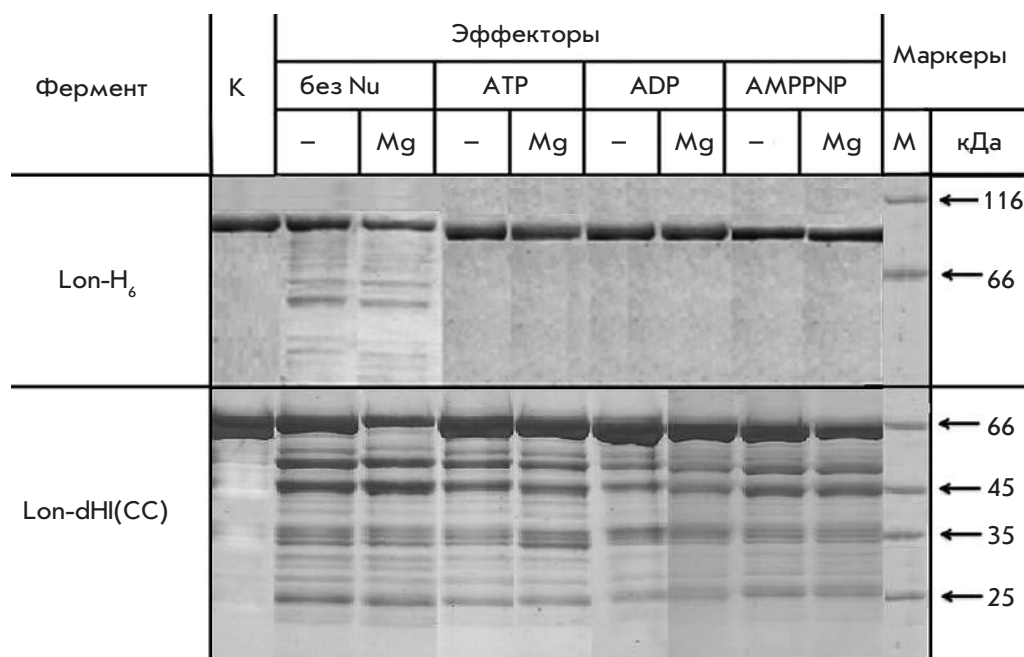


Рис. 4. Автолиз Lon-H₆-протеазы и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) в отсутствие и в присутствии эффекторов. Условия эксперимента и обозначения как на рис. 3 со следующими изменениями: Lon-H₆ – 3.4 мкМ, время реакции 24 ч. К – исходный фермент (контроль, время реакции 0 ч)

магния (рис. 4), что согласуется с ранее полученными результатами [23].

В отличие от Lon-H₆, делеционная форма Lon-dHI(CC) нестабильна, она подвергается автолизу как в отсутствие, так и в присутствии нуклеотидных эффекторов, причем, процесс автолиза Lon-dHI(CC) наиболее выражен при наличии ионов Mg (рис. 4).

Таким образом, утрата HI(CC)-домена приводит к полной потере способности Lon-H₆-протеазы к гидролизу белкового субстрата и к дестабилизации структуры фермента.

Связывание нуклеиновой кислоты Lon-H₆-протеазой и делеционной формой Lon-dHI(CC)

Важная характеристика Ec-Lon – способность к связыванию ДНК [8–10], однако сайт взаимодействия фермента с нуклеиновой кислотой до настоящего времени не локализован. Поскольку другие АТР-зависимые протеазы системы контроля качества клеточных белков не обладают ДНК-связывающими свойствами и не содержат характерного для LonA-протеаз инсерционного HI(CC)-домена, можно ожидать, что именно HI(CC)-домен вовлечен в связывание нуклеиновой кислоты. В связи с этим проверили содержание нуклеиновой кислоты в препаратах Lon-H₆-протеазы и ее делеционной формы, полученных в настоящей работе.

Содержание ДНК в препаратах обоих ферментов, определенное по соотношению оптического поглощения (A_{260}/A_{280}) в растворах Lon-H₆ и Lon-dHI(CC) (1.09

и 1.06 соответственно), не превышало 5%. Связанную с ферментами нуклеиновую кислоту выделяли из препаратов методом фенол-хлороформной экстракции. Обработка экстрактов бензоазой (неспецифическая нуклеаза, Sigma) привела к исчерпывающему гидролизу мишеней, что подтверждает их принадлежность к нуклеиновым кислотам. В то же время оба экстракта оказались устойчивыми к обработке РНКазой А. Эти результаты свидетельствуют о том, что и полноразмерная, и делеционная формы Ec-Lon выделяются из клеток *E. coli* в виде комплексов с ДНК.

Фенол-хлороформные экстракты анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием (рис. 5). Установлено, что препараты и интактной Lon-H₆-протеазы, и ее делеционной формы Lon-dHI(CC) содержат значительное количество связанной ДНК в виде фрагментов размером около 150 п.н.

Кроме того, оказалось, что обе формы Lon-протеазы способны к связыванию дополнительного количества нуклеиновой кислоты. Показано, что инкубация плазмидной ДНК с Lon-H₆ или с Lon-dHI(CC) приводит к образованию комплексов ДНК-фермент и к изменению подвижности нуклеиновой кислоты при электрофорезе в агарозном геле (рис. 6).

Из представленных данных следует, что HI(CC)-домен Ec-Lon-протеазы либо не участвует во взаимодействии с нуклеиновой кислотой, либо не является определяющим в этом взаимодействии.

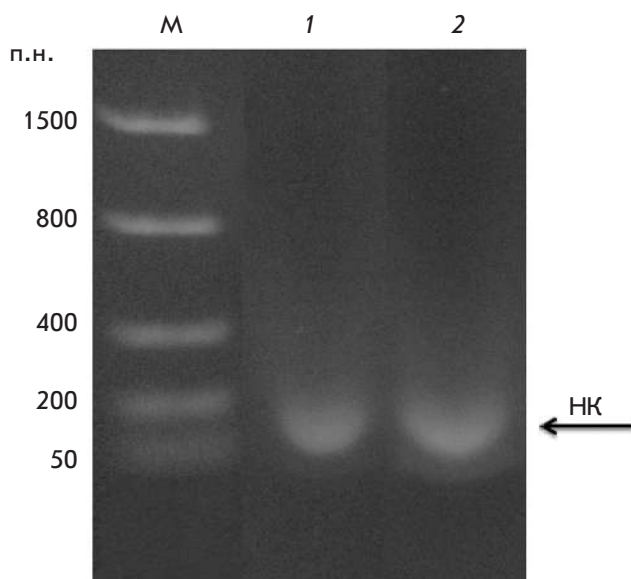


Рис. 5. Фенольные экстракты образцов Lon-H₆ (1) и Lon-dHI(CC) (2). М – маркеры, НК – нуклеиновая кислота

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно полученным данным характеристический инсерционный HI(CC)-домен Eс-Lon-протеазы необходим для формирования и корректного функционирования АТР-азного центра фермента. В то же время HI(CC)-домен не влияет на формирование пептидазного центра Eс-Lon, однако имеет исключительное значение для взаимодействия активных центров. Следует подчеркнуть, что, несмотря на сохранение активности пептидазного центра, делеция HI(CC)-домена приводит к полной утрате ферментом протеолитической активности, что свидетельствует о важности этого домена для связывания и гидролиза белкового субстрата Eс-Lon-протеазой.

Интересно, что делеционные формы Lon-протеазы из *Brevibacillus thermoruber* (Bt-Lon) [24], утратившие фрагменты (246–259) или (248–256) в coiled-coil(CC)-области, теряют все три вида активности. Противоречие в оценке возможности функционирования пептидазного центра в делеционных формах LonA-протеаз, выявленное при сопоставлении результатов настоящей работы и данных [24], может быть обусловлено использованием разных субстратов при тестировании пептидазного центра – тиобензилового эфира N-защищенного трипептида (Suc-Phe-Leu-Phe-SBzl) в нашей работе и 4-метокси-β-нафтиламида менее специфичного трипептида (Glt-Ala-Ala-Phe-MNA) – в [24].

Обнаруженный нами интенсивный автолиз Lon-dHI(CC) вызван, как мы полагаем, утратой

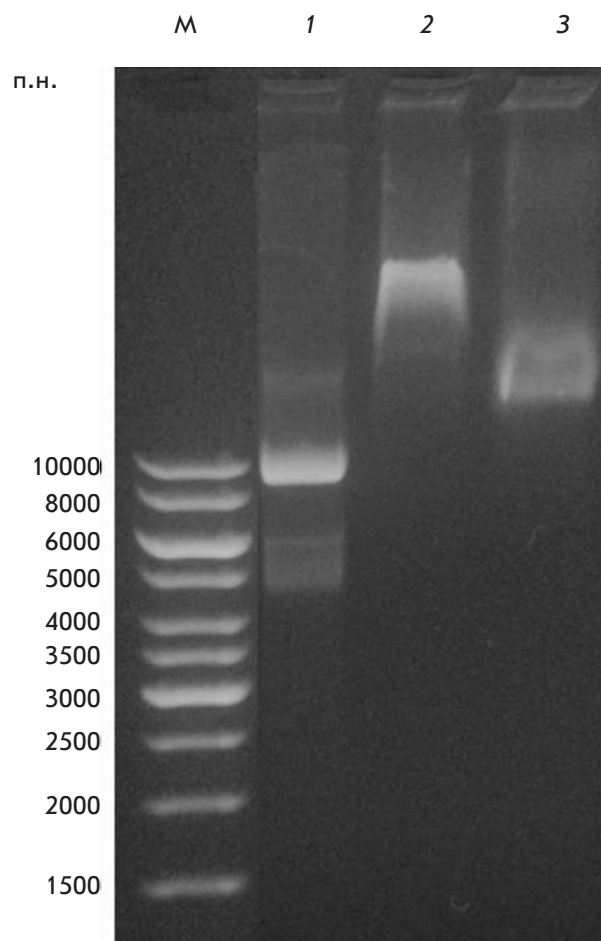


Рис. 6. ДНК-связывающая способность Lon-H₆ и Lon-dHI(CC). Условия эксперимента: 20 мМ Трис-НСI-буфер, рН 7.5; 60 мМ NaCl; 25°C; ДНК (рЕТ28а) – 28 нМ (1–3); Lon-H₆ – 33.9 мкМ (2), Lon-dHI(CC) – 22.2 мкМ (3); М – маркеры

способности к эффективному связыванию нуклеотидов – свойства, которое является стабилизирующим фактором для полноразмерного фермента. Предположение о возможной роли HI(CC)-домена как сайта связывания нуклеиновой кислоты Eс-Lon-протеазой не получило экспериментального подтверждения.

Таким образом, можно считать, что инсерционный HI(CC)-домен Eс-Lon-протеазы необходим для формирования функционально активной структуры фермента и реализации белок-белковых взаимодействий. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman S., Wickner S., Maurizi M.R. // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 815–823.
2. Tyedmers J., Mogk A., Bukau B. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. P. 777–788.
3. Mogk A., Haslberger T., Tessarz P., Bukau B. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. P. 120–125.
4. Lee I., Suzuki C.K. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. P. 727–735.
5. Rotanova T.V., Melnikov E.E., Khalatova A.G., Makhovskaya O.V., Botos I., Wlodawer A., Gustchina A. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 4865–4871.
6. Goldberg A.L., Moerschell R.P., Chung C.H., Maurizi M.R. // *Meth. Enzymol.* 1994. V. 244. P. 350–375.
7. Charette M.F., Henderson G.W., Markovitz A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. P. 4728–4732.
8. Fu G.K., Smith M.J., Markovitz D.M. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 534–538.
9. Lee A.Y.L., Hsu C.H., Wu S.H. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 34903–34912.
10. Liu T., Lu B., Lee I., Ondrovicova G., Kutejova E., Suzuki C.K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 13902–13910.
11. Lupas A.N., Martin J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002. V. 12. P. 746–753.
12. Iyer L.M., Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // *J. Struct. Biol.* 2004. V. 146. P. 11–31.
13. Ротанова Т.В., Мельников Э.Э. // *Биомед. химия.* 2010. Т. 56. С. 412–419.
14. Ротанова Т.В., Дергоусова Н.И., Морозкин А.Д. // *Биоорган. химия.* 2013. Т. 39. С. 309–319.
15. Андрианова А.Г., Куджаев А.М., Серова О.В., Дергоусова Н.И., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2014. Т. 40. С. 673–681.
16. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
17. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
18. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование.* / Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
19. Bencini D.A., Wild J.R., O'Donovan G.A. // *Anal. Biochem.* 1983. V. 132. P. 254–258.
20. Castillo M.J., Nakajima K., Zimmerman M., Powers J.C. // *Anal. Biochem.* 1979. V. 99. P. 53–64.
21. Lee A.Y.L., Tsay S.S., Chen M.Y., Wu S.H. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 834–844.
22. Мельников Э.Э., Цирульников К.Б., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2000. Т. 26. С. 530–538.
23. Куджаев А.М., Андрианова А.Г., Серова О.В., Архипова В.А., Дубовцева Е.С., Ротанова Т.В. // *Биоорган. химия.* 2015. Т. 41. С. 579–586.
24. Chir J.L., Liao J.H., Lin Y.C., Wu S.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 382. P. 762–765.

УДК 612.017.1:57.041

Влияние различных эффекторов на бактериолитическую активность интерлейкина-2 человека и лизоцима куриного яйца

П. А. Левашов^{1*}, Д. А. Матолыгина¹, Е. Д. Овчинникова¹, Д. Л. Атрошенко¹, С. С. Савин¹, Н. Г. Белогурова¹, С. А. Смирнов¹, В. И. Тишков^{1,2*}, А. В. Левашов¹

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

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

*E-mail: levashov@yahoo.com; vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 14.12.2016

Принята к печати 22.02.2017

РЕФЕРАТ Изучено влияние различных веществ на бактериолитическую активность интерлейкина-2 и лизоцима куриного яйца. Показано, что глицин и лизин не влияют на активность интерлейкина-2. Влияние этих аминокислот на лизоцим характеризуется колоколообразной зависимостью с максимумом при 1.5 и 18 мМ для глицина и лизина соответственно. Аргинин и глутамат активируют и интерлейкин-2, и лизоцим, проявляя концентрационную зависимость, близкую к гиперболической. Ароматические аминокислоты практически не влияют на активность обоих белков. Ароматические амины триптамин и тирамин активируют интерлейкин-2, но ингибируют лизоцим. Пептидные антибиотики действуют на интерлейкин-2 и лизоцим сходным образом с максимумом в области микромолярных концентраций. Таурин практически не влияет на интерлейкин-2 и лизоцим. Милдронат не влияет на лизоцим, но активирует интерлейкин-2, максимальный эффект достигается при концентрации эффектора 3 мМ. EDTA в концентрации 0.15 мМ и выше вызывает активацию как интерлейкина-2, так и лизоцима.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериолитическая активность, интерлейкин-2, лизоцим куриного яйца.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-2 – цитокин, играющий важную роль в регуляции иммунной системы, используется как лекарственное средство при различных онкологических заболеваниях [1, 2]. Сравнительно недавно было обнаружено, что интерлейкин-2 обладает бактериолитической активностью [3–6], физиологическая роль которой еще не установлена. Показано, что субстратная специфичность интерлейкина-2 отличается от специфичности лизоцима куриного яйца [3–6]. Однако известны микроорганизмы, на которые действуют и интерлейкин-2, и лизоцим. С целью более точного выявления потенциальных эффекторов мы сравнили влияние на активность интерлейкина-2 и лизоцима различных веществ – аминокислот, биогенных аминов, пептидных антибиотиков, EDTA и милдроната. Эти вещества или их аналоги могут присутствовать в биологических системах. В качестве субстрата мы взяли клетки *Escherichia coli*, которые лизируются как интерлейкином-2, так и лизоцимом [3–5]. Изучение характера влияния

различных добавок может в дальнейшем помочь понять механизм бактериолитического действия интерлейкина-2. Понимание особенностей влияния различных веществ на активность интерлейкина-2 и лизоцима может дать ключ к повышению эффективности медицинских препаратов и позволит разработать новые лекарственные средства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: глицин (Fluka, Германия); EDTA (Panreac, Испания); L-лизин (Serva, Германия); тирамин, триптамин, таурин (Acros Organics, США), Трис, MES (Amresco, США); бацитрацин (MP Biomedicals, Германия); полимиксин В, L-триптофан, L-тирозин, L-фенилаланин, лизоцим куриного яйца (Sigma Aldrich, США); NaOH (Merck, Германия); уксусную кислоту («Химмед», Россия); соляную кислоту («Лаверна», Россия); милдронат (2-(2-карбоксилатозетил)-1,1,1-триметилгидразиний) (Cridex, Латвия); L-глутамат натрия (HongMei, КНР); ронколейкин (раствор очищенного интерлей-

кина-2 для внутривенного и подкожного введения (0.25 мг/мл; «Биотех», Россия).

Штамм *E. coli* M109 предоставлен J. Messing (Waksman Institute, New Jersey, США). Клетки выращивали согласно стандартной методике [7]. Суспензию клеток с концентрацией 10^9 КОЕ/мл в растворе 0.15 М NaCl замораживали порциями по 1 мл в жидком азоте. Препарат клеток хранили при температуре -70°C не более 2–3 недель. Клетки размораживали непосредственно перед экспериментом. Размороженную суспензию клеток центрифугировали при 4500 об/мин в течение 5 мин на центрифуге Minispin (Eppendorf, Германия), затем ресуспендировали в буферном растворе для измерения активности.

Бактериолитическую активность (скорость лизиса клеток) измеряли турбидиметрическим методом по уменьшению поглощения суспензии ($-dA/dt$, мин $^{-1}$) [5, 8] на длине волны 650 нм, в данных условиях прямо пропорциональному скорости изменения числа клеток – $d\text{КОЕ}/dt$. Измерения проводили в кюветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0.5 мл. Поглощение растворов измеряли с использованием двухлучевого спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония). Раствор лизоцима в буфере для измерения активности готовили непосредственно перед экспериментом. Готовый раствор интерлейкина-2 использовали без дополнительной обработки, ампулу вскрывали непосредственно перед экспериментом. Измерения проводили при температуре 37°C в буферном растворе 10 мМ MES-Трис-ацетат pH 8.8 для интерлейкина-2 и pH 8.5 для лизоцима. Для удобства сравнения скоростей лизиса клеток во всех экспериментах использовали интерлейкин-2 в конечной концентрации 15 мкг/мл, лизоцим – 0.1 мкг/мл. В спектрофотометрической кювете сначала смешивали буферный раствор и исходную суспензию клеток. При определении скорости лизиса клеток в присутствии фермента подбирали такое количество добавляемой суспензии, чтобы поглощение (A_{650}) в кювете в начальный момент времени было равно 0.43–0.45. В течение 5 мин измеряли изменение фонового поглощения, которое может быть связано с самопроизвольным лизисом клеток без фермента или с их оседанием. Затем в кювету добавляли раствор эффекторов, в течение 5 мин измеряли изменение фонового поглощения, после чего добавляли раствор фермента. В качестве начальной скорости лизиса клеток определяли изменение поглощения в интервале 5–25 с с момента добавления фермента. Значение величины фонового самопроизвольного лизиса (или осаждения) клеток в отсутствие фермента вычитали из значения скорости лизиса в присутствии фермента. Во всех экспериментах фо-

новое изменение поглощения не превышало средней величины погрешности измерения скорости лизиса в присутствии фермента. В условиях данной работы все добавки, кроме ферментов, не изменяли величину фонового лизиса в пределах погрешности эксперимента. Значение pH растворов всех добавляемых веществ доводили при необходимости до 8.8 (8.5) с помощью растворов NaOH или HCl. Эффекты добавок не сводились к влиянию на активность за счет изменения ионной силы при увеличении концентрации эффектора. Не выявлено значимых изменений бактериолитической активности при изменении ионной силы в использованных нами диапазонах [3, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На *рис. 1* представлены зависимости активности лизоцима и интерлейкина-2 от концентрации глицина, лизина, аргинина и глутамата. Из *рис. 1А,Б* видно, что активность интерлейкина-2 не изменяется в присутствии глицина, самой простой природной аминокислоты, и положительно заряженного лизина, тогда как активность лизоцима зависит от концентрации как глицина, так и лизина. В присутствии 2 мМ глицина или 15–18 мМ лизина активность лизоцима достигает максимума, при дальнейшем повышении концентрации активность лизоцима снижается и возвращается к исходным значениям. Таким образом, в присутствии этих двух аминокислот лизоцим и интерлейкин-2 ведут себя по-разному, что может указывать на различия в механизме их действия. Эффект повышения активности лизоцима при добавлении глицина ранее не был описан. Однако известно, что глицин может повышать эффективность различных антимикробных агентов, а также обладает бактериостатическим действием [9]. Различия во влиянии глицина на лизоцим и интерлейкин-2 сложно объяснить. Например, можно предположить, что глицин действует на один из бактериальных поринов, облегчая взаимодействие лизоцима с клеточной стенкой, в то время как в случае интерлейкина-2 данный механизм, по-видимому, не реализуется.

На *рис. 1В* представлены кривые, показывающие как аргинин влияет на бактериолитическое действие лизоцима и интерлейкина-2. Видно, что при концентрации эффектора 10 мМ и выше скорость лизиса клеток обоими белками существенно возрастает. Действие аргинина может определяться сложной совокупностью воздействий как на фермент, так и на клетки. Известно, что аргинин повышает эффективность фармацевтических препаратов на основе лизоцима, препятствуя его агрегации [10]. Следует также отметить принципиальные различия в характере влияния аргинина и лизина на бактерио-

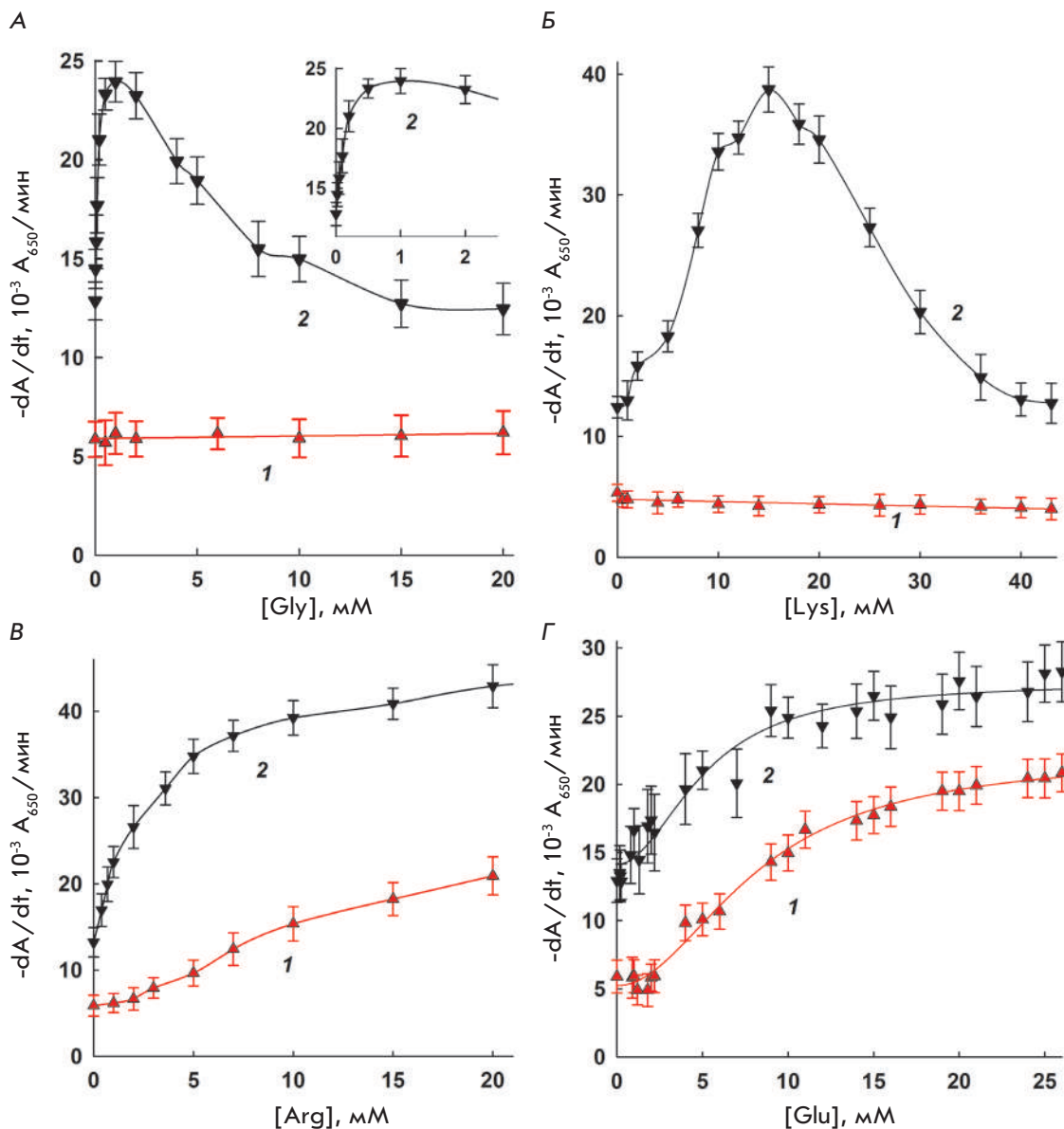


Рис. 1. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок глицина (А), лизина (Б), аргинина (В) и глутамата (Г). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

литическую активность лизоцима и интерлейкина-2. Вероятно, различий в полярности и геометрии положительно заряженных радикалов этих двух аминокислот достаточно для того, чтобы лизин влиял на лизис клеток лизоцимом и не влиял на лизис клеток интерлейкином-2.

Активность и лизоцима, и интерлейкина-2 изменяется сходным образом в присутствии 15 мМ глутамата, увеличиваясь в 2 и 3 раза соответственно (рис. 1Г). При дальнейшем повышении концентрации глутамата активность меняется незначительно. Сходное действие глутамата на активность лизоцима и интерлейкина-2 можно, по-видимому, объяснить тем, что глутамат образует комплекс с положительно заряженными группами на поверхности белков, предотвращая непродуктивную сорбцию ферментов

на клетках, что может существенно изменять эффективные значения параметров бактериолитической активности [11, 12].

На рис. 2 представлены зависимости активности лизоцима и интерлейкина-2 от концентрации ароматических аминокислот. Тирозин, учитывая его низкую растворимость в воде, использовали только в концентрации менее 0.6 мМ. Видно, что в присутствии фенилаланина и триптофана активность лизоцима немного снижается (незначительно превосходит погрешность измерения). В присутствии тирозина активность лизоцима повышается также практически на уровне средней погрешности измерений. Активность интерлейкина-2 в присутствии фенилаланина и триптофана не изменяется. На кривой зависимости активности интерлейкина-2 от кон-

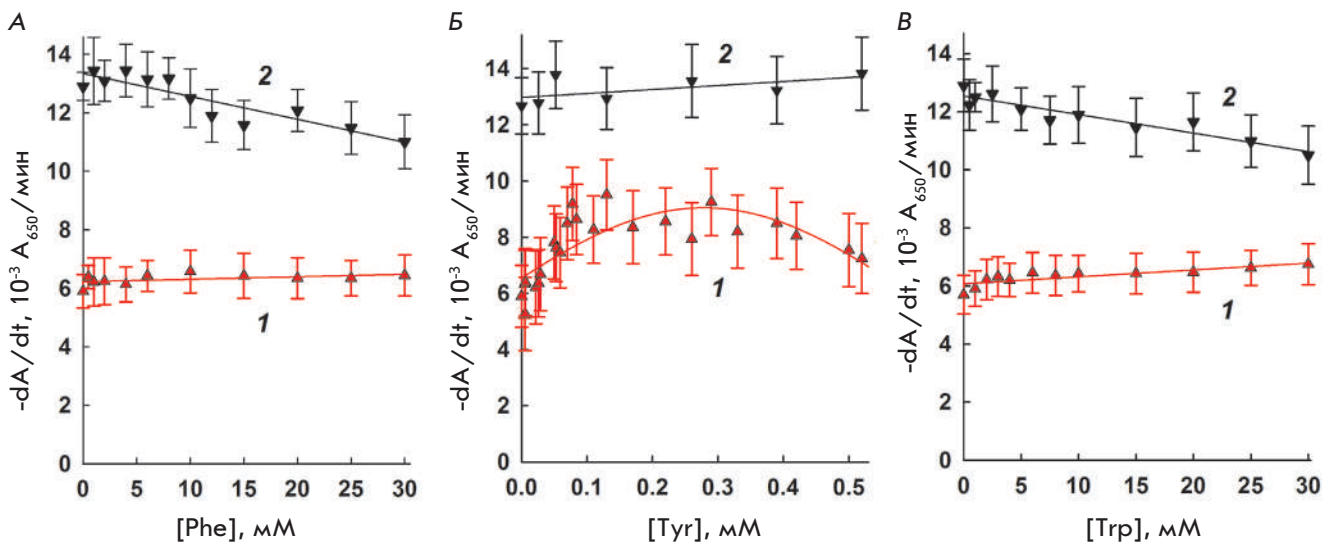


Рис. 2. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок фенилаланина (А), тирозина (Б) и триптофана (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

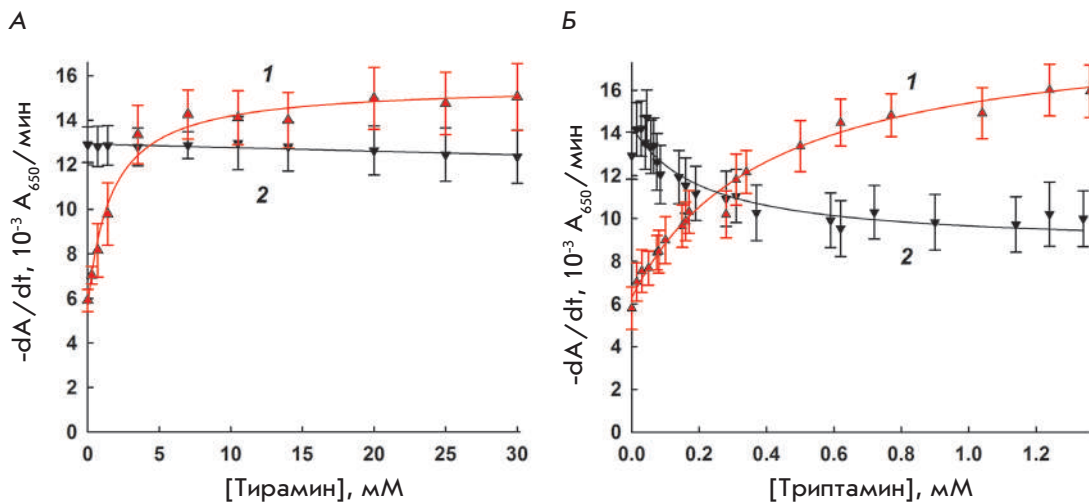
центрации тирозина наблюдается слабо выраженный максимум (увеличение активности на треть от исходной) при концентрации добавки 0.25–0.3 мМ. В целом, можно утверждать, что ароматические аминокислоты незначительно влияют на активность как лизоцима, так и интерлейкина-2. Иная картина, как будет показано далее, прослеживается в действии производных ароматических аминокислот, а именно биогенных ароматических аминов – триптамина и тирамина.

На рис. 3 представлены зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации биогенных аминов тирамина и триптамина, которые формально являются производными тирозина и триптофана. Видно, что интерлейкин-2 активируется, а лизоцим ингибируется обоими биогенными аминами. Однако эффект влияния тирамина на ли-

зоцим слабо выражен. Эти результаты также могут свидетельствовать в пользу принципиальных различий в механизмах действия интерлейкина-2 и лизоцима. Для интерлейкина-2 характерно связывание с различными лигандами за счет гидрофобных взаимодействий [13], поэтому возможно, что тирамин и триптамин связываются с какими-то гидрофобными областями на поверхности интерлейкина-2, препятствуя его непродуктивной сорбции на клетках.

На рис. 4 приведены кривые зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации пептидных антибиотиков полимиксина В и бацитрацина. Видно, что антибиотики сходным образом действуют на активность обоих бактериолитических факторов с максимумом в области 5–7 мкМ. Впрочем, эти пептидные антибиотики обладают цитотокси-

Рис. 3. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок тирамина (А) и триптамина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно



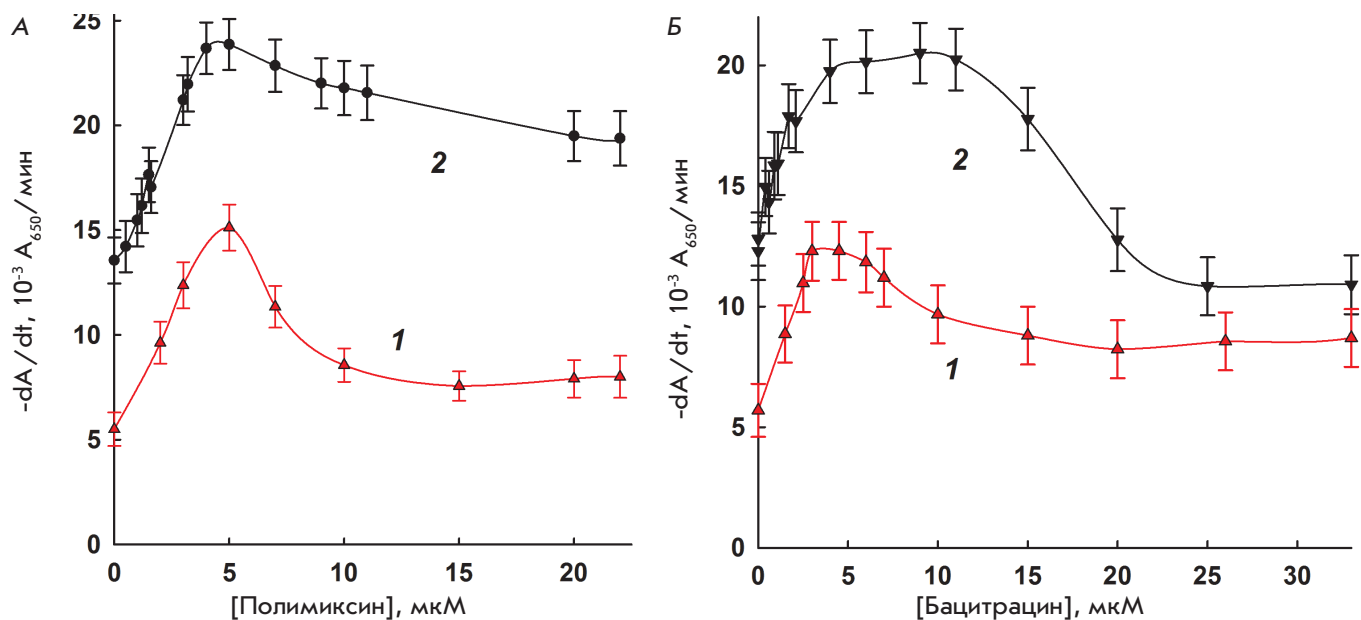


Рис. 4. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок полимиксина В (А) и бацитрацина (Б). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

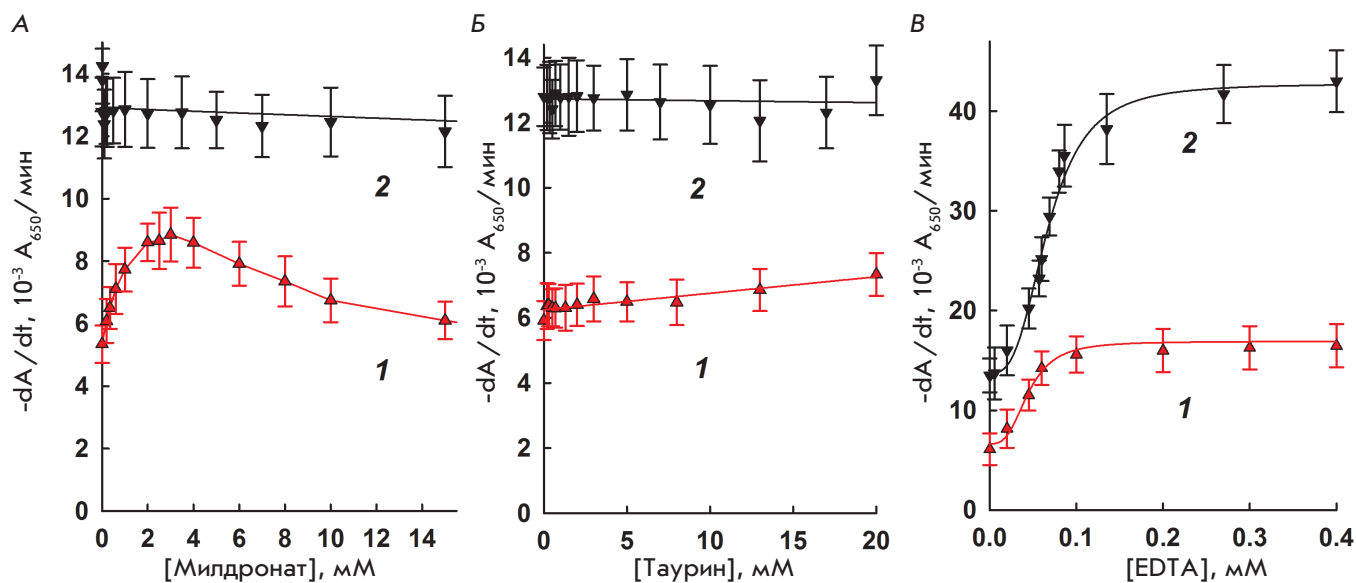


Рис. 5. Зависимость активности интерлейкина-2 (1) и лизоцима (2) от концентрации добавок милдроната (А), таурина (Б), EDTA (В). 37°C, 10 мМ MES-Трис-ацетат, рН 8.8 и рН 8.5 для интерлейкина-2 и лизоцима соответственно

ческим действием на клетки *E. coli* [14, 15], поэтому схожесть эффекта может быть связана с неким воздействием на клетки, а не с влиянием на свойства бактериолитических факторов. Сам антибиотик не вызывает лизис бактерий, но каким-то образом делает их более уязвимыми к действию бактериоли-

тических ферментов, что наблюдали ранее в случае эндолизина из бактериофага SPZ7 [16].

На рис. 5 представлены зависимости активности интерлейкина-2 и лизоцима от концентрации милдроната, таурина и EDTA. Милдронат не изменяет активность лизоцима, но зависимым от concentra-

ции образом увеличивает активность интерлейкина-2 с максимумом при 3 мМ. Физиологическое действие милдроната обычно объясняют структурным сходством с природными биологически активными соединениями, в том числе с γ -бутиробетаином, его предшественником, из которого синтезируется карнитин [17, 18]. Наблюдаемая зависимость активности интерлейкина-2 от концентрации милдроната свидетельствует о прямом образовании комплекса фермента с эффектором. Таурин не влияет на активность ни интерлейкина-2, ни лизоцима. EDTA в концентрации 0.1 мМ и выше усиливает действие обоих бактериолитических факторов, что, как и в случае с пептидными антибиотиками, можно частично объяснить действием на клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видим, влияние добавок на интерлейкин-2 и лизоцим зависит от химической природы добавки, что, по-видимому, может указывать принципиально разные механизмы действия. Нами выявлены вещества, которые активируют изучаемые бактериолитические факторы, что может иметь практическую значимость. Эффекторы могут использоваться для повышения эффективности уже существующих медицинских препаратов, а также для создания новых лекарственных композиций. Например, впервые показано, что глицин, лизин и глутамат непосредственно усиливают бактериолитическую активность лизоцима. И глицин, и лизин, и лизоцим являются широко

распространенными лекарственными средствами, но их совместное действие не изучено. Влияние глутамата и аргинина на активность лизоцима также ранее не изучали. Интерлейкин-2 в настоящее время используют в качестве регулятора иммунной системы, но не бактериолитического фактора, так как его бактериолитические свойства ранее не были известны. Однако не исключено, что антимикробные свойства также сыграли свою роль в ряде случаев, когда эффективность интерлейкина-2 была подтверждена. Интерлейкин-2 применяют как при сепсисе, где роль бактерий очевидна, так и в терапии опухолей, где роль бактерий менее очевидна, однако могут иметь место сочетанные с основным заболеванием бактериальные поражения тканей. Механизм бактериолитического действия интерлейкина-2 пока не установлен, механизм воздействия эффекторов на его активность также требует дальнейшего изучения. Однако становится понятно, что следует обратить пристальное внимание на активацию интерлейкина-2 в присутствии добавок, например, мельдония, аргинина и глутамата. Сочетанное использование данных препаратов может открыть новые горизонты в лечении тяжелых заболеваний. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (проект № 15-14-00012 «Исследование бактериолитической активности интерлейкина-2»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mizui M., Tsokos G.C. // *Curr. Rheumatol. Rep.* 2016. V. 18(11). P. 68.
- Gill D.M., Stenehjem D.D., Parikh K., Merriman J., Sendilnathan A., Agarwal A.M., Hahn A.W., Gupta S., Tantravahi S.K., Samlowski W.E., Agarwal N. // *Ecanermedalscience.* 2016. V. 10. P. 676.
- Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Семёнова М.В., Гитинов М.М., Левашов А.В., Левашов П.А. // *Биоорган. химия.* 2012. Т. 38. № 3. С. 315–323.
- Левашов П.А., Седов С.А., Белогурова Н.Г., Шиповсков С.В., Левашов А.В. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 11. С. 1567–1570.
- Левашов П.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Савин С.С., Захарова Г.С., Гасанова Д.А., Белогурова Н.Г., Овчинникова Е.Д., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56. № 6. С. 359–364.
- Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Морозова О.А., Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Чердынцева Т.А., Савин С.С., Захарова Г.С., Алексеева А.А., Белогурова Н.Г., Смирнов С.А., Тишков В.И., Левашов А.В. // *Acta Naturae.* 2016. Т. 8. № 1(28). С. 107–112.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Lab. Press, 1982.
- Levashov P.A., Sedov S.A., Shipovskov S.V., Belogurova N.G., Levashov A.V. // *Anal. Chem.* 2010. V. 82. P. 2161–2163.
- Minami M., Ando T., Hashikawa S., Torii K., Hasegawa T., Israel D.A., Ina K., Kusugami K., Goto H., Ohta M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. V. 48(10). P. 3782–3788.
- Shah D., Shaikh A.R. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2016. V. 34(1). P. 104–114.
- Матолыгина Д.А., Осипова Е.Э., Смирнов С.А., Белогурова Н.Г., Еремеев Н.Л., Тишков В.И., Левашов А.В., Левашов П.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 2015. Т. 56. № 6. С. 365–371.
- Sedov S.A., Belogurova N.G., Shipovskov S., Levashov A.V., Levashov P.A. // *Colloids Surf. B.* 2011. V. 88. P. 131–133.
- Afonin P.V., Fokin A.V., Tsygannik I.N., Mikhailova I.Yu., Onoprienko L.V., Mikhaleva I.I., Ivanov V.T., Mareeva T.Yu., Nesmeyanov V.A., Li N., Pangborn W.A., Duax W.L., Pletnev V.Z. // *Protein Sci.* 2001. V. 10(8). P. 1514–1521.
- Zong L., Teng D., Wang X., Mao R., Yang N., Hao Y., Wang J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100(11). P. 5045–5057.
- Yu Zh., Qin W., Lin J., Fang Sh., Qiu J. // *Biomed. Res. Int.* 2015. P. 679109.
- Левашов П.А., Попов Д.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л., Морозова О.А., Белогурова Н.Г., Седов С.А., Дятлов И.А., Клячко Н.Л., Левашов А.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. № 9. С. 1299–1304
- Liepinsh E., Konrade I., Skapare E., Pugovics O., Grinberga S., Kuka J., Kalvinsh I., Dambrova M.J. // *Pharm. Pharmacol.* 2011. V. 63(9). P. 1195–1201.
- Beitnere U., Dzirkale Z., Isajevs S., Rumaks J., Svirskis S., Klusa V. // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. V. 745. P. 76–83.

УДК 578.821.5:615.371

Сравнение кандидатных вакцин нового поколения против ортопоксвирусных инфекций человека

Р. А. Максютлов^{1*}, С. Н. Якубицкий¹, И. В. Колосова¹, С. Н. Щелкунов^{1,2*}¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово, Новосибирская обл.²Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

*E-mail: maksrinat@yandex.ru; snshchel@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.07.2016

Принята к печати 23.01.2017

РЕФЕРАТ Отсутствие у населения противооспенного иммунитета, участвовавшие случаи поражения человека ортопоксвирусами и увеличивающиеся риски применения вируса натуральной оспы (*variola virus*, VARV) в качестве агента биотерроризма требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций. Ранее нами были получены поливалентная ДНК-вакцина на основе пяти антигенов VARV и аттенуированный вариант вируса осповакцины (*vaccinia virus*, VACV) с направленной делецией шести генов (VACΔ6). В независимых опытах показано, что трехкратная иммунизация ДНК-вакциной и двукратная иммунизация VACΔ6 обеспечивали защиту мышей от летальной дозы (10 LD₅₀) высокопатогенного для них вируса экстромелии (*ectromelia virus*, ECTV). Цель представленной работы состояла в сравнении противооспенного иммунитета, формируемого при различных схемах иммунизации ДНК-вакциной и VACΔ6. Установлено, что иммунизация мышей поливалентной ДНК-вакциной с последующим бустированием рекомбинантным вариантом VACΔ6 наравне с двукратной иммунизацией VACΔ6 индуцирует наработку VACV-нейтрализующих антител и обеспечивает защиту мышей от дозы 150 LD₅₀ ECTV. Предложенные схемы иммунизации могут быть использованы для разработки стратегии безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус осповакцины, гены вирулентности, ДНК-вакцина, натуральная оспа, протективность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БОЕ – бляшкообразующая единица; VARV – *variola virus* (вирус натуральной оспы); VACV – *vaccinia virus* (вирус осповакцины); CPXV – *cowpox virus* (вирус коровьей оспы); MPXV – *monkeypox virus* (вирус оспы обезьян); ECTV – *ectromelia virus* (вирус экстромелии); LIVP – штамм Л-ИВП вируса осповакцины; ПЦР – полимеразная цепная реакция; LD₅₀ – 50% летальная доза.

ВВЕДЕНИЕ

Род *Orthopoxvirus* семейства Poxviridae включает такие патогенные для человека виды, как вирусы натуральной оспы (*variola virus*, VARV), оспы обезьян (*monkeypox virus*, MPXV), коровьей оспы (*cowpox virus*, CPXV) и осповакцины (*vaccinia virus*, VACV). Массовая вакцинация традиционной вакциной на основе VACV защищала не только от VARV, но и от близкородственных MPXV и CPXV [1]. После 1980 года в результате ликвидации оспы и повсеместного прекращения иммунизации против нее доля населения, чувствительного к VARV и другим патогенным для человека ортопоксвирусам, постоянно увеличивается. Об этом свидетельствуют участвовавшие многочисленные вспышки ортопокс-

вирусных инфекций среди людей, обусловленных такими вирусами, как MPXV, CPXV и VACV [2–6]. Кроме того, VARV рассматривают как возможный агент биотеррористических атак, которые могут иметь катастрофические последствия для всего населения Земли [6]. Отсутствие эффективных противовирусных препаратов и опасность использования классической живой вакцины на основе VACV из-за тяжелых поствакцинальных осложнений требуют разработки современных безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций и схем их применения [7, 8].

Ранее нами на основе штамма LIVP VACV, используемого в Российской Федерации для вакцинации людей, создан рекомбинантный вариант

VACΔ6 с направленным нарушением шести генов, кодирующих гемагглютинин (*A56R*), гамма-интерферонсвязывающий белок (*B8R*), тимидинкиназу (*J2R*), комплементсвязывающий белок (*C3L*), Bcl2-подобный ингибитор апоптоза (*N1L*), и гена *A35R*, контролирующего презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II (МНСII). Показано, что инактивация выбранных генов вирулентности не влияет на репродуктивные свойства VACV на культурах клеток млекопитающих. Штамм VACΔ6 характеризуется значительно меньшей реактогенностью и нейровирулентностью и большей иммуногенностью по сравнению с исходным штаммом LIVP. При двукратном подкожном введении мышам рекомбинантный вариант VACΔ6 индуцирует появление достоверно более высокого уровня вируснейтрализующих антител, чем родительский штамм LIVP, и обеспечивает полную защиту мышей от высокопатогенного для них вируса экстремелии (*ectromelia virus*, ECTV), что не наблюдали в данной модели при использовании принятого в качестве противооспенной вакцины штамма LIVP [9, 10].

Другим независимым подходом к вакцинопрофилактике оспы, реализованным нами ранее, стала разработка поливалентной ДНК-вакцины на основе смеси рекомбинантных плазмид, содержащих под контролем промотора цитомегаловируса гены пяти вирионных белков VARV – A30, F8, M1, входящих в состав поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов, и A36 и B7, расположенных на оболочке внеклеточной формы вируса. При трехкратной внутрикожной иммунизации поливалентная ДНК-вакцина вызывала наработку вируснейтрализующих антител и обеспечивала полную защиту мышей от инфицирования ECTV в дозе 10 LD₅₀ [11–13].

Для повышения эффективности противооспенной вакцинации помимо разработки принципиально новых вакцинных препаратов перспективным представляется сочетание различных типов вакцин, которые смогут дополнять друг друга и вызывать широкий и устойчивый иммунитет [14]. Подобная стратегия гетерологической вакцинации (*prime-boost*), в рамках которой для праймирования иммунной системы предлагается использовать субъединичную вакцину (ДНК-вакцину), а для последующей бустерной вакцинации – аттенуированный вариант VACV, считается перспективной.

В данной работе сравнивали противооспенный иммунитет, формируемый при двукратной иммунизации различными комбинациями поливалентной ДНК-вакцины и высокоаттенуированного штамма VACΔ6.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бактерии, вирусы, культуры клеток

В работе использовали *Escherichia coli* XL2-blue, штамм VACΔ6 [10], штамм LIVP VACV (производный штамма Lister, полученный в Институте вирусных препаратов, Москва) и штамм K-1 ECTV из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», перевиваемую культуру клеток почки африканской зеленой мартышки 4647 [15] из коллекции клеточных культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», культивируемую на питательной среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров.

Поливалентная ДНК-вакцина

Набор рекомбинантных плазмид на основе векторной плазмиды pсDNA3.1, несущей гены пяти антигенов VARV – A30, F8, M1 поверхностной мембраны внутриклеточных вирионов, A36 и B7 оболочки внеклеточной формы вируса под контролем промотора цитомегаловируса, был получен ранее [11–13]. Плазмидные ДНК нарабатывали в клетках *E. coli* в препаративном количестве и очищали с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию плазмидной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе Ultrospec 3000 pro (GE Healthcare Life Sciences, США).

Наработка и очистка вирусов

Монослой клеток линии 4647, выращенный на культуральных матрасах с ростовой поверхностью 175 см² (объем 650 мл), инфицировали VACV (штамм VACΔ6 или LIVP) с множественностью заражения 1 БОЕ/кл. Вирус инкубировали на среде ДМЕМ с 2% эмбриональной сыворотки коров в течение 48 ч при температуре 37°C до полного цитопатического действия, затем получали криолизат (три цикла замораживания-оттаивания) инфицированных клеток, обрабатывали его на ультразвуковом дезинтеграторе типа MSE 500 мощностью 22 кГц 2–3 раза по 10–15 с. От клеточного дебриса освобождались низкоскоростным центрифугированием (10 мин при 4000 g). Супернатант центрифугировали в течение 1.5 ч при 30000 g. Осадок вируса ресуспендировали в 4 мл физиологического раствора. Инфекционный титр вируса определяли безагарозным методом бляшек в монослой клеток 4647.

Изучение иммуногенности и протективности

В работе использовали мышей линии Balb/c (самки, вес 14–16 г, возраст 5–6 недель) из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Мышей объединяли в группы по 10 особей. Мышей иммунизировали

поливалентной ДНК-вакциной внутривенно и подкожно смесью плазмид pcDNA-A30, pcDNA-A36, pcDNA-M1, pcDNA-F8 и pcDNA-B7 (по 50 мкг каждой плазмиды, суммарная доза 250 мкг/100 мкл на мышь). Иммунизацию проводили подкожно штаммами VACΔ6 или LIVP в количестве 10⁷ БОЕ/100 мкл на мышь. Мышам контрольной группы вводили равный объем физиологического раствора, на котором готовили разведения вируса. Иммунизацию проводили дважды с интервалом 21 сут согласно табл. 1.

Через 19 сут после второй иммунизации у предварительно наркотизированных мышей отбирали пробы крови из ретробульбарного венозного сплетения, инкубировали их при 4°C в течение 24 ч для формирования фибринового сгустка, центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g. Объединяли препараты сывороток одной группы и прогревали при 56°C в течение 30 мин. Титр VACV-нейтрализующих антител определяли на культуре клеток 4647 согласно [16], используя последовательные пятикратные разведения сывороток, которые смешивали с VACV штамм LIVP в рабочем разведении 50 БОЕ/лунку. Эффективность нейтрализации рассчитывали относительно числа бляшек в лунках без сывороток как -lg от наибольшего разведения сыворотки, при котором достигается 50% нейтрализация VACV.

Через 21 сут после второй иммунизации животных в состоянии легкого эфирного наркоза подвергли интраназальной инокуляции высокопатогенным для мышей ECTV в дозе 150 LD₅₀/20 мкл на мышь согласно [17]. Наблюдение вели в течение 14 сут, учитывали количество выживших и погибших мышей.

Анализ данных

Статистическую значимость экспериментальных данных оценивали по *t*-критерию Стьюдента с использованием программы Origin Professional 8.1.10.86. Различия считали статистически значимыми при *P* < 0.05 [18].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сконструированные ранее плазмиды pcDNA-A30, pcDNA-A36, pcDNA-M1, pcDNA-F8 и pcDNA-B7 нарабатывали в клетках *E. coli* в препаративном количестве и очищали с помощью EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя с последующим подтверждением правильности вставок рестрикционным анализом с использованием эндонуклеаз *Asu*NHI и *Hind*III (рис. 1) и секвенирования.

Штаммы VACΔ6 и LIVP вируса осповакцины нарабатывали на культуре клеток 4647, рекомендованной для производства противооспенной вакцины [15], очищали по описанной выше методике, подлинность

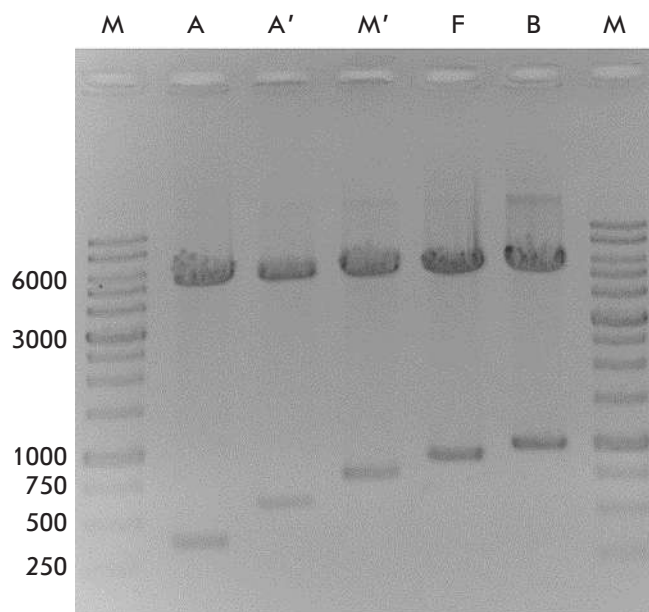


Рис. 1. Электрофоретическое разделение в 1.2% агарозном геле продуктов расщепления рекомбинантных плазмид эндонуклеазами рестрикции *Asu*NHI и *Hind*III. А – pcDNA-A30; А' – pcDNA-A36; М' – pcDNA-M1; F – pcDNA-F8; В – pcDNA-B7 соответственно. М – ДНК-маркер, п.н.

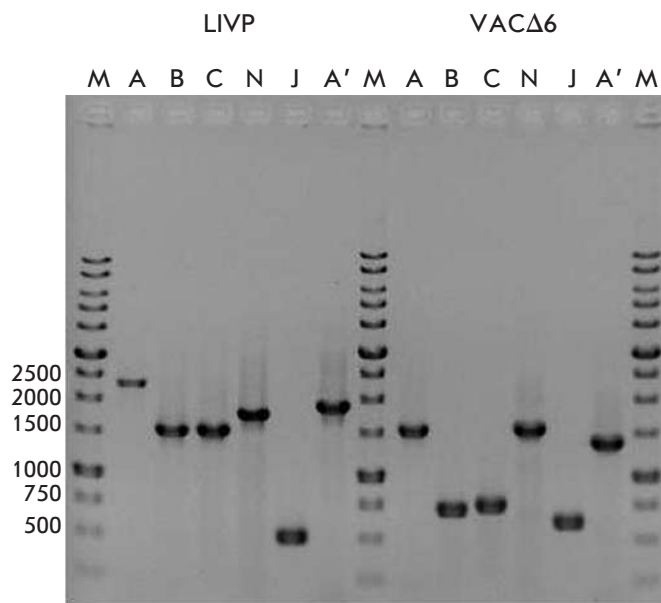


Рис. 2. Электрофоретический анализ в 1.2% агарозном геле фрагментов ДНК исходного родительского клона штамма LIVP VACV и рекомбинантного штамма с делециями шести генов – VACΔ6, полученных с помощью ПЦР с праймерами на гены *A56R* (А); *B8R* (В); *C3L* (С); *N1L* (N); *J2R* (J); *A35R* (А'). М – маркеры длины фрагментов ДНК, п.н.

Таблица 1. Схема проверки иммуногенности и протективности вакцинных препаратов на животных

Группа	Препарат, доза на животное		Проверка протективности, 42 сут
	1-я иммунизация, 1 сут	2-я иммунизация, 21 сут	
DNA&DNA	ДНК-вакцина 250 мкг	ДНК-вакцина 250 мкг	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
DNA&VACΔ6	ДНК-вакцина 250 мкг	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
VACΔ6&VACΔ6	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм VACΔ6 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
LIVP&LIVP	Штамм LIVP VACV 10 ⁷ БОЕ	Штамм LIVP VACV 10 ⁷ БОЕ	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀
К-	Физраствор	Физраствор	Штамм К-1 ECTV, 150 LD ₅₀

Таблица 2. ПЦР-анализ для определения подлинности рекомбинантного варианта VACV

Ген	Праймер, нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Штамм LIVP, п.н.	Штамм VACΔ6, п.н.
A56R	GTGGTATGGGACACCACAAATCCAA ATTAACATTCCTAGAATTAATCCCGCTC	2366	1425
B8R	TCACAAATATGATGGTGATGAGCGA CGTGATATACCCTAGCCATAGGCAT	1555	737
C3L	TCGCGCTTTACATTCTCGAATCT TGTTTCGTGTGTTCTTGCGGTGA	1542	751
N1L	GGGTTGGATCCTTTACACATAGATCTACTACAGGCGGAACA GGGAAAGCTTAATTTGTGAAGATGCCATGTACTACGCT	1784	1431
J2R	ATATGTTCTTCATGCCTAAACGA ATGAAGGAGCAAAAGGTTGTAAC	512	617
A35R	ACGACGGATGCTGAAGCGTGTTATA AAACGATGTTACCAATCGTTTGCTAGGT	1880	1360

штаммов подтверждали с помощью ПЦР-анализа по локусам шести инактивированных генов (табл. 2, рис. 2).

Иммуногенность различных комбинаций (табл. 1) поливалентной ДНК-вакцины и высокоаттенуированного штамма VACΔ6 при двукратной иммунизации оценивали по уровню индуцируемых вируснейтрализующих антител в сыворотках крови мышей, полученных через 21 сут после второй иммунизации. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, комбинация вакцинных препаратов DNA&VACΔ6 вызывает наработку VACV-нейтрализующих антител, уровень которых сопоставим с уровнем антител, индуцируемых двукратной вакцинацией родительским штаммом LIVP. При этом двукратная иммунизация штаммом VACΔ6 индуцировала значимо более высокий уровень вируснейтрализующих антител, что согласуется с полученными нами ранее данными [10].

Трехкратная иммунизация поливалентной ДНК-вакциной или двукратная иммунизация штаммом VACΔ6 обеспечивают, как показано нами ранее,

100% защиту мышей при последующем инфицировании ECTV в дозе 10 LD₅₀/мышь [10, 12]. Поэтому с целью выявления различий между эффективностью использованных схем иммунизации была выбрана принципиально большая разрешающая доза ECTV – 150 LD₅₀/мышь. В результате для трех исследуемых групп выявили частичный защитный эффект при двукратной иммунизации: DNA&VACΔ6, LIVP&LIVP и VACΔ6&VACΔ6 (рис. 4).

Максимальную выживаемость наблюдали в группе лабораторных животных VACΔ6&VACΔ6, двукратно вакцинированных штаммом VACΔ6, и в группе DNA&VACΔ6, в которой праймирование иммунной системы проводили поливалентной ДНК-вакциной, а для последующей бустерной вакцинации использовали аттенуированный вариант VACΔ6. В контрольной группе на 8-е сут, а в группе DNA&DNA на 9-е сут после заражения вирусом экстремелии наблюдали гибель всех животных. Отсутствие полной защиты может объясняться использованием слишком высокой дозы гетерологичного для VACV вируса экстремелии.

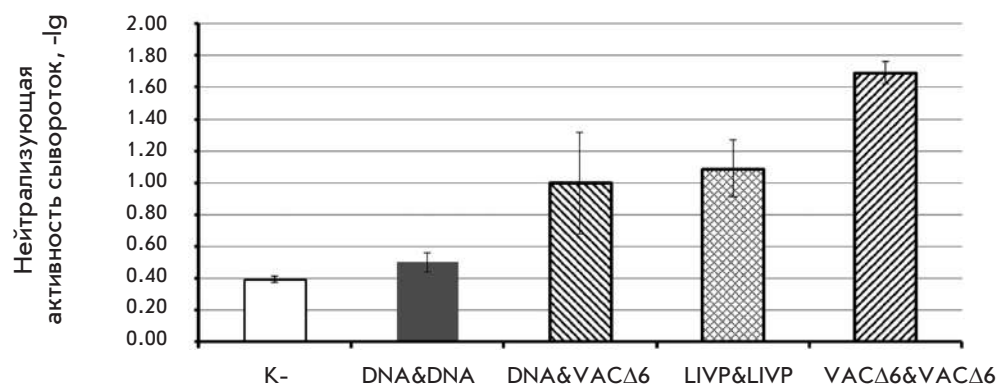


Рис. 3. VACV-нейтрализующая активность сывороток, полученных после двукратной иммунизации ДНК-вакциной, штаммами VACΔ6 и LIVP VACV

ОБСУЖДЕНИЕ

Первым способом защиты людей от опустошительных эпидемий натуральной оспы была вариоляция, т.е. внутрикожное внесение инфекционного материала от больных оспой здоровым людям. Индуцированное таким образом заболевание имело короткий инкубационный период и протекало в относительно легкой форме по сравнению с обычной респираторной передачей вируса от человека к человеку. Смертность при вариоляции составляла 0.5–2% вместо 20–30%, наблюдавшихся во время эпидемий натуральной оспы [19]. Открытие возможности вакцинации людей путем инокуляции вируса оспы коров, а затем вируса осповакцины, привело к значительному снижению риска тяжелых побочных реакций. Во второй половине XX века при использовании для иммунизации VACV смертность составляла 1–25 человек на 1 млн вакцинированных [20]. В группу риска при такой вакцинации попадают прежде всего люди с иммунодефицитом, такие, как пациенты, перенесшие трансплантацию, ВИЧ-инфицированные, лица, принимающие иммунодепрессанты и др. В связи с этим активно разрабатывали модифицированные вакцины на основе VACV с улучшенными характеристиками безопасности, например, в России в конце XX века получили живую вакцину на основе рекомбинантного штамма LIVP VACV, которая была испытана на людях [21].

На сегодняшний день массовая вакцинация от натуральной оспы не проводится, однако, есть ряд категорий людей, которые имеют риск инфицирования натуральной оспой или другими патогенными ортопоксвирусами ввиду особенностей своей работы. Эти категории входят в группу риска, они проходят вакцинацию от оспы в обязательном порядке. В первую очередь, это касается работников, осуществляющих эпидемиологический надзор; медицинский персонал инфекционных отделений больниц; сотрудников вирусологических лабораторий, в которых проводятся

работы с ортопоксвирусами. В случае вспышки натуральной оспы (например, в результате биотеррористической атаки) необходимо будет вакцинировать всех жителей данного региона. Классическая противооспенная вакцина первого поколения на основе штамма LIVP, которая в настоящее время используется для вакцинации, имеет значительное количество противопоказаний и может приводить к различным по своей тяжести осложнениям. Стоит отметить определенную сложность демонстрации формируемого защитного иммунитета против оспы при вакцинации новыми профилактическими препаратами – натуральная оспа была ликвидирована, поэтому в отсутствие эпидемий невозможно протестировать эффективность этих вакцин в отношении естественного заболевания.

Ранее нами были реализованы два независимых подхода к разработке безопасных вакцин против ортопоксвирусных инфекций человека. Был создан высокоаттенуированный вариант вируса осповакцины VACΔ6 с направленным последовательным нарушением шести генов и поливалентная ДНК-вакцина на основе пяти антигенов вируса натуральной оспы. В независимых экспериментах показано, что трехкратная иммунизация ДНК-вакциной и двукратная иммунизация VACΔ6 обеспечивали защиту мышей против летальной дозы (10 LD₅₀) высокопатогенного для них вируса экстремелии [10, 12].

В данной работе сравнили иммунный ответ, который развивается против ортопоксвирусов, при различных схемах иммунизации ДНК-вакциной и VACΔ6. Один из шести генов, удаленных в рекомбинантном варианте VACΔ6, – ген A35R, продукт которого снижает презентацию антигенов главным комплексом гистосовместимости класса II. Поэтому закономерно, что штамм VACΔ6 индуцирует более высокий, чем родительский клон LIVP, уровень VACV-нейтрализующих антител и более эффективно защищает животных от заражения ECTV в дозе

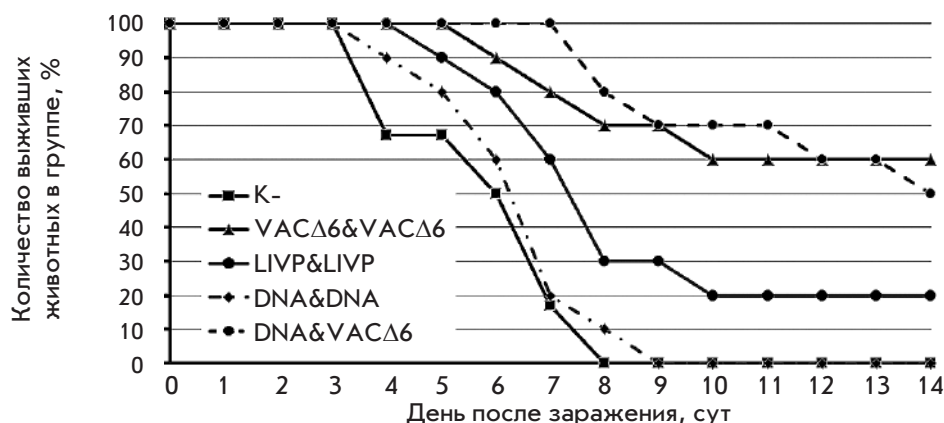


Рис. 4. Динамика гибели мышей, иммунизированных ДНК-вакциной, штаммами VACΔ6 и LIVP VACV, после заражения ECTV в дозе 150 LD₅₀ на мышью

150 LD₅₀. Комбинированная иммунизация ДНК-вакциной и рекомбинантным вариантом VACΔ6 приводила к меньшему уровню вируснейтрализующих антител, чем двукратная иммунизация VACΔ6, однако обеспечивала такой же уровень протективности. Последнее, по-видимому, может объясняться индукцией ДНК-вакциной в большей степени клеточного звена иммунного ответа при первичной иммунизации, также необходимого для эффективной элиминации ортопоксвирусов из организма [22, 23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе для повышения эффективности противооспенной вакцинации применили стратегию гетерологичной вакцинации, в рамках которой для праймирования иммунной системы использовали поливалентную ДНК-вакцину на основе пяти генов VARV, а для последующей бустерной вакцинации – аттенуированный вариант VACΔ6. Уровень индуцируемой при этом протективности был таким же, как в варианте с двукратной иммунизацией штаммом VACΔ6 и превосходил уровень, обусловленный двукратной иммунизацией штаммом LIVP

VACV, используемым в Российской Федерации для вакцинации людей. Предложенные схемы иммунизации могут быть использованы для разработки стратегии безопасной вакцинации против натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций человека. Вариант ДНК-вакцинации с последующей вакцинацией живым аттенуированным вирусом VACΔ6 может рассматриваться как предпочтительный в плане безопасности. Следует отметить, что схема двукратной вакцинации не является оптимальной при проведении экстренной профилактики натуральной оспы, в этом случае предпочтительно однократное введение классической противооспенной вакцины на основе VACV штамм LIVP. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2014 годы)», Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-01326а), Российского научного фонда (проект № 16-15-10101) и бюджетного проекта ИЦиГ СО РАН № 0324-2015-0004.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: KMK Scientific Press Ltd., 1998. 386 с.
2. Stephenson J. // J. Am. Med. Assoc. 2003. V. 290. P. 23–24.
3. Lewis-Jones S. // Curr. Opin. Infect. Dis. 2004. V. 17. P. 81–89.
4. Campe H., Zimmermann P., Glos K., Bayer M., Bergemann H., Dreweck C., Graf P., Weber B.K., Meyer H., Büttner M., et al. // Emerg. Infect. Dis. 2009. V. 15. P. 777–780.
5. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Voinot C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R.N. // Emerg. Infect. Dis. 2009. V. 15. P. 781–784.
6. Shchelkunov S.N. // PLoS Pathogens. 2013. V. 9. e1003756.
7. Shchelkunov S.N. // Vaccine. 2011. V. 29. Suppl. 4. P. D49–D53.
8. Breman J.G., Henderson D.A. // N. Engl. J. Med. 2002. V. 346. P. 1300–1308.
9. Yakubitsky S.N., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 4. P. 113–121.
10. Якубицкий С.Н., Колосова И.В., Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Докл. Акад. наук. 2016. Т. 466. № 2. С. 241–244.
11. Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Рос. иммунол. журн. 2010. Т. 4. № 1. С. 25–32.
12. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Kochneva G.V., Shchelkunov S.N. // J. of Vaccines. 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/618324>.
13. Максютов Р.А., Щелкунов С.Н. // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2011. № 2. С. 30–34.
14. Radosevic K., Rodriguez A., Lemckert A., Goudsmit J. // Expert Rev. Vaccines. 2009. V. 8. P. 577–592.
15. Скарнович М.О., Радаева И.Ф., Вдовиченко Г.В., Нечаева Е.А., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Плясунов И.В., Шиш-

- кина Л.Н., Терновой В.А., Сметаникова М.А. и др. // *Вопр. вирусол.* 2007. Т. 52. С. 37–40.
16. Leparac-Goffart I, Poirier B, Garin D, Tissier M.-H, Fuchs F, Crance J.-M. // *J. Clin. Virol.* 2005. V. 32. P. 47–52.
17. Martinez M.J, Bray M.P, Huggins J.W. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000. V. 124. P. 362–377.
18. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 186 с.
19. Fenner F, Henderson D.A., Arita I, Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and Its Eradication.* Geneva: World Health Organization, 1988. 1460 p.
20. Gurvich E.B. // *Vaccine.* 1992. V. 10. № 2. P. 96–97.
21. Чернос В.И., Челябинов Н.В., Антонова Т.П., Рахилина Л.Е., Унанов С.С., Альтштейн А.Д., Захарова Л.А., Фодор И.И., Бендукидзе К.А., Комаров Ф.И. и др. // *Вопр. вирусол.* 1990. № 2. С. 132–135.
22. Kennedy J.S., Frey S.E., Yan L., Rothman A.L., Cruz J., Newman F.K., Orphin L., Belshe R.B., Ennis F.A. // *J. Infect. Dis.* 2004. V. 190. № 7. P. 1286–1294.
23. Ennis F.A., Cruz J., Demkowicz W.E., Rothman A.L., McClain D.J. // *J. Infect. Dis.* 2002. V. 185. № 11. P. 1657–1659.

УДК 616.379-008.64:577.112.6:615.214

Низкомолекулярный миметик NGF корректирует когнитивный дефицит и депрессивные проявления при экспериментальном диабете

Р. У. Островская*, С. С. Ягубова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: rita.ostrovskaya@gmail.com

Поступила в редакцию 28.09.2016

Принята к печати 20.02.2017

РЕФЕРАТ Коморбидность сахарного диабета с когнитивными нарушениями и депрессивно-подобными состояниями, а также роль дефицита фактора роста нервов (NGF) в патогенезе этих состояний хорошо известна. Нами изучено действие соединения ГК-2 (гексаметилендиамид-*бис*-(N-моносукцинил-глутамил-лизина)), оригинального димерного аналога NGF, на мышей C57Bl/6 со стрептозотоциновым диабетом типа 2. ГК-2, сконструированный ранее в НИИ фармакологии на основе структуры β -изгиба 4-й петли NGF, обладает способностью имитировать эффекты нативного NGF, в том числе нейропротективный. Показано, что ГК-2 как при внутрибрюшинном (в дозе 0.5 мг/кг), так и пероральном (в дозе 5 мг/кг) введении устраняет гипергликемию, вызванную стрептозотоцином (100 мг/кг), восстанавливает число (%) животных, обучившихся в водном лабиринте Морриса, и ослабляет выраженность депрессивно-подобного состояния. Перспективность фармакологической разработки ГК-2 обусловлена сочетанием его антидиабетического эффекта с положительным воздействием на когнитивные функции и антидепрессивные свойства, а также сохранением активности при пероральном введении. ГК-2, как показано ранее, селективно активирует один из двух основных сигнальных путей, путь PI3K/Akt, поэтому можно предположить, что Akt-сигнализации достаточно для поддержания функционирования β -клеток. Наличие у ГК-2 как нейропротективной, так и антидиабетической активности согласуется с фундаментальной концепцией общности механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дипептидный миметик NGF, диабет, депрессия, обучаемость.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; СД2 – сахарный диабет типа 2; NGF – фактор роста нервов (nerve growth factor); BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor); в/б – внутрибрюшинно; *per os* – перорально; ФР – физиологический раствор; СТЗ – стрептозотцин.

ВВЕДЕНИЕ

За несколько десятилетий, прошедших после обнаружения ведущей роли нейротрофических факторов в развитии и поддержании жизнеспособности нейронов [1], получены факты, показывающие их сходную регуляторную активность на уровне ненейронных систем [2]. Одним из важных следствий этих открытий стало понимание значимости нейротрофинов для развития β -клеток поджелудочной железы. Получены важные данные, позволяющие полагать, что подобие факторов роста и дифференцировки определяет сходство между β -клетками поджелудочной железы и нейронами, которые, хотя и происходят из различных линий клеток, но формируются по одной и той же фундаментальной программе развития [3]. Регуляторная роль нейротрофинов в β -клетках поджелудочной железы подтверждена

во многих исследованиях [4, 5]. Установлено, что действие фактора роста нервов (NGF) на β -клетки поджелудочной железы опосредуется TrkA – высокоаффинным рецептором нейротрофинов [6]. NGF обеспечивает неогенез β -клеток не только в фетальный и неонатальный период, но также у взрослых организмов [7]. Удаление NGF из среды культивирования β -клеток [8] или воздействие антител к этому нейротрофическому фактору [9] ведет к усилению их апоптоза. Получены убедительные доказательства снижения пролиферации и/или усиления апоптоза β -клеток за счет снижения уровня NGF [10–12] при сахарном диабете второго типа (СД2).

Вместе с тем, хорошо известны факты коморбидности СД2 с когнитивным дефицитом (замедление скорости информационных процессов, снижение вербальной памяти, концептуализации), риск раз-

вития которого при СД2 существенно выше, чем у здоровых людей. Согласно эпидемиологическим данным, степень этого превышения колеблется от 50 до 150% [13, 14]. Постмортальными исследованиями выявлено снижение содержания NGF во фронтальной коре пациентов, находящихся в фазе, предшествующей развитию болезни Альцгеймера (БА) [15]. Уже в этой фазе наблюдается снижение активности ацетилхолинтрансферазы – фермента, активность которого в холинергических нейронах базальных структур мозга регулируется NGF. Показано, что при легких когнитивных нарушениях снижен уровень рецепторов TrkA в гиппокампе – структуре мозга, ответственной за основные когнитивные функции, в частности память [16]. Атрофия гиппокампа является важным прогностическим признаком углубления когнитивной патологии и перехода легких когнитивных нарушений в БА [17]. Важную роль в этом процессе играет дефицит NGF, поскольку именно этот нейротрофин предотвращает образование β -амилоидного пептида ($A\beta_{1-42}$) [18]. Снижение содержания NGF при когнитивных нарушениях сочетается с повышением уровня его предшественника (proNGF), угнетающего пролиферацию и дифференцировку структур базального мозга и гиппокампа [19]. Сдвиг в соотношении proNGF/NGF в сторону предшественника рассматривается как важнейшая причина холинергического дефицита, ведущего к когнитивной недостаточности [20].

Вероятность развития депрессий и депрессивно-подобных состояний у больных СД2 как минимум вдвое выше, чем в группе лиц без инсулинорезистентности [21]. Коморбидность этих заболеваний, носящая двусторонний характер (усугубление течения диабета депрессией, и течения депрессии – диабетом), является предметом изучения [22, 23]. Наряду с убедительными данными о роли дефицита нейротрофического фактора мозга (BDNF) в патогенезе депрессивных состояний различной этиологии, в том числе при диабете [24], показано, что при депрессиях, как и при диабете, снижена активность NGF, и это считается важным фактором их коморбидности. Результаты метаанализа 21 публикации [25] подтвердили статистически значимое снижение уровня NGF в крови при депрессии, коррелирующее с выраженностью нарушений. Снижение содержания NGF в сыворотке крови предложено рассматривать как биомаркер большой депрессии [26]. Подобное снижение наблюдается и при маниакально-депрессивном психозе [27], и при депрессиях позднего возраста [28]. Постмортальное изучение тканей головного мозга самоубийц выявило почти двукратное снижение экспрессии NGF и более чем трехкратное снижение плотности TrkA [29].

Совокупность приведенных данных показывает, что NGF может использоваться при сахарном диабете типа 2 благодаря способности поддерживать функционирование β -клеток и стимулировать секрецию инсулина, одновременно препятствуя развитию сопутствующих диабету нарушений функций центральной нервной системы. Однако при попытках применения нативного NGF исследователи столкнулись с проблемой неудовлетворительных фармакокинетических свойств этой белковой молекулы (низкая биологическая устойчивость, неспособность в условиях системного введения проникать через биологические барьеры), а также с плейотропностью действия NGF, которая может привести к таким побочным эффектам, как потеря веса и гипералгезия. Вместе с тем, имеются сообщения об эффективности местного применения NGF при трофических язвах диабетического генеза [30]. Что касается системного введения NGF, то клинические испытания (фазы I и II) рекомбинантного NGF выявили тенденцию к благоприятному эффекту у больных диабетической нейропатией, однако при расширении контингента больных в рамках фазы III проявились побочные эффекты при отсутствии терапевтически значимых результатов [31].

Одна из стратегий, направленных на преодоление недостатков нативных нейротрофинов, состоит в создании низкомолекулярных агентов, способных вызывать NGF-подобные терапевтические эффекты при системном введении и свободных от побочных эффектов, свойственных исходному NGF. Описано несколько таких соединений, в частности NGF-миметик непептидной структуры, соединение MT-2 [32] и пептидный NGF-миметик BB14 [33, 34], однако эффекты этих соединений изучены только в системах *in vitro*.

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова на основе структуры β -изгиба 4-й петли NGF создан димерный дипептидный миметик NGF ГК-2 (гексаметилендиамид-бис-(N-моносукцинил-глутамил-лизина)), который проявил высокую нейротропную активность в экспериментах *in vitro*, а также *in vivo* на моделях инсульта, болезней Альцгеймера и Паркинсона при отсутствии побочных эффектов, характерных для нативного NGF. Показано, что ГК-2 активирует TrkA-рецепторы [35–37].

В предварительных опытах на крысах обнаружен антигипергликемический эффект ГК-2 [38]. Исходя из коморбидности диабета с когнитивной недостаточностью и депрессией, мы получили мышей со стрептозотоциновым диабетом и изучили влияние ГК-2, оригинального миметика NGF, на нарушение когнитивных функций и депрессивно-подобное состояние у этих животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57Bl/6 с исходной массой тела 23–28 г, полученных их питомника «Столбовая». Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище (за исключением 16 ч, предшествующих введению стрептозотоцина) и воде. Соблюдали этические правила гуманного обращения с животными, изложенные в директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Дизайн эксперимента

Сахарный диабет типа 2 моделировали внутрибрюшинным (в/б) введением животным стрептозотоцина (СТЗ, Sigma, США) в дозе 100 мг/кг, эффективной для мышей линии C57Bl/6 [39].

Мыши были случайным образом разделены на четыре группы: группа 1 пассивного контроля ($n = 10$), группа 2 активного контроля ($n = 11$), опытные группы 3 ($n = 11$) и 4 ($n = 12$). Мышам группы пассивного контроля на протяжении 31 дня внутрибрюшинно или перорально (*per os*) вводили физиологический раствор (ФР)¹. Животным группы активного контроля в течение 14 дней вводили ФР в/б; на 15-е сут однократно после 16-часового голодания вводили СТЗ в дозе 100 мг/кг, в/б; далее в течение 16 дней продолжали вводить ФР.

Достаточно низкая молекулярная масса (831 Да) соединения ГК-2 делает целесообразным изучение эффекта не только внутрибрюшинного, но и перорального пути введения. Необходимость изучения эффекта перорально вводимого ГК-2 связана с тем, что это соединение планируется в будущем использовать в качестве препарата для длительного клинического применения. Свежеприготовленный раствор ГК-2 (на 0.9% NaCl) вводили 1 раз в день: опытной группе 3 в/б в дозе 0.5 мг/кг, а опытной группе 4 – *per os* в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней. На 15-е сут (через 30 мин после последнего введения ГК-2) животным вводили СТЗ в дозе 100 мг/кг, в/б, натошак; затем ГК-2 продолжали вводить обеим группам мышей в течение 16 дней.

Уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены мышей, измеряли с помощью глюкометра One Touch Ultra (США). Динамику эффекта ГК-2 оценивали с использованием показателя относительной антигипергликемической активности (Ag) по формуле:

$$Ag = \frac{гл.СТЗ - гл.(СТЗ + ГК-2)}{гл.СТЗ - гл.ФР} \times 100\%$$

где гл.СТЗ – уровень глюкозы в крови в группе активного контроля (группа 2), гл.СТЗ + ГК-2 – уровень глюкозы крови в опытных группах 3 или 4, гл.ФР – уровень глюкозы в крови в группе пассивного контроля (группа 1).

Изучение влияния ГК-2 на обучаемость в тесте водный лабиринт Морриса

Через 24 ч после последнего введения мышам ГК-2 (17-е сут после введения СТЗ) с использованием метода водного лабиринта Морриса оценивали пространственное обучение и память [40]. Экспериментальная установка представляла собой бассейн диаметром 150 см со стенками высотой 60 см, который заполняли водой (23–25°C). Бассейн мысленно делили на четыре сектора, в центр одного помещали платформу диаметром 9 см, которая возвышалась над уровнем воды на 1 см.

В первый день животным давали возможность обнаружить видимую платформу. Если мышь не находила платформу в течение 60 с, то ее помещали на платформу на 20 с. Использовали четыре посадки (по одной из каждого сектора). Через 24 ч в воду, предварительно забеленную молоком, в то же место, что и в первый день, помещали платформу, погруженную в воду на 1 см ниже поверхности. Как и в первый день, проводили четыре посадки, по одной из каждого сектора. Аналогичную процедуру повторяли на 3, 4, 5 и 8-й дни. Регистрировали число животных, нашедших платформу в течение 60 с.

Изучение влияния ГК-2 на модели депрессии

На 45-е и 46-е сут после прекращения введения ГК-2 с использованием модифицированного варианта теста Порсолта оценивали депрессивно-подобное состояние (поведенческое отчаяние) [41, 42]. Животных помещали в цилиндрические сосуды диаметром 10 см и высотой 30 см (ООО «НПК Открытая наука»). Сосуды наполняли водой на высоту 20 см (23–25°C). В первый день животное опускали в сосуд на 10 мин, при этом со 2-й по 6-ю мин видеорегилировали поведение. Через 24 ч проводили повторное тестирование в течение 6 мин. Длительность периодов активного плавания и иммобилизации в обоих сеансах определяли с помощью компьютерной программы RealTimer. Согласно определению авторов метода, за активное плавание принимали периоды движения передних лап вверх вдоль стенок цилиндра, а за иммобилизацию – полную неподвижность или совершение незначительных движений для поддержания головы над поверхностью воды. Основным показате-

¹ Не выявлено значимых различий между введением ФР в/б или *per os* на протяжении всего эксперимента, поэтому животные были объединены в одну группу.

лем выраженности депрессивно-подобного состояния в данном тесте была суммарная продолжительность эпизодов иммобилизации за время регистрации.

Ориентировочно-исследовательскую активность и общую подвижность животных оценивали с помощью теста «Открытое поле» за 2-е сут до теста водный лабиринт Морриса. Животных помещали в центр установки и в течение 5 мин регистрировали горизонтальную двигательную активность, число обследованных отверстий и вертикальных стоек.

Вес животных определяли каждые 3 дня.

Порядок введения веществ и проведения поведенческих тестов представлен на *рис. 1А*.

Статистическая обработка

Экспериментальные данные представлены в виде средних значений с указанием средней и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием непараметрического метода – критерия Манна–Уитни (Mann–Whitney U test). Для параметров, исчисляемых в %, применяли критерий χ^2 . Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Наличие у экспериментальных животных гипергликемии, основного признака диабета, подтверждали следующими показателями. Если в группе пассивного контроля содержание сахара в периферической крови мышей составляло 6–7 ммоль/л, то введение мышам линии С57В1/6 СТЗ в дозе 100 мг/кг вело к повышению содержания глюкозы в крови до 16–20 ммоль/л, что близко к значениям, полученным ранее в опытах на крысах [38]. В полном соответствии с антигипергликемическим эффектом ГК-2, наблюдаемым в опытах на крысах, мы отмечаем антигипергликемическое действие соединения ГК-2 у мышей (*рис. 1Б*). Важно подчеркнуть сходство антигипергликемического эффекта у крыс и мышей, например, расчетный показатель Аг на 17-е сут после введения СТЗ крысам составлял 80%, а у мышей на 19-е сут – 90%.

Оценка когнитивных функций, проводимая через 24 ч после последнего введения ГК-2, показала (*таблица*), что если в группе пассивного контроля при повторном тестировании значительно увеличивалось число животных, обнаруживших платформу в течение 60 с, то в группе активного контроля это происходило медленнее (на 4-е и 8-е сут различия между двумя группами были статистически значимыми). Эти результаты соответствуют данным о нарушении когнитивных функций при СТЗ-диабете

[43]. Внутривентрикулярное введение ГК-2 приводило к статистически значимому увеличению числа животных, нашедших платформу, на 2, 4 и 8-е сут обучения по сравнению с животными группы активного контроля. При пероральном введении существенное улучшение обучаемости наблюдали только во второй день тестирования. Следует отметить, что на ранних сроках эксперимента обучаемость мышей при обоих путях введения даже превосходила обучаемость в пассивном контроле. Различия между группами были значимыми и на 3-й, и на 5-й дни тестирования (за исключением 5-го дня в группе перорального введения ГК-2, когда различия между активным контролем и опытной группой не достигали уровня статистической значимости).

Влияние ГК-2 на выраженность депрессивно-подобного состояния оценивали в отдаленные сроки после введения СТЗ (45-е сут), поскольку описана большая длительность депрессивно-подобных проявлений в модели диабета [25].

Сравнение показателей активного плавания и времени иммобилизации в разных группах позволило выявить следующие закономерности (*рис. 2*). У мышей группы активного контроля длительность иммобилизации увеличивалась, а активного плавания снижалась по сравнению с группой пассивного контроля, тогда как в/б введение ГК-2 уменьшало время иммобилизации и увеличивало время активного плавания, доводя их до контрольных значений. В усло-

Обучаемость мышей в водном лабиринте Морриса (процент животных, нашедших платформу за 60 с)

Группа	2-й день	4-й день	8-й день
Группа 1 Пассивный контроль (ФР)	14.3%	85.7%	100%
Группа 2 Активный контроль (СТЗ, 100 мг/кг)	9.09%	54.54% *	72.7% *
Группа 3 ГК-2, 0.5 мг/кг в/б + СТЗ	27.3% *#	72.7% *#	90.9% *#
Группа 4 ГК-2, 5 мг/кг per os + СТЗ	50% *#	50% *	100% #

Статистическую значимость различий оценивали с помощью критерия χ^2 .

* $p < 0.05$ относительно группы пассивного контроля (ФР).

$p < 0.05$ относительно группы активного контроля (СТЗ).

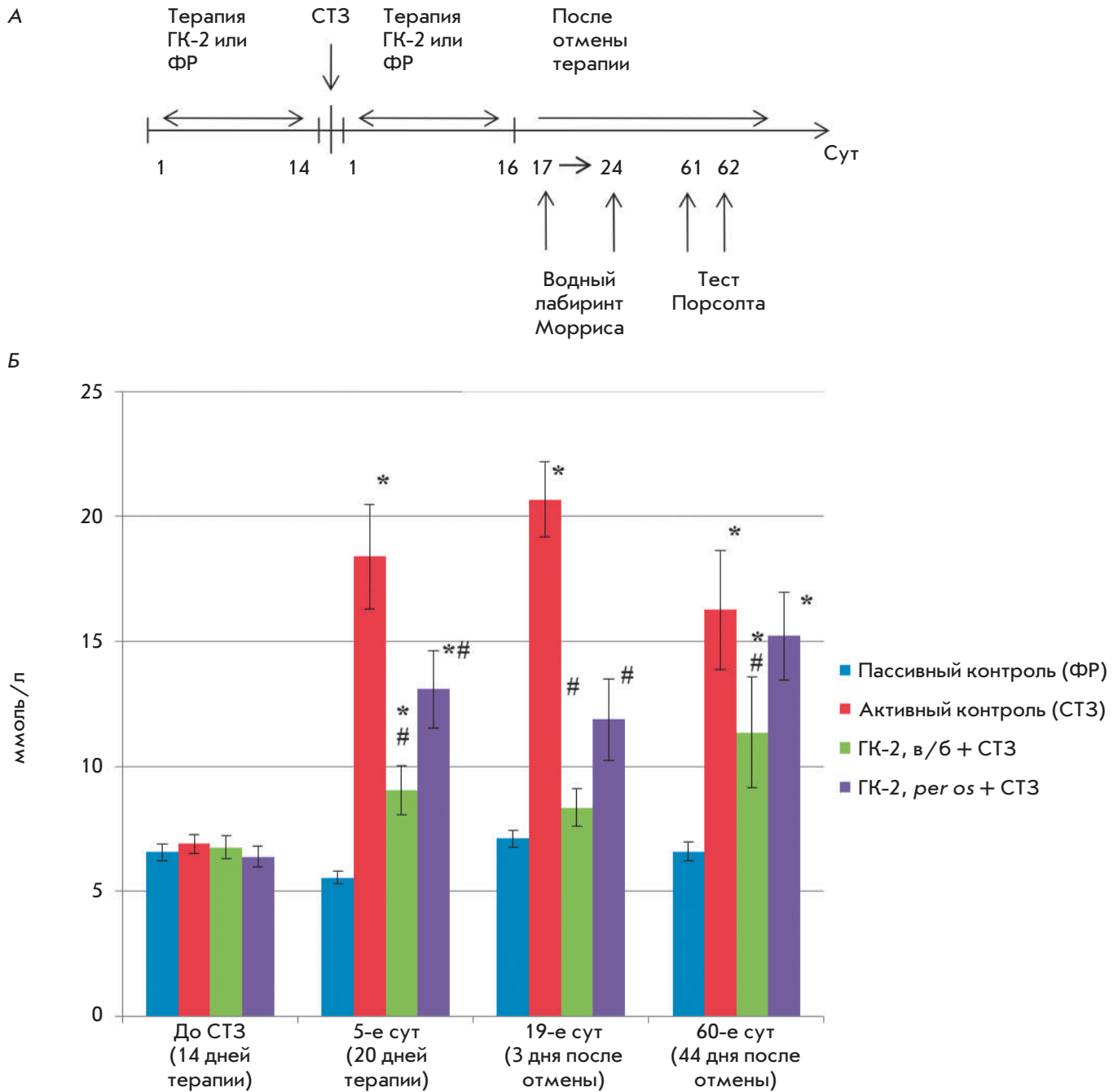


Рис. 1. Дизайн эксперимента (А) и динамика уровня гипергликемии (ммоль/л) у мышей C57Bl/6 (Б) в группах пассивного контроля (ФР + ФР), активного контроля (ФР + СТЗ 100 мг/кг, в/б + ФР), опытной группы 3 (ГК-2 0.5 мг/кг, в/б + СТЗ 100 мг/кг, в/б + ГК-2 0.5 мг/кг, в/б) и опытной группы 4 (ГК-2 5 мг/кг, per os + СТЗ 100 мг/кг, в/б + ГК-2 5 мг/кг, per os). Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий оценивали с помощью теста Манна-Уитни. * $p < 0.05$ относительно группы пассивного контроля (ФР). # $p < 0.05$ относительно группы активного контроля (СТЗ)

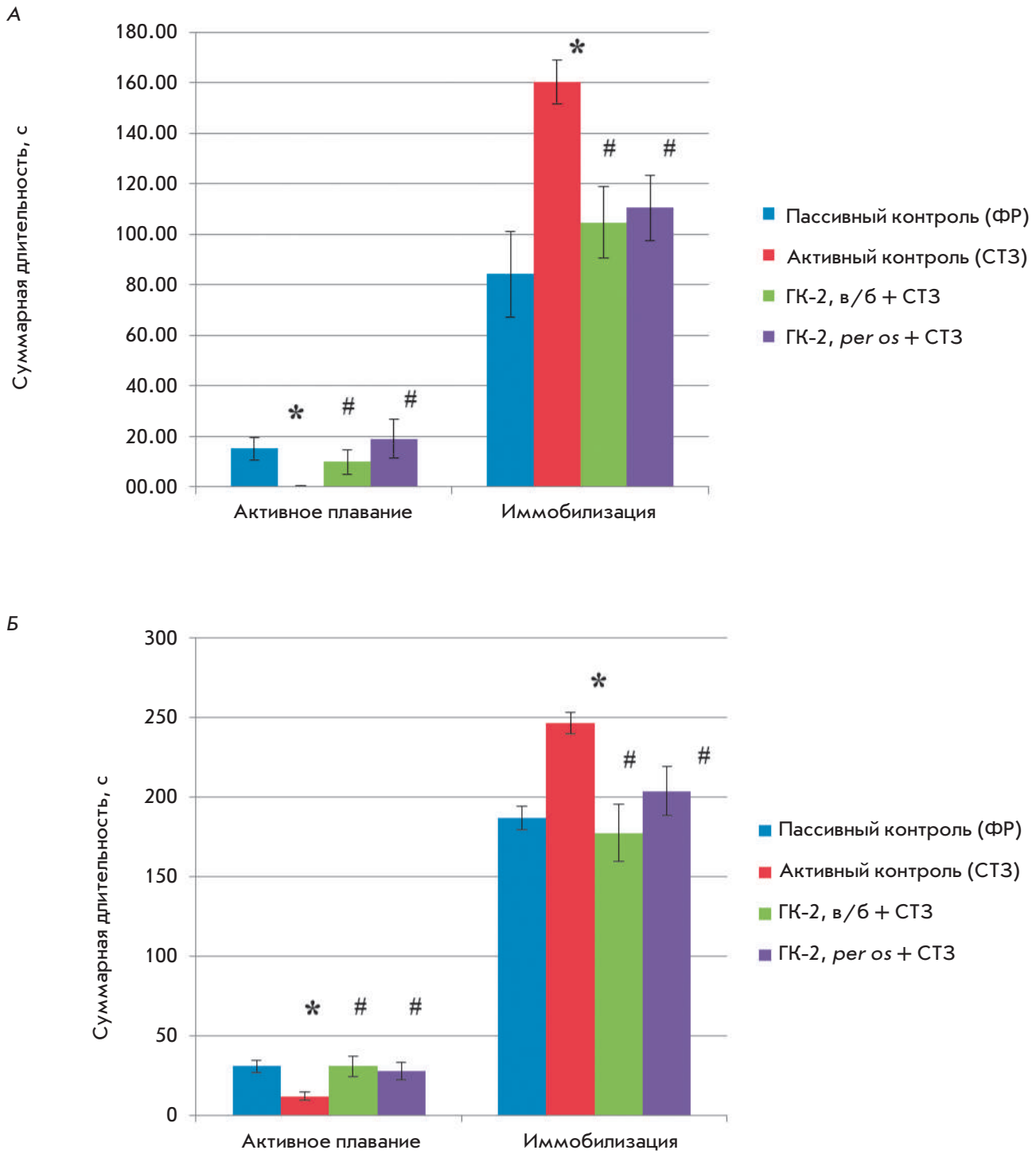


Рис. 2. Показатели депрессивно-подобного состояния мышей C57Bl/6: суммарное время активного плавания и иммобилизации (с) на 61-е (А) и 62-е (Б) сут после введения СТЗ. Обозначения серий и показатели статистики такие же, как на рис. 1Б

виях перорального введения выраженность эффекта ГК-2 была такой же, как при в/б введении.

На второй день наблюдали аналогичные закономерности: увеличение времени иммобилизации и уменьшение времени активного плавания в группе активного контроля, ГК-2 снижал степень депрессии как при в/б, так и при пероральном введении.

Для объяснения полученных результатов нужно было понять, не связаны ли нарушения поведения, вызванные стрептозотоцином, с ухудшением общего состояния животных – снижением двигательной активности и уменьшением массы тела. Чтобы ответить на этот вопрос за 2-е сут до теста водный лабиринт Морриса провели тест «Открытое поле», в котором не выявили изменений ориентировочно-исследовательской активности и общей подвижности у животных, которым вводили СТЗ. ГК-2 при обоих режимах введения также не влиял на эти показатели. Показано, что, в отличие от группы пассивного контроля, в которой масса тела животных нарастала в течение всего эксперимента (10.5% по отношению к исходному уровню на момент тестирования в водном лабиринте Морриса и 16.7% к выполнению теста Порсолта), в группе активного контроля наблюдалось кратковременное маловыраженное снижение веса к моменту обучения в водном лабиринте (-6.7%) и прибавка в весе к моменту оценки депрессивно-подобного состояния (1.8%). Соединение ГК-2 ослабляло этот эффект СТЗ как при внутрибрюшинном (-2 и 4.6% соответственно), так и при пероральном введении (1 и 10% соответственно). Таким образом, полученные данные позволяют исключить изменение общего состояния животных как причину вызванных СТЗ нарушений поведения и их нормализацию на фоне действия миметика NGF.

ОБСУЖДЕНИЕ

На мышях C57Bl/6 мы воспроизвели известную модель сахарного диабета с характерными поведенческими проявлениями [25, 43] и впервые описали способность ГК-2, низкомолекулярного миметика фактора роста нервов, устранять эти нарушения поведения. Известно, что в развитии дефицита NGF при диабете основную роль играет снижение его образования из предшественника, proNGF, вследствие вызванного гипергликемией окислительного стресса [44, 45], который приводит к подавлению активности протеаз и сдвигу соотношения proNGF/NGF в сторону предшественника, способствующего, в отличие от зрелого NGF, апоптозу инсулинпродуцирующих клеток (рис. 3).

Стрептозотоцин способствует образованию свободных радикалов, алкилирует ДНК [46]. Введение СТЗ полностью воспроизводит не только характер-

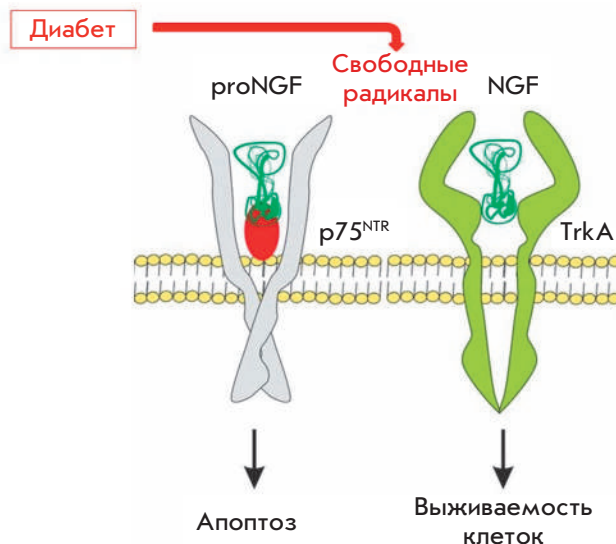


Рис. 3. NGF синтезируется из предшественника (proNGF). NGF связывается с TrkA, и это активирует сигнальные пути выживания β-клеток. Вызванная диабетом гипергликемия ведет к окислительному стрессу, который, в свою очередь, снижает активность протеаз и сдвигает соотношение proNGF/NGF в сторону предшественника, способствующего, в отличие от зрелого NGF, апоптозу инсулинпродуцирующих клеток (модифицировано из [19, 48])

ное для диабета снижение содержания NGF [47], но также и повышение содержания proNGF [48]. Экспериментально показано, что степень повышения уровня proNGF и снижения зрелого NGF и фосфорилированных TrkA-рецепторов коррелирует с выраженностью когнитивного дефицита [49]. Сдвиг в соотношении proNGF/NGF в сторону предшественника считается важнейшей причиной холинергического дефицита, ведущего к когнитивной недостаточности [20].

ГК-2, подобно нативной молекуле NGF, активирует TrkA-рецепторы и ослабляет токсические эффекты H_2O_2 [35]. Кроме того, он снижает содержание малонового диальдегида в крови диабетических мышечей [50]. На основании этих данных можно предположить, что антигипергликемический эффект ГК-2 обусловлен как его прямым влиянием на рецепторы NGF, так и способностью устранять токсическое действие свободных радикалов, что может нормализовать образование NGF из предшественника.

Экспериментально воспроизведен не только основной метаболический эффект СТЗ – гипергликемический, но и его поведенческие эффекты, имитирующие нарушения поведения у больных диабетом,

а именно, нарушение когнитивных функций [14, 16] и развитие депрессивно-подобных состояний [51–53]. Выявлена способность ГК-2 ослаблять выраженность когнитивного дефицита, возникающего в модели диабета. Этот факт согласуется с положительным когнитивным эффектом ГК-2, наблюдаемым в моделях болезни Альцгеймера [54]. Впервые описан антидепрессивный эффект соединения ГК-2. Сочетание антидиабетического эффекта ГК-2 с антидепрессивным действием представляется особенно важным в связи с тем, что классические антидепрессанты не только не ослабляют проявления диабета, но могут повысить вероятность развития диабета [55].

Важно подчеркнуть сохранение активности ГК-2 при пероральном введении, что необходимо для лекарственных средств, используемых при хронических заболеваниях. Сочетание антидиабетического эффекта ГК-2 с его длительным положительным влиянием на когнитивные функции и антидепрессивными свойствами представляется важной дополнительной характеристикой этого соединения. ГК-2 предполагается использовать в терапии последствий инсульта, поскольку известно о коморбидности инсульта и диабета, а также о высокой частоте развития когнитивного дефицита и депрессивных расстройств в постинсультном периоде [56].

Ранее было показано [57], что активируя TrkA, ГК-2, миметик NGF, селективно активирует только один из двух основных сигнальных путей – путь PI3K/Akt, вовлеченный в нейропротективные эффекты нейротрофинов [58]. Данные о антидиабетической активности ГК-2 позволяют предположить, что Akt-сигнализации достаточно для поддержания функционирования β -клеток. Значение этих данных состоит прежде всего в том, что они могут способствовать появлению новых представлений о механизмах развития диабета и станут фундаментом

для разработки противодиабетических средств, осуществляющих цитопротекцию β -клеток. Наличие у ГК-2 как нейропротективного, так и антидиабетического эффектов находится в согласии с ранее высказанной фундаментальной концепцией общности механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы [59] и вытекающего из этой концепции положения о целесообразности изучения возможных антидиабетических свойств у нейропротективных веществ, устраняющих дефицит нейротрофических факторов [60].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе воспроизведены эффекты СТЗ: гипергликемический, амнестический и депрессивно-подобный. Выявлена способность ГК-2, димерного аналога 4-й петли фактора роста нервов, оказывать антигипергликемический эффект, ослаблять выраженность возникающего в модели диабета когнитивного дефицита, впервые выявлено антидепрессивное действие соединения. Сочетание антидиабетического эффекта с положительным влиянием на когнитивные функции и антидепрессивными свойствами, а также сохранение активности при пероральном введении определяют перспективность исследования ГК-2.

В свете полученных ранее в НИИ фармакологии данных о выраженной нейропротективной активности ГК-2 антидиабетическую активность этого соединения можно рассматривать как важный аргумент в пользу фундаментальной концепции общности механизмов регуляции функций нейронов и β -клеток поджелудочной железы. ●

*Работа выполнена при частичной поддержке
Российского научного фонда
(проект № 14-15-00596).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Levi-Montalcini R. // Science. 1987. V. 237. P. 1154–1162.
2. Yamamoto M., Sobue G., Yamamoto K., Terao S., Mitsuma T. // Neurochem. Res. 1996. V. 21. № 8. P. 929–938.
3. Polak M., Scharfmann R., Seilheimer B., Eisenbarth G., Dressler D., Verma I.M., Potter H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 12. P. 5781–5785.
4. Rosenbaum T., Vidaltamayo R., Sanchez-Soto M.C., Zentella A., Hiriart M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 7784–7788.
5. Gezginci-Oktayoglu S., Karatug A., Bolkent S. // Diabetes Metab. Res. Rev. 2012. V. 28. № 8. P. 654–662.
6. Kanaka-Gantenbein C., Dicou E., Czernichow P., Scharfmann R. // Endocrinology. 1995. V. 136. № 7. P. 3154–3162.
7. Paris M., Tourrel-Cuzin C., Plachot C., Ktorza A. // Exp. Diabetes Res. 2004. V. 5. № 2. P. 111–121.
8. Pierucci D., Cicconi S., Bonini P., Ferrelli F., Pastore D., Matteucci C., Marselli L., Marchetti P., Ris F., Halban P., et al. // Diabetologia. 2001. V. 44. № 10. P. 1281–1295.
9. Gezginci-Oktayoglu S., Karatug A., Bolkent S. // Pancreas. 2015. V. 44. № 2. P. 243–249.
10. Faradji V., Sotelo J. // Acta Neurol. Scand. 1990. V. 81. P. 402–406.
11. Vidaltamayo R., Mery C.M., Angeles-Angeles A., Robles-Díaz G., Hiriart M. // Growth Factors. 2003. V. 21. № 3–4. P. 103–107.
12. Chaldakov G.N. // Archives Italiennes de Biologie. 2011. V. 149. № 2. P. 257–263.
13. Biessels G.J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. // Lancet Neurol. 2006. V. 5. № 1. P. 64–74.
14. Li X., Song D., Leng S.X. // Clin. Intervent. Aging. 2015. V. 10. P. 549–560.

15. Hellweg R., Gericke C.A., Jendroska K., Hartung H.D., Cervós-Navarro J. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 1998. V. 16. № 7–8. P. 787–794.
16. Mufson E.J., He B., Nadeem M., Perez S.E., Counts S.E., Leurgans S., Fritz J., Lah J., Ginsberg S.D., Wu J., et al. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012. V. 71. № 11. P. 1018–1029.
17. Devanand D.P., Pradhaban G., Liu X., Khandji A., De Santi S., Segal S., Rusinek H., Pelton G.H., Honig L.S., Mayeux R., et al. // *Neurology.* 2007. V. 68. № 11. P. 828–836.
18. Triaca V., Sposato V., Bolasco G., Ciotti M.T., Pelicci P., Bruni A.C., Cupidi C., Maletta R., Feligioni M., Nisticò R., et al. // *Aging Cell.* 2016. V. 15. № 4. P. 661–672.
19. Budni J., Bellettini-Santos T., Mina F., Garcez M.L., Zugno A.I. // *Aging Dis.* 2016. V. 6. № 5. P. 331–341.
20. Allard S., Leon W.C., Pakavathkumar P., Bruno M.A., Ribeiro-da-Silva A., Cuello A.C. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 6. P. 2002–2012.
21. Kahn L.S., McIntyre R.S., Rafalson L., Berdine D.E., Fox C.H. // *Depression Research and Treatment.* 2011. e862708.
22. Pouwer F., Nefs G., Nouwen A. // *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 2013. V. 42. № 3. P. 529–544.
23. Holt R.I., de Groot M., Lucki I., Hunter C.M., Sartorius N., Golden S.H. // *Diabetes Care.* 2014. V. 37. № 8. P. 2067–2077.
24. Wang J., Zhao X., He M. // *Med. Hypotheses.* 2012. V. 79. № 2. P. 255–258.
25. Chen Y.W., Lin P.Y., Tu K.Y., Cheng Y.S., Wu C.K., Tseng P.T. // *Neuropsychiatric Disease and Treatment.* 2015. V. 11. P. 925–933.
26. Wiener C.D., de Mello Ferreira S., Pedrotti Moreira F., Bitencourt G., de Oliveira J.F., Lopez Molina M., Jansen K., de Mattos Souza L.D., Rizzato Lara D., Portela L.V., et al. // *J. Affect. Disord.* 2015. V. 184. P. 245–248.
27. Barbosa I.G., Huguet R.B., Neves F.S., Reis H.J., Bauer M.E., Janka Z., Palotás A., Teixeira A.L. // *World J. Biol. Psychiatry.* 2011. V. 12. № 3. P. 228–232.
28. Diniz B.S., Teixeira A.L., Machado-Vieira R., Talib L.L., Gattaz W.F., Forlenza O.V. // *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2013. V. 21. № 5. P. 493–496.
29. Banerjee R., Ghosh A.K., Ghosh B., Bhattacharyya S., Mondal A.C. // *Clin. Med. Insights Pathol.* 2013. V. 6. P. 1–11.
30. Tiaka E.K., Papanas N., Manolakis A.C., Maltezos E. // *Int. J. Burns Trauma.* 2011. V. 1. № 1. P. 68–76.
31. Pittenger G., Vinik A. // *Exp. Diabetes Res.* 2003. V. 4. № 4. P. 271–285.
32. Scarpi D., Cirelli D., Matrone C., Castronovo G., Rosini P., Occhiato E.G., Romano F., Bartali L., Clemente A.M., Bottegoni G., et al. // *Cell Death Dis.* 2012. V. 3. e339.
33. Cirillo G., Colangelo A.M., Bianco M.R., Cavaliere C., Zaccaro L., Sarmientos P., Alberghina L., Papa M. // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 30. № 1. P. 223–232.
34. Cirillo G., Colangelo A.M., De Luca C., Savarese L., Barillari M.R., Alberghina L., Papa M. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3. e0152750.
35. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2010. Т. 434. № 4. С. 549–552.
36. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. // *Журн. неврологии и психиатрии.* 2015. Т. 6. С. 63–70.
37. Gudashcheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // *J. Biomed. Sci.* 2015. V. 22. e106.
38. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Поварнина П.Ю., Озерова И.В. // *Патент РФ № 2613314.* 2017. А61К38/05, А61Р3/10.
39. Hayashi K., Kojima R., Ito M. // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. V. 29. № 6. P. 1110–1119.
40. Morris R. // *J. Neurosci. Meth.* 1984. V. 11. № 1. P. 47–60.
41. Porsolt R.D., Bertin A., Jalfre M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 51. P. 291–294.
42. Perona M.T., Waters S., Hall F.S., Sora I., Lesch K.P., Murphy D.L., Caron M., Uhl G.R. // *Behav. Pharmacol.* 2008. V. 19. № 5–6. P. 566–574.
43. Du G.T., Hu M., Mei Z.L., Wang C., Liu G.J., Hu M., Long Y., Miao M.X., Chang Li J., Hong H. // *J. Pharmacol. Sci.* 2014. V. 124. № 4. P. 418–426.
44. Vincent A., Brownlee M., Russell J. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002. V. 959. P. 368–383.
45. Ali T.K., Matragoon S., Pillai B.A., Liou G.I., El-Remessy A.B. // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 4. P. 889–898.
46. Szkudelski T. // *Physiol. Res.* 2001. V. 50. № 6. P. 536–546.
47. Sposato V., Manni L., Chaldakov G.N., Aloe L. // *Arch. Italienne Biol.* 2007. V. 145. P. 87–97.
48. Al-Gayyar M.M., Mysona B.A., Matragoon S., Abdelsaid M.A., El-Azab M.F., Shanab A.Y., Ha Y., Smith S.B., Bollinger K.E., El-Remessy A.B. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. e54692.
49. Terry A.V.Jr., Kutiyanaawalla A., Pillai A. // *Physiol. Behav.* 2011. V. 102. № 2. P. 149–157.
50. Yagubova S., Zolotov N., Ostrovskaya R. // *J. Diabetes Metab.* 2016. V. 7. Suppl 7. P. 76.
51. Kamei J., Miyata S., Morita K., Saitoh A., Takeda H. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2003. V. 75. № 2. P. 247–254.
52. Ates M., Dayi A., Kiray M., Sisman A.R., Agilkaya S., Aksu I., Baykara B., Buyuk E., Cetinkaya C., Cingoz S., et al. // *Biochem. Histochem.* 2014. V. 89. № 3. P. 161–171.
53. Luchsinger J.A. // *J. Alzheimers Dis.* 2012. V. 30. P. 185–198.
54. Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. № 3 (18). С. 88–95.
55. Barnard K., Peveler R.C., Holt R.I.G. // *Diabetes Care.* 2013. V. 36. № 10. P. 3337–3345.
56. Li W.A., Moore-Langston S., Chakraborty T., Rafols J.A., Conti A.C., Ding Y. // *Neurol. Res.* 2013. V. 35. № 5. P. 479–491.
57. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Константинопольский М.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. // *ДАН.* 2014. Т. 456. № 2. С. 231–235.
58. Kaplan D.R., Miller F.D. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000. V. 10. № 3. P. 381–391.
59. de la Monte S.M. // *Front. Biosci. (Elite Ed.).* 2012. V. 4. P. 1582–1605.
60. Островская Р.У., Ягубова С.С. // *Психиатрия.* 2014. № 1 (61). С. 35–43.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» 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 Редакцией 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: $T_{пл}$ – температура плавления, $T_{ф.п}$ – 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 комплексные соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК-РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегия определяет дальнейшую судьбу 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.