

Acta Naturae

ОСНОВЫ
ДИЗАЙНА
ХИМЕРНЫХ
АНТИГЕННЫХ
РЕЦЕПТОРОВ

ПРОТЕОМНЫЕ ПОДХОДЫ
В ИЗУЧЕНИИ
МИКОБАКТЕРИЙ
СТР. 16

ПОИСК ПОВРЕЖДЕННЫХ
УЧАСТКОВ ДНК
СТР. 95





НИАРМЕДИК

НИАРМЕДИК - российская фармацевтическая, биотехнологическая и медицинская компания, основанная в 1989 году. Все направления деятельности ГК НИАРМЕДИК нацелены на улучшения качества здравоохранения в России.

НИАРМЕДИК занимается развитием диагностического, фармацевтического и медицинского бизнеса на основе собственных исследований и переноса передовых зарубежных технологий.

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ НАБОРЫ И ЛАБОРАТОРНОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

- Исследования и разработка
- Производство
- Продажи
- Оборудование для медицинских лабораторий

ФАРМАЦЕВТИКА

- Исследования и разработка
- Производство
- Продвижение
- Продажи

Дополнительную информацию можно получить по тел: +7(495)741-49-89
или на сайте www.nearmedic.ru

Письмо редакторов

Дорогие читатели *ActaNaturae*!
Наступил новый сезон, и мы предлагаем вашему вниманию первый номер журнала за 2017 г.

Как и всегда, мы старались сделать этот номер разнообразным по содержанию и интересным для широкого круга читателей.

Номер открывают три обзора, посвященных актуальным проблемам современной науки о живом, – С.В. Кулемзина и др., рассматривающий дизайн химерных антигенных рецепторов, Ю.А. Беспярых и др. о протеомных подходах в изучении микобактерий и А.М. Петрова и др. о роли холестерина в синаптической дисфункции и патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Как видно, обзоры лежат в рамках самых актуальных направлений биологии.

В номере восемь экспериментальных статей и два кратких сообщения. Как нам кажется, редакции удалось выдержать необходимые пропорции между чисто фундаментальной «академической» наукой и исследованиями, непосредственно связанными с медициной.

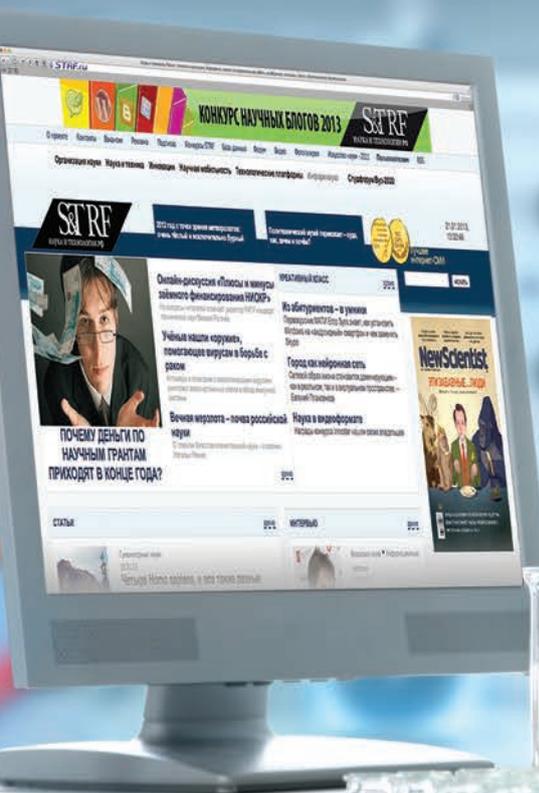
Итак, мы продолжаем работу. Признаемся, на горизонте журнала появились определенные «тучи», но мы надеемся, что объединенными усилиями (в том числе и вашими) эти «тучи» будут в ближайшее время развеяны. Мы очень благодарны компании «Ниармедик», при участии которой мы смогли выпустить этот номер журнала в свет.

Интересного вам чтения! ●

Редколлегия

России нужна наука, науке нужна реформа, вам нужен STRF.ru

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ



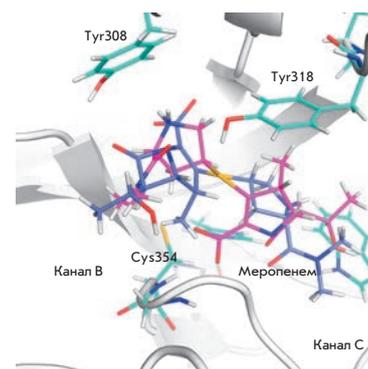
Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

*"На мобильных устройствах с диагональю менее 7"
загружается облегченная версия сайта*

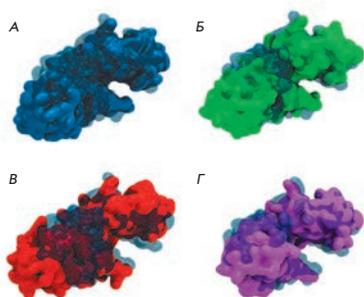
Построение полноатомной модели *L,D*-транспептидазы 2 из *Mycobacterium tuberculosis* для скрининга новых ингибиторов

С. М. Балдин, Н. М. Мисюра, В. К. Швядас

L,D-транспептидаза 2-го типа из *Mycobacterium tuberculosis* играет ключевую роль в формировании неклассических 3-3 поперечных сшивок пептидогликана в клеточной стенке патогена, обуславливая его устойчивость к широкому спектру антибиотиков пенициллинового ряда. Впервые проведенное исследование взаимодействия фермента с тетрапептидным фрагментом пептидогликана клеточной стенки при помощи методов молекулярного моделирования позволило выявить особенности связывания N- и C-концевых фрагментов растущей цепи пептидогликана этим ферментом при образовании 3-3 поперечных сшивок и построить полноатомную модель LdtMt2 для скрининга и оптимизации структуры ингибиторов.



Локализация β-лактамовых антибиотиков в активном центре LdtMt2



Моделирование поверхности мутантных форм phiKZ gp144 в сравнении с нативной формой

Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ

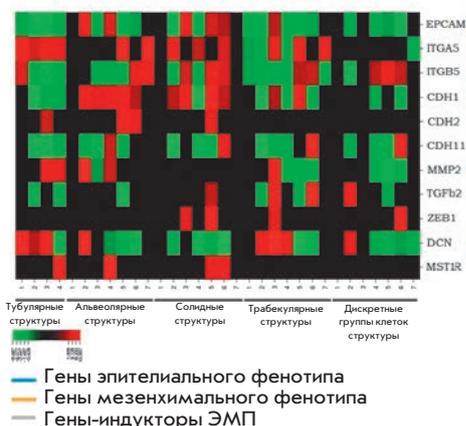
О. В. Чертков, Г. А. Армеев, И. В. Упоров, С. А. Легоцкий, Н. Н. Сыкилинда, А. К. Шайтан, Н. Л. Клячко, К. А. Мирошников

Литические трансгликозилазы – распространенный тип пептидогликанлизирующих ферментов, расщепляющих гетерополимеры клеточных стенок бактерий в процессе клеточного метаболизма или инфекции бактериофагом. Полученные данные подтверждают гипотезу о двух активных центрах у phiKZ gp144 и проясняют механизм действия этого фермента.

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии

Т. С. Геращенко, М. В. Завьялова, Е. В. Денисов, Н. В. Крахмаль, Д. Н. Паутова, Н. В. Литвяков, С. В. Вторушин, Н. В. Чердынцева, В. М. Перельмутер

Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется значительной внутриопухолевой морфологической гетерогенностью. Показано, что внутриопухолевую морфологическую гетерогенность РМЖ можно рассматривать как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии.



Экспрессия генов ЭМП в различных морфологических структурах опухолей молочной железы

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре
Издатель: К.В. Киселев

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. Исагулянец (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
К. Нирхауз (Берлин, Германия),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректурa: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Адрес редакции: 119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1, строение 75Г.
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 марта 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: 1.770

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ОБЗОРЫ

С. В. Кулемзин, В. В. Кузнецова, М. Мамонкин,
А. В. Таранин, А. А. Горчаков

Основы дизайна химерных антигенных
рецепторов 6

Ю. А. Беспятовых, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Протеомные подходы
в изучении микобактерий 16

А. М. Петров, М. Р. Касимов, А. Л. Зефиоров

Холестерин в патогенезе болезней Альцгеймера,
Паркинсона и аутизме: связь с синаптической
дисфункцией 27

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

И. В. Балалаева, Е. А. Соколова, А. Д. Пужихина,
А. А. Брилкина, С. М. Деев

Сфероиды HER2-положительной аденокарци-
номы молочной железы человека как модель
для тестирования противоопухолевых
иммунотоксинов 40

С. М. Балдин, Н. М. Мисюра, В. К. Швядас Построение полноатомной модели L,D-транспептидазы 2 из <i>Mycobacterium tuberculosis</i> для скрининга новых ингибиторов	47
Н. С. Бондаренко, А. Н. Шнейдерман, А. А. Гусева, Б. А. Умарова Пептид пролил-глицил-пролин (PGP) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении	55
Т. С. Геращенко, М. В. Завьялова, Е. В. Денисов, Н. В. Крахмаль, Д. Н. Паутова, Н. В. Литвяков, С. В. Вторушин, Н. В. Чердынцева, В. М. Перельмутер Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии	60
Е. С. Филоненко, М. В. Шутова, Е. А. Хомякова, Е. М. Васина, О. С. Лебедева, С. Л. Киселев, М. А. Лагарькова Дифференцировка плюрипотентных клеток человека в мезодермальные и эктодермальные производные не зависит от типа репрограммированных изогенных соматических клеток	73
Е. А. Цветков, Н. Н. Потапьева, К. В. Большаков Особенности ответов TRPV1-рецепторов при их активации протонами, капсаицином и их смесью при разных мембранных потенциалах	81
О. В. Чертков, Г. А. Армеев, И. В. Упоров, С. А. Легоцкий, Н. Н. Сыкилинда, А. К. Шайтан, Н. Л. Клячко, К. А. Мирошников Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ	87
Д. А. Яковлев, А. А. Кузнецова, О. С. Федорова, Н. А. Кузнецов Поиск поврежденных участков ДНК метил-CpG-связывающим ферментом MBD4	95

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Л. С. Мельникова, Е. А. Померанцева, В. В. Молодина, П. Г. Георгиев Картирование в энхансере En1A <i>Drosophila melanogaster</i> модулей, обеспечивающих активацию транскрипции и дистанционное взаимодействие с промотором	106
Е. А. Новоселова, О. Б. Рябова, И. А. Ленева, В. Г. Нестеренко, Р. Н. Болгарин, В. А. Макаров Антиретровирусная активность нового производного пиримидил-ди(диазодиспироалкана)	112
Правила для авторов	115

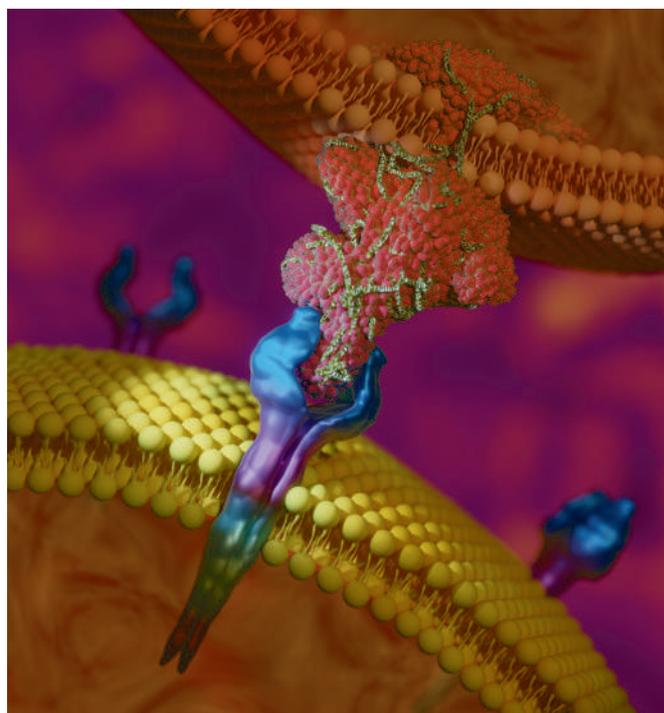


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ: Грант Бородин (см. статью Кулемзина и др.)

УДК 571.27

Основы дизайна химерных антигенных рецепторов

С. В. Кулемзин^{1#}, В. В. Кузнецова^{1#}, М. Мамонкин³, А. В. Таранин^{1,2}, А. А. Горчаков^{1,2*}¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8/2²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2³Center for Cell and Gene Therapy, Baylor College of Medicine, Texas Children's Hospital and Houston Methodist Hospital, Houston, TX, USA

#Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

*E-mail: gorchakov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.06.2016

Принята к печати 17.11.2016

РЕФЕРАТ Химерные антигенные рецепторы представляют собой рекомбинантные трансмембранные молекулы, которые перенаправляют цитотоксические лимфоциты на клетки опухоли. Возможность сравнительно быстро получать опухоль-специфичные Т-клетки с химерными антигенными рецепторами для адоптивной иммунотерапии опухолей делает актуальным изучение структур, которые обеспечивают максимальную функциональность рецепторов *in vivo*. В обзоре приведена информация об основных элементах химерных антигенных рецепторов, а именно об антигенраспознающем модуле, шарнирной области, трансмембранном районе и сигнальных последовательностях. Обсуждается возможное влияние тех или иных участков химерных антигенных рецепторов на их активность *in vitro* и *in vivo*, рассмотрены также альтернативные варианты дизайна химерных антигенных рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адоптивная иммунотерапия, рак, Т-клетки, химерный антигенный рецептор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CAR – химерный антигенный рецептор; TCR – Т-клеточный рецептор; mAT – моноклональное антитело; scFv – одноцепочечный переменный фрагмент антитела; scFv-CAR – химерный антигенный рецептор с антигенраспознающей областью, основанной на scFv; DARPIn – искусственный белок с анкириновыми повторами; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; VHH – рекомбинантные однодоменные антитела верблюдовых (наноантитела); VLR – переменные лимфоцитарные рецепторы круглоротых; MHC – белки главного комплекса гистосовместимости; ITAM – тирозинсодержащий активационный мотив.

ВВЕДЕНИЕ

Современные методы перенацеливания клеток иммунной системы открывают значительные возможности для терапии онко- и аутоиммунных заболеваний. В последние годы наиболее успешно с этой целью используют так называемые химерные антигенные рецепторы (CAR), представляющие собой искусственные молекулы, которые обеспечивают активацию несущих их клеток при контакте с определенным антигеном. Антигенраспознающая часть CAR представлена, как правило, фрагментом моноклонального антитела (mAT), она взаимодействует с опухолевыми детерминантами без участия молекул MHC, а активация обеспечивается сигнальными мотивами во внутриклеточной части CAR. В качестве клеток-носителей CAR обычно используют Т-клетки (далее CAR Т-клетки). В данном обзоре структурные особенности CAR рассмотрены именно в контексте Т-клеток, хотя существуют и альтернативные кле-

точные платформы (NK-клетки, iNKT-клетки, $\gamma\delta$ Т-клетки).

В общем виде схему терапии CAR Т-клетками можно представить следующим образом (рис. 1). В полученные от пациента первичные Т-клетки вводят ДНК-кассету, кодирующую CAR; трансгенные CAR Т-клетки *ex vivo* размножают и возвращают в организм пациента, где они при помощи антигенраспознающей части CAR взаимодействуют с опухолевыми антигенами, а внутриклеточная часть CAR индуцирует активацию Т-клеток, что приводит к лизису опухолевых клеток и пролиферации CAR Т-клеток. Таким образом, этот подход сочетает селективность антител и цитотоксический потенциал Т-лимфоцитов.

Терапию CAR Т-клетками начали применять относительно недавно, однако уже получены многообещающие результаты. В ряде испытаний удалось добиться ремиссии более чем у половины пациентов

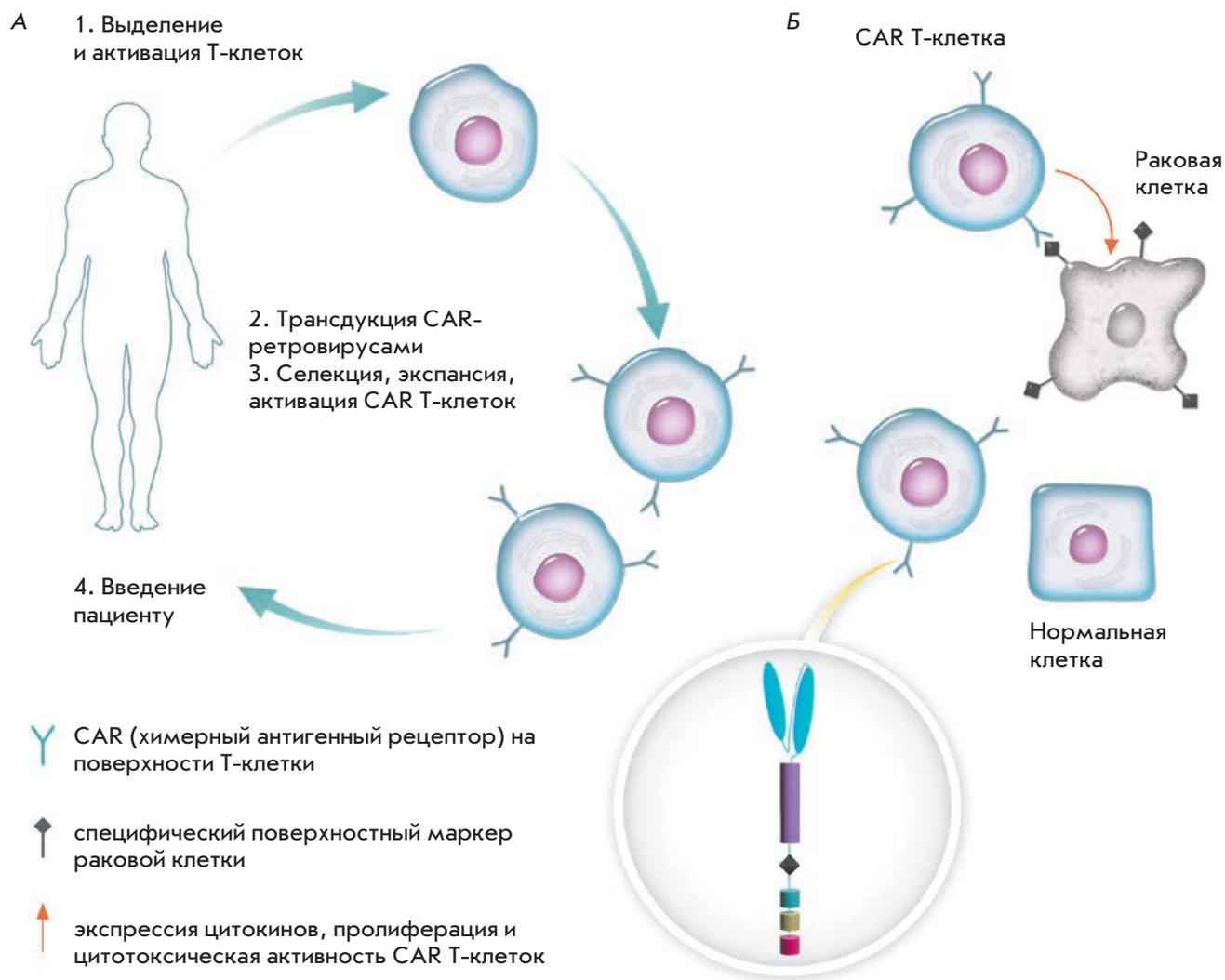


Рис. 1. Принцип адоптивного переноса CAR Т-клеток и функционирование CAR-платформы. При помощи процедуры лейкофереза Т-клетки периферической крови онкобольного отбирают для культивирования *ex vivo*. После трансдукции Т-клеток кодирующими CAR ленти- или гаммаретровирусами отбирают CAR-позитивные клетки, размножают и активируют перед возвращением в организм пациента (А). При встрече CAR Т-клетки и трансформированной клетки, несущей целевой белок-мишень на поверхности, CAR Т-клетки активируются, что приводит к секреции цитокинов, пролиферативной реакции и уничтожению клетки-мишени (Б)

с опухолями, устойчивыми к другим видам терапии [1]. В то же время обозначились и первые трудности, связанные с недостаточной селективностью CAR [2].

СТРОЕНИЕ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Разработанные в середине 1980-х годов CAR представляли собой переменные (антигенсвязывающие) участки антител, слитые с константной частью Т-клеточного рецептора (TCR) [3]. В 1993 З. Эшхар и соавт. модифицировали эту структуру: в качестве антигенраспознающего домена они использовали со-

единенные линкером переменные районы легкой и тяжелой цепей антител (scFv, single chain variable fragment), а трансмембранный домен и сигнальная внутриклеточная последовательность были заимствованы у CD3 ζ или FcR γ , причем весь химерный рецептор состоял из одной полипептидной цепочки [4]. Следующие поколения CAR имели в целом сходную структуру, но несли дополнительные сигнальные домены для повышения Т-клеточной активности. Далее будут рассмотрены основные структурные элементы CAR.

АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩИЙ ДОМЕН CAR

Формат scFv

В подавляющем большинстве случаев в качестве антигенраспознающего модуля CAR используют производные антител в виде scFv [5] (рис. 2). Несомненно, это достаточно удобный формат, поскольку взятые за основу scFv мАТ чаще всего уже хорошо охарактеризованы на доклинических моделях или, более того, разрешены к применению в клинике. Таким образом, при использовании CAR с ранее проверенным scFv риск неожиданной перекрестной реакции CAR Т-клеток со здоровыми тканями гораздо меньше, хоть и не равен нулю. Помимо этого, для многих таких антител получены данные структурного анализа, что позволяет направленно изменять аффинность scFv-CAR в ту или иную сторону. Из недостатков scFv

в качестве антигенраспознающего модуля CAR следует отметить возможность развития иммунной реакции против мышинных и линкерных последовательностей в составе scFv [6] и сложность конструирования полиспецифических scFv-CAR (ввиду большого размера и стабилизации структуры за счет дисульфидных связей) [7]. Кроме того, каркасные последовательности антител в составе scFv могут вызывать лиганднезависимую кластеризацию CAR, что приводит к так называемой тонической сигнализации, неспецифической активации и, как следствие, к раннему истощению и потере функциональности модифицированных Т-клеток. Протестировав склонность нескольких scFv-CAR (против CD19, GD2, CD22, HER2) к самоассоциации, А. Лонг и соавт. обнаружили, что только CD19-специфичный CAR был полностью лишен этого свойства [8].

Опухолевые мишени, против которых созданы CAR

Опробованы в клинике:

BCMA, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD123, CD133, CEA, EGFR, EGFRvIII, EphA2, ErbB-семейство, GPC3, HER2 (ERBB2), FAP, FR α , GD2, Ig κ , IL13R α 2, Mesothelin, Muc1, PSMA, ROR1, VEGFR2

Находятся на доклинической стадии:

B7-H3 (CD276), B7H6 (NCR3LG1), CD5, CD23, CD70, CSPG4, EpCAM, GD3, HLA-A1+MAGE, IL11R α , Lewis-Y, Muc16, лиганды NKG2D, PSCA, TAG72

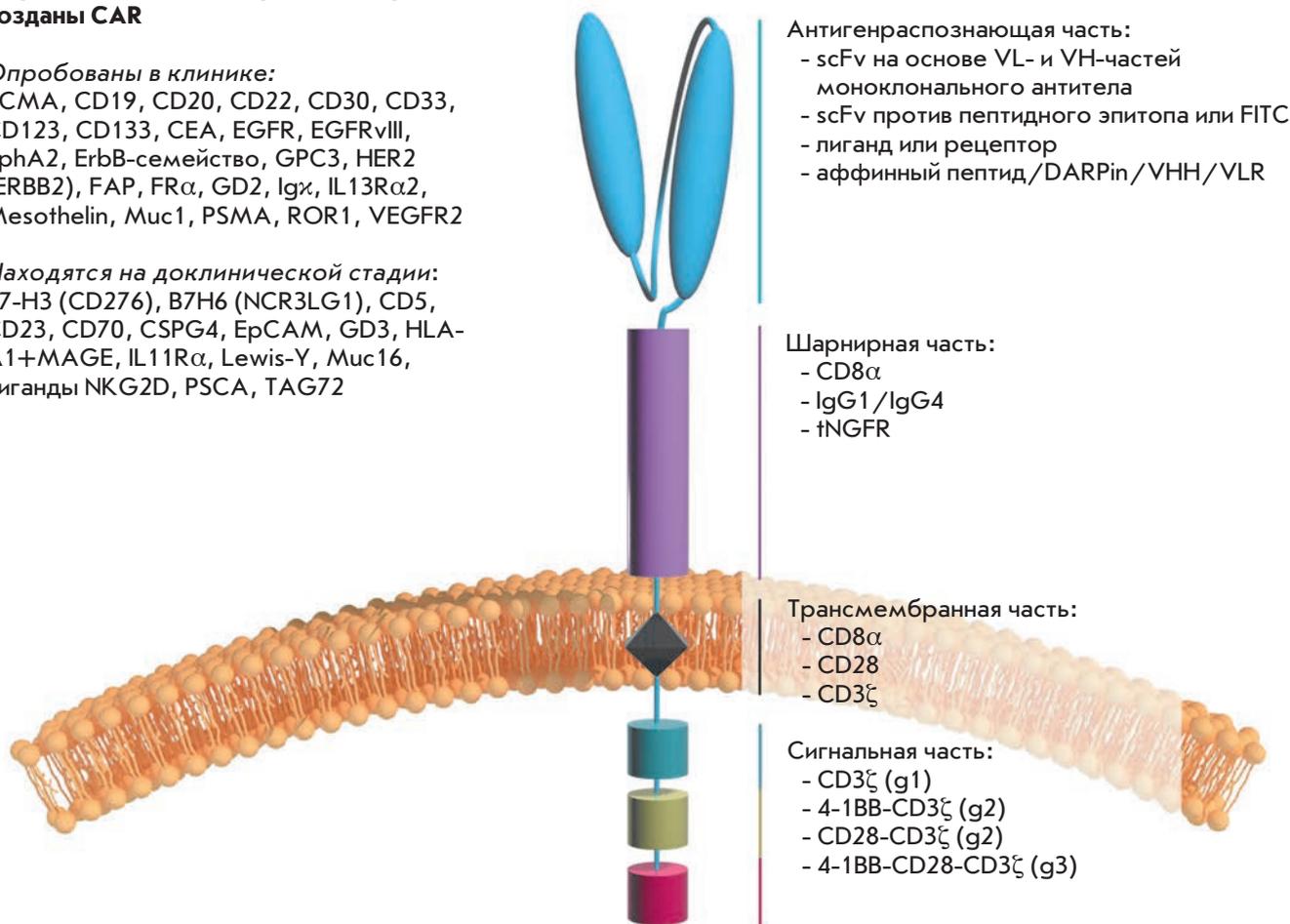


Рис. 2. Организация CAR (в мономерном виде). Рецепторы первого (g1), второго (g2) и третьего (g3) поколений отличаются наличием и числом костимулирующих последовательностей

Естественные лиганд-рецепторные пары

Значительная часть CAR, клинически протестированных к настоящему времени, содержит негуманизированные scFv мыши, в связи с чем возникает риск развития иммунного ответа, который может блокировать CAR-терапию и вызывать анафилактический шок [9]. Отчасти из-за этого активное развитие получили альтернативные варианты дизайна антигенраспознающих модулей CAR, в которых используются естественные, заведомо неиммуногенные пары рецептор/лиганд. Например, известно, что на поверхности клеток глиобластомы, рака яичника и поджелудочной железы зачастую повышена экспрессия рецептора IL13 – IL13R α 2 [10, 11]. Воспользовавшись этой информацией, из последовательностей, кодирующих IL13, удалось создать химерные рецепторы, специфично узнающие IL13R α 2 (впоследствии было показано, что они узнавали и IL13R α 1) [12–15]. Антигенраспознающие районы CAR, специфичные к лигандам NKG2D и молекуле CD70, сконструированы с использованием внеклеточной части NKG2D и CD27 (рецептора CD70) соответственно [16–18]. CAR, узнающие HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4), удалось получить, позаимствовав внеклеточные последовательности изоформ α и β белка нейрегулин-1 [19, 20]. Наконец, созданы CAR с последовательностями CD4 [21–23], VEGF [24], NKp30 [25] в качестве антигенраспознающих модулей (мишени gp120 HIV, VEGFR2 и V7H6 соответственно).

Необходимо отметить, что в целом CAR, основанные на лиганд-рецепторных взаимодействиях, страдают от того же недостатка, что и построенные с использованием scFv: мишени таких рецепторов не являются сугубо опухолеспецифичными и присутствуют, хоть и в меньшем количестве, на поверхности нормальных клеток. Кроме того, как показывает опыт, рецептор или лиганд редко имеют только одного партнера – как правило, их несколько, поэтому, чтобы исключить возможность непреднамеренной активации CAR Т-клеток от встречи с такими молекулами, требуется серьезная структурно-функциональная оптимизация.

Пептидные лиганды

В качестве антигенраспознающих доменов химерных рецепторов успешно используются пептидные лиганды. Несмотря на потенциальную иммуногенность таких пептидов, риск развития иммунного ответа на них ниже, чем на значительно более крупные scFv. Д.М. Дэвис и соавт. получили CAR, содержащий в качестве внеклеточного домена пептидный лиганд T1E, который распознает клетки-мишени, экспрессирующие на своей поверхности рецепторы семейства ErbB [26]. В работе Памейер и соавт. 12-мерный пеп-

тид ВРЕР в контексте CAR позволял успешно распознавать и уничтожать клетки-мишени рака яичника с поверхностной экспрессией интегрина α v β 6 [27]. Схожую схему успешно опробовали и на паре IL11R α /нонапептид IL11 (повышенная экспрессия IL11R α характерна для клеток остеосаркомы, рака желудка и кишечника, молочной и предстательной железы) [28]. Такие «пептидные» CAR пока находятся на стадии «проверки концепции» и доклинических исследований.

Родственным подходом является использование CAR, антигенраспознающая часть которых представлена искусственными анкириновыми повторами (DARPin, designed ankyrin repeat proteins) [29, 30], наноантителами (VNH) [31–34] или VLR (variable lymphocyte receptors) [35]. DARPin – компактные и стабильные белковые модули, отселектированные на высокоаффинное связывание с одной или несколькими мишенями. Так, показано, что HER2-специфичные DARPin-CAR работают (т.е. вызывают активацию и цитотоксическую реакцию) не хуже, чем «классические» scFv-CAR против той же мишени. Описана функциональность VNH и VLR в качестве антигенраспознающих модулей CAR. К важным преимуществам этой системы относится модульность и меньший размер DARPin/VNH/VLR по сравнению с scFv, что, в свою очередь, предполагает возможность создания полиспецифических и/или поливалентных CAR, узнающих несколько мишеней. Тем не менее декларируемая низкая иммуногенность DARPin/VNH/VLR-CAR пока не показана и может представлять определенную проблему при переходе к клиническим испытаниям.

Универсальные антигенраспознающие модули

Известно, что популяция опухолевых клеток, как правило, гетерогенна по поверхностным маркерам-мишеням, в связи с чем CAR Т-клетки могут распознавать их с разной эффективностью: они не будут уничтожать те клетки, экспрессия целевой мишени на которых снизилась или вовсе отсутствует. Таким образом, разумно создавать CAR Т-клетки, специфичность которых относительно легко изменить, используя богатый арсенал имеющихся мАТ. К настоящему времени опубликовано три варианта дизайна так называемых универсальных антигенраспознающих модулей CAR.

В первом варианте в качестве антигенраспознающей части используется димер авидина курицы [36] – белка, который с высокой аффинностью связывается с биотином и биотинилированными молекулами. Введение мышам таких универсальных CAR Т-клеток и биотинилированных антител против поверхностных антигенов опухолевых клеток-мишеней

приводит к эффективному и специфическому уничтожению этих клеток. Более того, последовательное введение биотинилированных антител против других мишеней приводит к соответствующему изменению (перенаправлению) активности CAR T-клеток. Интересно отметить, что свободный биотин, неизменно присутствующий в плазме крови, не препятствует этому эффекту и не вызывает неспецифической аутоактивации CAR T-клеток. Использование CAR с scFv против пептидного неоэпитопа и мишень-специфических антител, содержащих этот неоэпитоп [37], позволяет добиться того же эффекта универсальности.

Во втором варианте универсальных химерных рецепторов использованы scFv, специфически связывающиеся с FITC. Принцип действия антиFITC-CAR T-клеток сходен с описанным выше: такие клетки связываются с мАТ или scFv, конъюгированными с FITC, за счет чего начинают узнавать и уничтожать соответствующие этим антителам клетки [38, 39].

Наконец, в третьей системе универсальных CAR использован эффект мимикрии CAR T-клеток под NK-клетки, способные проявлять антитело-зависимую клеточную цитотоксичность по отношению к перерожденным или зараженным клеткам. Как только с поверхностью клетки-мишени связывается антитело, его Fc-часть узнается CD16a (FcγRIIIa). Известно, что примерно 40% людей являются носителями полиморфизма F158V в CD16a [40], значительно увеличивающего аффинность такого рецептора к антителам [41, 42]. Использование внеклеточной части этого рецептора в качестве антигенраспознающего модуля позволило создать «универсальный» CAR, способный перенаправлять цитотоксическую активность T-клеток в соответствии с вводимыми противоопухолевыми антителами [43–45]. Потенциальной проблемой при применении этого подхода может быть то, что увеличение аффинности CAR к антителам будет неминуемо сопровождаться вытеснением вводимых терапевтических антител свободными антителами плазмы крови. Так это или нет, покажут результаты проводимых в настоящее время клинических испытаний эффективности CD16-CAR T-клеток в сочетании с ритуксимабом (мАТ против CD20) при CD20-положительных неходжкинских лимфомах и хроническом лимфолейкозе.

Таким образом, описанное «универсальное» решение имеет два основных преимущества: а) специфичность CAR T-клеток удобно контролировать (менять при необходимости или сразу вводить несколько антител против разных мишеней); б) такие клетки легко «выключить», просто перестав вводить антитела.

С другой стороны, очевидным препятствием для перехода к клиническим испытаниям пер-

вых двух систем является потенциальная иммуногенность авидина, неоэпитопного пептида и FITC. Возможно, значимость этой проблемы не столь велика, поскольку иммунная система онкологических больных, как правило, находится в крайне угнетенном состоянии. Еще одну проблему представляет ограниченное проникновение антител в разные органы и ткани, что может значительно снижать их эффективную концентрацию в солидных опухолях, т.е. применительно к таким формам рака эти системы, по-видимому, имеют те же недостатки, что и таргетные «антительные» подходы.

Шарнирная область CAR

При взаимодействии T-лимфоцита и антигенпредставляющей клетки между ними формируется иммунологический синапс с расстоянием между мембранами около 15 нм [46]. Это расстояние диктуется структурой TCR и комплекса пептид+MHC, оно определяет закрытую структуру синапса и обеспечивает исключение из него молекул, длина внеклеточной части которых превышает 15 нм. Как оказалось, такое пространственное разделение важно для эффективного запуска каскада фосфорилирования и активации T-клеток [47, 48]. Так, фосфатаза CD45 обладает достаточно крупной внеклеточной частью, и при искусственном укорочении этот белок получает возможность остаться в пределах синапса, что влечет за собой супрессию активационных сигналов [49, 50]. Расстояние между CAR T-клеткой и опухолевой клеткой может играть важную роль в обеспечении адекватной активации эффекторных функций. Поскольку взаимное расположение эпитопа на молекуле-мишени и антигенраспознающей области химерного рецептора в контексте CAR T-клетки задает размер образующегося синапса, становится ясно, почему этот нюанс дизайна может определять, будет ли такой рецептор функциональным или нет [51, 52]. Например, в работе А.А. Хомбах и соавт. было показано, что CAR T-клетки, распознающие дистальный по отношению к мембране эпитоп ракового эмбрионального антигена (CEA), активировались на среднем уровне, тогда как тот же антиген, перенесенный в более проксимальное положение, активировал CAR T-клетки с большей силой [53]. Сходным образом CAR T-клетки с scFv, специфичным к более проксимальному по отношению к мембране эпитопу CD22 (антиген, обильно представленный на нормальных и злокачественных В-клетках), показали высокую противолейкозную активность в отличие от CAR T-клеток, нацеленных на распознавание дистального эпитопа [54, 55]. Эти и некоторые другие примеры ([56], обзор [57]) свидетельствуют о том, что дистально расположенные эпитопы

в целом приводят к формированию синапса большего размера, чем оптимальные 15 нм, в результате чего становится возможным включение в него фосфатаз CD45 и CD148, что, в свою очередь, приводит к ингибированию активационного сигнала.

Таким образом, поскольку положение эпитопа, узнаваемого конкретным scFv, на поверхности клетки-мишени всегда фиксировано, для обеспечения его максимальной стерической совместимости с scFv, а также для создания компактного синапса необходим эмпирический подбор внеклеточного спейсера (шарнирного района) между поверхностью Т-клетки и антигенраспознающим модулем.

В качестве спейсера наиболее часто используют последовательности CD8 α , CD28 и IgG1/IgG4 (hinge-Fc часть) (в единичных работах – CD4, CD7 и IgD) [58–61], обзор [62]. Такой выбор обусловлен тем, что эти последовательности относительно нейтральны, хорошо структурно охарактеризованы и обладают необходимой гибкостью. Тем не менее выяснилось, что CD8 α -шарнир работает не для всех scFv-CAR, Fc-фрагмент IgG биологически далеко не инертен, и нежелательные эффекты спейсера начинают проявляться как только исследования переходят в фазу *in vivo*. Так, показано, что происходит взаимное узнавание клеток с IgG-содержащими химерными рецепторами и клеток, экспрессирующих Fc-рецепторы (макрофагов, моноцитов и NK-клеток). Соответственно IgG-CAR Т-клетки неспецифически возбуждаются в отсутствие антигена и проявляют цитотоксичность по отношению к FcR γ ⁺ клеткам, которые, в свою очередь, активируются и уничтожают CAR Т-клетки, что, разумеется, сказывается на эффективности и безопасности проводимой терапии [63, 64]. Один из способов решения этой проблемы – использование вариантов IgG-шарниров, заведомо неспособных связываться с Fc-рецепторами (с удаленным CH2-доменом или мутированными ключевыми аминокислотными остатками) [63–66].

Интересно, что все используемые варианты шарниров CAR – это последовательности, склонные к гомо- или гетеродимеризации, поэтому не очень ясно, насколько возникающие при этом постоянные лиганднезависимые сигналы (tonic/ligand-independent signalling) от таких рецепторов «помогают» или «мешают» CAR Т-клеткам. По умолчанию считается, что димеризация CAR обеспечивает лучшее удержание CAR на поверхности (обзор [67]). Данные, полученные *in vitro*, указывают на то, что димеризация CAR не влияет существенно на активацию CAR Т-клеток [14, 68, 69], а эксперименты, позволяющие адекватно сравнивать функциональность димеризующихся и недимеризующихся CAR *in vivo*, пока не проведены. Отметим, что относительно

но недавно получены функциональные варианты CAR с шарнирным районом из последовательности NGFR/p75 [70] – такие рецепторы не только не узнаются сторонними клетками, но и не способны к димеризации. Кроме того, NGFR-спейсер может выполнять функцию удобного для детекции эпитопа, что упрощает не только селекцию и экспансию CAR Т-клеток, но при необходимости может быть использовано для оперативного уничтожения таких CAR Т-клеток в организме реципиента.

Трансмембранный домен

Основная функция трансмембранного домена – позиционировать рецептор на поверхности клетки. Как правило, этот домен конструируют из последовательностей, заимствованных из трансмембранных участков CD3 ζ , CD28, CD8, FcRI γ , реже из CD4, CD7, OX40 и MHC(H2-Kb), – выбор в значительной мере определяется тем, какие спейсерные или внутриклеточные последовательности располагаются рядом (обзор [71]). Показано, что трансмембранные районы на основе CD3 ζ и FcRI γ обеспечивают эффективное включение CAR в состав эндогенного TCR. Причем именно за счет этого взаимодействия CAR без ITAM-мотивов или вообще без сигнальных последовательностей оказываются вполне функциональными [69, 72–74]. Таким образом, дизайн CAR, обеспечивающий их включение или исключение из TCR, равно как вовлечение дополнительных корцепторов, должен приводить не только к количественным, но и к качественным различиям в генерируемых сигналах, что требует дальнейшего изучения.

Сигнальный (внутриклеточный) домен

Функция сигнального домена CAR – передавать активационный сигнал Т-клетке как только произошло распознавание антигена его внеклеточной частью. В норме активация Т-клеток происходит за счет фосфорилирования ITAM, находящихся в цитоплазматической части цепи CD3 ζ из комплекса TCR [75]. Соответственно в большинстве случаев для конструирования CAR в качестве домена, запускающего литическую активность клетки, используют именно сигнальный район CD3 ζ . Ранее в этом качестве были опробованы ITAM-содержащие домены других сигнальных субъединиц (например, FcR γ) [4], но они менее эффективно активировали цитотоксические функции модифицированных Т-лимфоцитов [76, 77]. Индукция активирующего сигнала в нативных Т-лимфоцитах происходит в несколько этапов. Сначала активная форма киназы LCK фосфорилирует ITAM-мотивы в цитоплазматической части CD3 ζ , что активирует киназу ZAP-70, которая запускает сразу несколько активирующих сигнальных каска-

дов. Перечисленные события называют «сигнал 1», но для полноценной активации Т-клетки необходим также «сигнал 2» [78]. Источниками второго сигнала являются костимулирующие рецепторы, например CD28, связывание которого с CD80/CD86 вызывает активацию PI3K и запуск PI3K-зависимого сигнального пути, который, в свою очередь, инициирует mTOR-каскад, определяющий пролиферативную активность клетки.

Таким образом, первое поколение CAR, содержащее только CD3 ζ -цепь, посылало в клетку исключительно «сигнал 1», что индуцировало цитолиз опухоли [79], но не обеспечивало усиленную пролиферацию активированных CAR Т-клеток. «Сигнал 2» мог бы поступить в клетку от нативных рецепторов CAR Т-клетки, однако, многие опухолевые клетки не экспрессируют соответствующих им лигандов. Чтобы преодолеть эту сложность, в 1998 году Х. Финни и соавт. предложили CAR «второго поколения», в котором цитоплазматическая часть содержала сигнальный участок CD28 вместе с CD3 ζ . Такой CAR обеспечивает клетку и «сигналом 1», и «сигналом 2», в результате чего клетка активируется, уничтожает мишень и пролиферирует [58, 80, 81]. Кроме CD28 в состав CAR вводили также сигнальные участки от таких костимулирующих рецепторов, как CD134 (TNFRSF4, OX40), CD154 (CD40L), CD137 (4-1BB), ICOS (CD278), CD27, CD244 (2B4) и другие [82–88]. Природа костимулирующих последовательностей (принадлежность к IgSF-или TNFRSF-семействам) прямо влияла на характер и динамику функционирования CAR Т-клеток [82, 89]. Дальнейший прогресс в разработке сигнальной части CAR привел к комбинированию двух или более костимулирующих последовательностей (наиболее частая – 4-1BB-CD28-CD3 ζ). Такие рецепторы, называемые CAR третьего поколения, секретируют более широкий спектр цитокинов (включая TNF α , GM-CSF и IFN γ), меньше подвержены индуцируемой активацией клеточной смерти и эффективнее уничтожают опухоли в мышиных моделях [90–92]. Несмотря на эти оптимистичные результаты, пока недостаточно данных, чтобы делать выводы о большей клинической эффективности CAR третьего поколения [93].

Наиболее частым вариантом CAR для клинического применения продолжает оставаться CAR второго поколения с последовательностями CD28-CD3 ζ или 4-1BB-CD3 ζ [94–97]. Как показано в клинических испытаниях и на доклинических моделях, использование CD28-CD3 ζ -сигнализирующих рецепторов разной специфичности ведет к взрывной экспансии CAR Т-клеток *in vivo*, но одновременно ускоряет истощение эффекторов и наступление их

терминальной дифференцировки, что, в свою очередь, приводит к ограниченному персистированию в организме и отсутствию достаточного противоопухолевого эффекта [8, 98]. При этом динамика пролиферации клеток с 4-1BB-CD3 ζ -содержащими CAR имеет более плавный характер: 4-1BB-домен обеспечивает иной характер активации и «ослабляет» эффект раннего истощения клеток-эффекторов. Соответственно 4-1BB-CD3 ζ CAR Т-клетки значительно дольше поддерживаются в организме, обеспечивая тем самым более длительный и надежный противоопухолевый контроль [87, 89, 99], обзор [100]. В то же время недавно обнаружили, что комбинация CD28-опосредованной костимуляции в контексте CD28-CD3 ζ -CAR и 4-1BB-костимуляции (коэкспрессия лиганда 4-1BB) сочетает в себе все достоинства обоих путей и функционирует эффективнее, чем любой из «классических» CAR-дизайнов, в том числе и 4-1BB-CD28-CD3 ζ -содержащий рецептор третьего поколения [101]. Аналогичный подход – использование контролируемой костимуляции для усиления функциональности CAR Т-клеток, лежит в основе GoCAR-T-технологии (Bellicum Pharmaceuticals). За счет коэкспрессии гибридной молекулы iMyD88-CD40 (iMC) и CAR первого поколения вовлекается более широкий набор активационных механизмов, и GoCAR-T-клетки, как следует из сообщений компании, активнее пролиферируют и уничтожают опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*.

По всей видимости, не существует универсального решения при создании CAR-конструкций, поскольку в разных типах новообразований оптимально работают различные комбинации сигнальных и костимулирующих модулей, и такие варианты идентифицируют в основном методом проб и ошибок. В этой связи достаточно оригинальной выглядит работа австралийских исследователей, которые создали комбинаторную библиотеку цитоплазматических частей CAR из сочетания 14 сигнальных участков (CD3 ζ , CD28, 4-1BB, CD27, DAP10 и др.) в различном количестве и случайной последовательности. Все случайные цитоплазматические участки экспрессировали в Т-клетках линии Jurkat в составе CAR с одинаковым распознающим модулем. Затем оценивали, какие последовательности вызывают максимальную активацию клеток. В результате обнаружили необычную комбинацию сигнальных последовательностей DAP10-CD3 ζ -CD27, которая *in vitro* работала эффективнее, чем CD28-CD3 ζ [102]. Концептуально близкий подход предложен группой Л. Альварез-Валлина для идентификации оптимальных/новых антигенраспознающих модулей в составе CAR – это так называемый Т-клеточный дисплей, заключающийся в прямом скрининге scFv-библиотек

на поверхности CAR T-клеток [103]. В этом случае scFv-библиотеку в формате химерного антигенного рецептора клонируют в лентивирусный вектор и экспрессируют на поверхности T-клеток при помощи вирусной трансдукции. Полученную таким образом библиотеку scFv-CAR T-клеток инкубируют с трансформированными клетками, несущими интересующую мишень, и после нескольких раундов активации-селекции и контрселекции отбирают лимфоциты, чей химерный рецептор связался с антигеном. Селекцию связавшихся клеток проводят по маркерам активации (фенотип активированных клеток меняется на CD69+), которые начинают экспрессироваться после связывания химерного рецептора с мишенью. Благодаря этому методу отбор scFv можно вести не столько по их аффинности к мишени, сколько непосредственно по способности индуцировать активацию и пролиферацию scFv-CAR T-клеток. Таким образом, важным преимуществом CAR T-клеточного дисплея является то, что отбор CAR происходит сразу в контексте синапса между CAR T-клеткой и клеткой-мишенью, в результате это может быть выгоднее, чем селекция высокоаффинных фрагментов *in vitro* с неизбежной последующей оптимизацией и структурной доработкой в контексте CAR T-клетки. Вместе с тем, необходимо помнить и о важном техническом ограничении T-клеточного дисплея, а именно, о значительном снижении разнообразия скринируемой библиотеки (не выше 10^6 – 10^7). Подобные работы указывают на то, что основным критерием подбора состава и комбинаций модулей CAR должна быть экспериментальная проверка, причем в условиях, максимально приближенных к ситуации *in vivo*: функциональность тех или иных структурных модулей CAR, показанная в системе *in vitro*, далеко не всегда подтверждается в модельных экспериментах с использованием ксено-

трансплантации опухолей и CAR T-клеток мышам, и уж тем более не гарантирует проявления тех же эффектов в клинике. В связи с этим дизайн и тестирование максимально широкого набора вариантов CAR считаются сегодня единственным способом довести хотя бы один из них до терапевтического применения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду очевидного трансляционного потенциала CAR T-клеточной платформы и взрывного роста интереса к этой теме появились разнообразные форматы CAR. Тем не менее, пока получено недостаточно экспериментальных и, в особенности, клинических данных о том, как структура CAR влияет на его свойства *in vivo* и какие модификации обеспечат максимальную клиническую эффективность CAR T-клеточной терапии. Крайне успешное применение CAR T-клеток в области онкогематологии стимулирует попытки адаптации CAR T-клеточной терапии к солидным типам рака, и первые результаты показывают, что, по-видимому, потребуется дальнейшее усложнение технологии. В свою очередь, широкое внедрение этой платформы требует проведения дополнительных систематических исследований и более глубокого понимания всей совокупности механизмов, обеспечивающих формирование и поддержание противоопухолевого иммунитета.

Авторы выражают благодарность А.В. Харкевичу за помощь в подготовке иллюстраций.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 16-14-10237. А.В. Таранин был поддержан программой фундаментальных научных исследований по теме 0310-2015-0006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gill S., June C.H. // Immunol. Rev. 2015. V. 263. № 1. P. 68–89.
- Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. // Mol. Ther. 2010. V. 18. № 4. P. 843–851.
- Kuwana Y., Asakura Y., Utsunomiya N., Nakanishi M., Arata Y., Itoh S., Nagase F., Kurosawa Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. V. 149. № 3. P. 960–968.
- Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. № 2. P. 720–724.
- Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., Johnson S., Kaufman B.M., Lee S.M., Lee T., Pope S.H., Riordan G.S., Whitlow M. // Science. 1988. V. 242. № 4877. P. 423–426.
- Kershaw M.H., Westwood J.A., Parker L.L., Wang G., Eshhar Z., Mavroukakis S.A., White D.E., Wunderlich J.R., Canevari S., Rogers-Freezer L., et al. // Clin. Cancer Res. 2006. V. 12. № 20. Pt 1. P. 6106–6115.
- Worn A., Pluckthun A. // J. Mol. Biol. 2001. V. 305. № 5. P. 989–1010.
- Long A.H., Haso W.M., Shern J.F., Wanhainen K.M., Murgai M., Ingaramo M., Smith J.P., Walker A.J., Kohler M.E., Venkateshwara V.R., et al. // Nat. Med. 2015. V. 21. № 6. P. 581–590.
- Maus M.V., Haas A.R., Beatty G.L., Albelda S.M., Levine B.L., Liu X., Zhao Y., Kalos M., June C.H. // Cancer Immunol. Res. 2013. V. 1. № 1. P. 26–31.
- Mintz A., Gibo D.M., Slagle-Webb B., Christensen N.D., Debinski W. // Neoplasia. 2002. V. 4. № 5. P. 388–399.
- Kioi M., Kawakami M., Shimamura T., Husain S.R., Puri R.K. // Cancer. 2006. V. 107. № 6. P. 1407–1418.
- Krenciute G., Krebs S., Torres D., Wu M.F., Liu H., Dotti G., Li X.N., Lesniak M.S., Balyasnikova I.V., Gottschalk S. // Mol. Ther. 2015. V. 24. № 2. P. 354–363.
- Kahlon K.S., Brown C., Cooper L.J., Raubitschek A., Forman S.J., Jensen M.C. // Cancer Res. 2004. V. 64. № 24. P. 9160–9166.
- Kong S., Sengupta S., Tyler B., Bais A.J., Ma Q., Doucette S., Zhou J., Sahin A., Carter B.S., Brem H., et al. // Clin. Cancer Res. 2012. V. 18. № 21. P. 5949–5960.

15. Krebs S., Chow K.K., Yi Z., Rodriguez-Cruz T., Hegde M., Gerken C., Ahmed N., Gottschalk S. // *Cytotherapy*. 2014. V. 16. № 8. P. 1121–1131.
16. Zhang T., Lemoi B.A., Sentman C.L. // *Blood*. 2005. V. 106. № 5. P. 1544–1551.
17. Shaffer D.R., Savoldo B., Yi Z., Chow K.K., Kakarla S., Spencer D.M., Dotti G., Wu M.F., Liu H., Kenney S., et al. // *Blood*. 2011. V. 117. № 16. P. 4304–4314.
18. Barber A., Zhang T., Megli C.J., Wu J., Meehan K.R., Sentman C.L. // *Exp. Hematol.* 2008. V. 36. № 10. P. 1318–1328.
19. Altschmidt U., Kahl R., Moritz D., Schnierle B.S., Gerstmayer B., Wels W., Groner B. // *Clin. Cancer Res.* 1996. V. 2. № 6. P. 1001–1008.
20. Muniappan A., Banapour B., Lebkowski J., Talib S. // *Cancer Gene Ther.* 2000. V. 7. № 1. P. 128–134.
21. Roberts M.R., Qin L., Zhang D., Smith D.H., Tran A.C., Dull T.J., Groopman J.E., Capon D.J., Byrn R.A., Finer M.H. // *Blood*. 1994. V. 84. № 9. P. 2878–2889.
22. Yang O.O., Tran A.C., Kalams S.A., Johnson R.P., Roberts M.R., Walker B.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 21. P. 11478–11483.
23. Romeo C., Seed B. // *Cell*. 1991. V. 64. № 5. P. 1037–1046.
24. Niederman T.M., Ghogawala Z., Carter B.S., Tompkins H.S., Russell M.M., Mulligan R.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 10. P. 7009–7014.
25. Zhang T., Wu M.R., Sentman C.L. // *J. Immunol.* 2012. V. 189. № 5. P. 2290–2299.
26. Davies D.M., Foster J., van der Stegen S.J., Parente-Pereira A.C., Chiapero-Stanke L., Delinassios G.J., Burbridge S.E., Kao V., Liu Z., Bosshard-Carter L., et al. // *Mol. Med.* 2012. V. 18. P. 565–576.
27. Pameijer C.R., Navanjo A., Meechoovet B., Wagner J.R., Aguilar B., Wright C.L., Chang W.C., Brown C.E., Jensen M.C. // *Cancer Gene Ther.* 2007. V. 14. № 1. P. 91–97.
28. Huang G., Yu L., Cooper L.J., Hollomon M., Huls H., Kleinerman E.S. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 1. P. 271–281.
29. Binz H.K., Stumpp M.T., Forrer P., Amstutz P., Pluckthun A. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 332. № 2. P. 489–503.
30. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantalò D.G., Bassett J.D., Bramson J.L. // *J. Immunother. Cancer*. 2015. V. 3. P. 55.
31. Jamnani F.R., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Mahboudi F., Ahmadvand D., Sharifzadeh Z., Parhamifar L., Moghimi S.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. № 1. P. 378–386.
32. Sharifzadeh Z., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., Ahmadvand D., Mahboudi F., Jamnani F.R., Moghimi S.M. // *Cancer Lett.* 2013. V. 334. № 2. P. 237–244.
33. Zhang G., Liu R., Zhu X., Wang L., Ma J., Han H., Wang X., Zhang G., He W., Wang W., et al. // *Immunol. Cell Biol.* 2013. V. 91. № 10. P. 615–624.
34. Zhang G., Wang L., Cui H., Wang X., Zhang G., Ma J., Han H., He W., Wang W., Zhao Y., et al. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 3571.
35. Moot R., Raikar S.S., Fleischer L., Tylawsky D.E., Nahakara H., Doering C.B., Spencer H.T. // *Mol. Ther. Oncolytics*. 2016. V. 3. P. 16026.
36. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J., Jr. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 7. P. 1844–1852.
37. Rodgers D.T., Mazagova M., Hampton E.N., Cao Y., Ramadoss N.S., Hardy I.R., Schulman A., Du J., Wang F., Singer O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 4. P. E459–E468.
38. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 23. P. 6436–6445.
39. Ma J.S., Kim J.Y., Kazane S.A., Choi S.H., Yun H.Y., Kim M.S., Rodgers D.T., Pugh H.M., Singer O., Sun S.B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 4. P. E450–E458.
40. Wu J., Edberg J.C., Redecha P.B., Bansal V., Guyre P.M., Coleman K., Salmon J.E., Kimberly R.P. // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. № 5. P. 1059–1070.
41. Koene H.R., Kleijer M., Algra J., Roos D., von dem Borne A.E., de Haas M. // *Blood*. 1997. V. 90. № 3. P. 1109–1114.
42. Musolino A., Naldi N., Bortesi B., Pezzuolo D., Capelletti M., Missale G., Laccabue D., Zerbini A., Camisa R., Bisagni G., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2008. V. 26. № 11. P. 1789–1796.
43. Clemenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vie H. // *Blood*. 2006. V. 107. № 12. P. 4669–4677.
44. Kudo K., Imai C., Lorenzini P., Kamiya T., Kono K., Davidoff A.M., Chng W.J., Campana D. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. № 1. P. 93–103.
45. D'Aloia M.M., Caratelli S., Palumbo C., Battella S., Arriga R., Lauro D., Palmieri G., Sconocchia G., Alimandi M. // *Cytotherapy*. 2016. V. 18. № 2. P. 278–290.
46. Dustin M.L., Shaw A.S. // *Science*. 1999. V. 283. № 5402. P. 649–650.
47. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. // *Science*. 1999. V. 285. № 5425. P. 221–227.
48. Grakoui A., Bromley S.K., Sumen C., Davis M.M., Shaw A.S., Allen P.M., Dustin M.L. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 9. P. 4066–4072.
49. Irles C., Symons A., Michel F., Bakker T.R., van der Merwe P.A., Acuto O. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 2. P. 189–197.
50. Cordoba S.P., Choudhuri K., Zhang H., Bridge M., Basat A.B., Dustin M.L., van der Merwe P.A. // *Blood*. 2013. V. 121. № 21. P. 4295–4302.
51. Moritz D., Groner B. // *Gene Ther.* 1995. V. 2. № 8. P. 539–546.
52. Dotti G., Gottschalk S., Savoldo B., Brenner M.K. // *Immunol. Rev.* 2014. V. 257. № 1. P. 107–126.
53. Hombach A.A., Schildgen V., Heuser C., Finnern R., Gilham D.E., Abken H. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 7. P. 4650–4657.
54. James S.E., Greenberg P.D., Jensen M.C., Lin Y., Wang J., Till B.G., Raubitschek A.A., Forman S.J., Press O.W. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 10. P. 7028–7038.
55. Haso W., Lee D.W., Shah N.N., Stetler-Stevenson M., Yuan C.M., Pastan I.H., Dimitrov D.S., Morgan R.A., FitzGerald D.J., Barrett D.M., et al. // *Blood*. 2013. V. 121. № 7. P. 1165–1174.
56. Guest R.D., Hawkins R.E., Kirillova N., Cheadle E.J., Arnold J., O'Neill A., Irlam J., Chester K.A., Kemshead J.T., Shaw D.M., et al. // *J. Immunother.* 2005. V. 28. № 3. P. 203–211.
57. Long A.H., Haso W.M., Orentas R.J. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 4. P. e23621.
58. Finney H.M., Lawson A.D., Bebbington C.R., Weir A.N. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 6. P. 2791–2797.
59. Moritz D., Wels W., Mattern J., Groner B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 10. P. 4318–4322.
60. Wilkie S., Picco G., Foster J., Davies D.M., Julien S., Cooper L., Arif S., Mather S.J., Taylor-Papadimitriou J., Burchell J.M., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 7. P. 4901–4909.
61. Patel S.D., Moskalenko M., Smith D., Maske B., Finer M.H., McArthur J.G. // *Gene Ther.* 1999. V. 6. № 3. P. 412–419.
62. Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. // *Curr. Opin. Immunol.* 2009. V. 21. № 2. P. 215–223.
63. Almasbak H., Walseng E., Kristian A., Myhre M.R., Suso E.M., Munthe L.A., Andersen J.T., Wang M.Y., Kvalheim G., Gaudernack G., et al. // *Gene Ther.* 2015. V. 22. № 5. P. 391–403.
64. Hudecek M., Sommermeyer D., Kosasih P.L., Silva-Benedict A., Liu L., Rader C., Jensen M.C., Riddell S.R. // *Cancer Immunol. Res.* 2015. V. 3. № 2. P. 125–135.
65. Jonnalagadda M., Mardiros A., Urak R., Wang X., Hoffman

- L.J., Bernanke A., Chang W.C., Bretzlaff W., Starr R., Priceman S., et al. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 4. P. 757–768.
66. Hombach A., Hombach A.A., Abken H. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 10. P. 1206–1213.
67. Riddell S.R., Protzer U. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 10. P. 1191–1192.
68. Fitzer-Attas C.J., Schindler D.G., Waks T., Eshhar Z. // *J. Immunol.* 1998. V. 160. № 1. P. 145–154.
69. Bridgeman J.S., Hawkins R.E., Bagley S., Blaylock M., Holland M., Gilham D.E. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 12. P. 6938–6949.
70. Zhao Y., Wang Q.J., Yang S., Kochenderfer J.N., Zheng Z., Zhong X., Sadelain M., Eshhar Z., Rosenberg S.A., Morgan R.A. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 9. P. 5563–5574.
71. Shi H., Sun M., Liu L., Wang Z. // *Mol. Cancer.* 2014. V. 13. P. 219.
72. Gosse J.A., Wagenknecht-Wiesner A., Holowka D., Baird B. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. № 4. P. 2123–2131.
73. Annenkov A.E., Moyes S.P., Eshhar Z., Mageed R.A., Chernajovsky Y. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 12. P. 6604–6613.
74. Bridgeman J.S., Ladell K., Sheard V.E., Miners K., Hawkins R.E., Price D.A., Gilham D.E. // *Clin. Exp. Immunol.* 2014. V. 175. № 2. P. 258–267.
75. Irving B.A., Weiss A. // *Cell.* 1991. V. 64. № 5. P. 891–901.
76. Haynes N.M., Snook M.B., Trapani J.A., Cerruti L., Jane S.M., Smyth M.J., Darcy P.K. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. № 1. P. 182–187.
77. Roberts M.R., Cooke K.S., Tran A.C., Smith K.A., Lin W.Y., Wang M., Dull T.J., Farson D., Zsebo K.M., Finer M.H. // *J. Immunol.* 1998. V. 161. № 1. P. 375–384.
78. Lenschow D.J., Walunas T.L., Bluestone J.A. // *Annu. Rev. Immunol.* 1996. V. 14. № 1. P. 233–258.
79. Gong M.C., Latouche J.B., Krause A., Heston W.D., Bander N.H., Sadelain M. // *Neoplasia.* 1999. V. 1. № 2. P. 123–127.
80. Hombach A., Wiczarkowiec A., Marquardt T., Heuser C., Usai L., Pohl C., Seliger B., Abken H. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 11. P. 6123–6131.
81. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Riviere I., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 70–75.
82. Brentjens R.J., Santos E., Nikhamin Y., Yeh R., Matsushita M., La Perle K., Quintas-Cardama A., Larson S.M., Sadelain M. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 18. Pt 1. P. 5426–5435.
83. Altvater B., Landmeier S., Pscherer S., Temme J., Juergens H., Pule M., Rossig C. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2009. V. 58. № 12. P. 1991–2001.
84. Wang J., Jensen M., Lin Y., Sui X., Chen E., Lindgren C.G., Till B., Raubitschek A., Forman S.J., Qian X., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2007. V. 18. № 8. P. 712–725.
85. Pule M.A., Straathof K.C., Dotti G., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K. // *Mol. Ther.* 2005. V. 12. № 5. P. 933–941.
86. Song D.G., Ye Q., Poussin M., Harms G.M., Figini M., Powell D.J., Jr. // *Blood.* 2012. V. 119. № 3. P. 696–706.
87. Imai C., Mihara K., Andreansky M., Nicholson I.C., Pui C.H., Geiger T.L., Campana D. // *Leukemia.* 2004. V. 18. № 4. P. 676–684.
88. Finney H.M., Akbar A.N., Lawson A.D. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 1. P. 104–113.
89. Milone M.C., Fish J.D., Carpenito C., Carroll R.G., Binder G.K., Teachey D., Samanta M., Lakhil M., Gloss B., Danet-Desnoyers G., et al. // *Mol. Ther.* 2009. V. 17. № 8. P. 1453–1464.
90. Zhong X.S., Matsushita M., Plotkin J., Riviere I., Sadelain M. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 2. P. 413–420.
91. Carpenito C., Milone M.C., Hassan R., Simonet J.C., Lakhil M., Suhoski M.M., Varela-Rohena A., Haines K.M., Heitjan D.F., Albelda S.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 9. P. 3360–3365.
92. Karlsson H., Svensson E., Gigg C., Jarvius M., Olsson-Stromberg U., Savoldo B., Dotti G., Loskog A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0144787.
93. Till B.G., Jensen M.C., Wang J., Qian X., Gopal A.K., Maloney D.G., Lindgren C.G., Lin Y., Pagel J.M., Budde L.E., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 17. P. 3940–3950.
94. Savoldo B., Ramos C.A., Liu E., Mims M.P., Keating M.J., Carrum G., Kamble R.T., Bollard C.M., Gee A.P., Mei Z., et al. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 5. P. 1822–1826.
95. Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 177. P. 177ra138.
96. Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. № 16. P. 1509–1518.
97. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 12. P. 2709–2720.
98. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., et al. // *Lancet.* 2015. V. 385. № 9967. P. 517–528.
99. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. № 16. P. 1507–1517.
100. van der Stegen S.J., Hamieh M., Sadelain M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. V. 14. № 7. P. 499–509.
101. Zhao Z., Condomines M., van der Stegen S.J., Perna F., Kloss C.C., Gunset G., Plotkin J., Sadelain M. // *Cancer Cell.* 2015. V. 28. № 4. P. 415–428.
102. Duong C.P., Westwood J.A., Yong C.S., Murphy A., Devaud C., John L.B., Darcy P.K., Kershaw M.H. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e63037.
103. Alonso-Camino V., Sanchez-Martin D., Compte M., Nunez-Prado N., Diaz R.M., Vile R., Alvarez-Vallina L. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2013. V. 2. P. e93.

УДК 577.29

Протеомные подходы в изучении микобактерий

Ю. А. Беспятых*, Е. А. Шитиков, Е. Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

*E-mail: JuliaBespyatykh@gmail.com

Поступила в редакцию 17.03.2016

Принята к печати 10.10.2016

РЕФЕРАТ Физиология возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* интенсивно изучается, однако накопленные к настоящему времени геномные и транскриптомные данные не позволяют в полной мере понять патогенный потенциал этих бактерий. В связи с этим актуальным представляется сравнительное изучение протеома микобактерий, отражающего закодированную в геноме информацию. В представленном обзоре рассмотрены основные этапы становления методов протеомного анализа, применяемых для изучения микобактерий, в аспекте повышения информативности и точности измерений. Описаны основные достижения в изучении протеома *M. tuberculosis* в целом. Отдельное внимание уделено наиболее распространенному на территории России семейству штаммов Beijing и особенностям его протеома. Принимая во внимание, что протеом описывает всю совокупность белков в клетке, рассмотрены также посттрансляционные модификации белков микобактерий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки, *Mycobacterium tuberculosis*, протеом, протеомика, туберкулез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МС – масс-спектрометрия; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ММР – мониторинг множественных реакций; ПТМ – посттрансляционные модификации; ОРС – открытые рамки считывания; ТФ – фактор транскрипции.

ВВЕДЕНИЕ

Системная биология прокариот стремится к пониманию того, каким образом физико-химические свойства и характер взаимодействия биомолекул связаны с формированием фенотипических свойств микроорганизмов. Нуклеотидную последовательность прокариотического генома в настоящее время можно расшифровать в течение нескольких часов. Тем не менее, несмотря на то, что геном прямо или косвенно кодирует основные биомолекулы клетки, такие, как РНК и белки, описать особенности их функционирования, только опираясь на информацию о геномной последовательности, невозможно. Для исследования структуры, функций и механизмов регуляции таких молекулярных систем необходимы точные и воспроизводимые методы количественного измерения всех компонентов в различных состояниях. Сегодня такие измерения стали обычными для РНК [1–4], однако из-за технических ограничений на уровне белка они пока отстают в чувствительности и репрезентативности.

Наиболее интенсивно методами системной биологии изучают клинически значимые микроорганизмы, в частности микобактерии. На сегодняшний день описано 213 видов микобактерий, многие из ко-

торых ассоциированы с инфекционными процессами у человека или животных [5]. К ним относятся *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* и *M. ulcerans*, вызывающие туберкулез, лепру (проказу) и язву Бурули соответственно. Согласно международной статистике, возбудителем туберкулеза инфицирована примерно треть населения Земли, при этом в 2015 году зарегистрировано около 1.3 миллиона смертельных исходов от этой инфекции [6]. Не удивительно, что наибольший интерес вызывают особенности физиологии и молекулярной организации *M. tuberculosis*.

До недавнего времени основные усилия были сосредоточены на изучении особенностей геномной организации возбудителя туберкулеза. Сегодня доступны данные геномного секвенирования более 10000 штаммов *M. tuberculosis* с различными фенотипами и генотипами. Однако опыт применения технологии полногеномного секвенирования с последующим сравнительным анализом выявляет ограниченную пригодность такого подхода для полноценного описания причин развития лекарственной устойчивости и проявления патогенности [7]. Так, большинство точечных мутаций, отличающих группы штаммов, обнаружены в промоторных обла-

стях генов и/или участках, кодирующих белки с гипотетической функцией, роль которых в физиологии микобактерий неясна. В этой связи актуальным становится функциональный анализ информации, реализуемой геномом патогена, проводимый с привлечением методов протеомного тестирования, в том числе количественной протеомики.

Стоит отметить, что на сегодняшний день выделение ДНК и РНК микобактерий и дальнейшие манипуляции с ними регламентированы достаточно большим количеством протоколов [8–10], которые применяются в различных лабораториях [11–16]. Иначе обстоят дела с выделением белков, особенно полной белковой фракции, необходимой для получения протеома. Особенности организации клеточной стенки, устойчивой к воздействию факторов внешней среды, в том числе к действию кислоты и щелочи, делают *M. tuberculosis* достаточно сложным объектом для протеомного анализа. Последнее в свою очередь требует отработки уникальных условий экстракции белков. Реализуемые протоколы протеомного анализа *M. tuberculosis* должны быть также достаточно эффективными, учитывая сложность накопления значительной бактериальной массы из-за крайне медленного роста культуры.

В данном обзоре рассмотрено развитие средств протеомного анализа микобактерий в хронологическом аспекте повышения их информативности и точности измерений.

ПРОТЕОМНЫЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ

Развитие методов протеомного анализа микобактерий

Марк Уилкинс в 1986 году впервые ввел термин «протеом», объединив два слова: «белок» (англ. PROTein) и «геном» (англ. genOME) [17]. Протеом – это совокупность белков в клетке, включая их изменения, происходящие со временем или под действием каких-либо факторов. В 1997 году по аналогии с геномикой, изучающей гены и их функции [18], появился термин «протеомика».

Протеомика исследует совокупность белков, синтезируемых организмом/клеткой в данной среде и на конкретном этапе клеточного цикла. Она описывает качественный состав белков, их относительную представленность, взаимодействие с другими макромолекулами, а также посттрансляционные модификации (ПТМ) [19–21].

Протеомика все еще отстает от геномики и транскриптомики из-за инструментальных проблем и недостаточной чувствительности существующих методов, однако появляется все больше работ, в которых

протеомные методы использовали для изучения инфекционных агентов.

Стоит отметить, что наиболее весомый вклад в развитие протеомики микобактерий внесли работы группы R. Aebersold [22, 23]. Основные работы по изучению белков микобактерий представлены в *таблице*.

Ранние исследования в области протеомики *M. tuberculosis*, выполненные в конце прошлого века, опирались на стратегию так называемой «нисходящей» (top down) протеомики, в основе которой лежит первичная сортировка интактных белков, выделенных из биологического образца, согласно их физико-химическим свойствам (с использованием гель-электрофореза, гель-фильтрации) с последующей идентификацией их масс-спектрометрическими (МС) методами (*рис. 1*). При таком подходе удавалось идентифицировать и квантифицировать около 100 белков микобактерий [24], что не превышает 3% общего протеома *M. tuberculosis*.

Дальнейшее развитие средств протеомного анализа открыло новые пути изучения туберкулеза, облегчив исследование многих сложных вопросов, в том числе и взаимодействий бактерии с клеткой хозяина. Для получения полного протеома наиболее эффективными считаются технологии, реализующие стратегию так называемой «восходящей» (bottom up) протеомики [20, 21], основанной на том, что общую массу белков, изолированных из биологического объекта, сначала протеолитически расщепляют на пептиды, которые затем непрерывным потоком анализируют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС, от англ. liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry) (*рис. 1*). Все разнообразие «восходящих» методик на уровне МС-эксперимента можно разделить на (1) исследовательские или панорамные (shotgun-proteomics) и (2) подтверждающие (таргетные, целевые) (*рис. 2*). Первые предназначены для идентификации и количественного анализа как можно большего числа белков и позволяют описать до 1000 белков *M. tuberculosis* за один запуск МС [25]. Вторые созданы для отслеживания во множестве образцов сравнительно небольшого, определенного до начала эксперимента, набора белков/пептидов с наивысшей доступной чувствительностью, точностью, воспроизводимостью и пропускной способностью метода (например, мониторинг множественных реакций (ММР), от англ. Multiple Reaction Monitoring).

Стоит отметить, что при реализации панорамного подхода наиболее точные результаты количественного сопоставления образцов достигаются при изотопном мечении одного из аналитов [38]. В частности, метод изотопного мечения белков в культуре клеток

Основные работы, внесшие вклад в развитие протеомики микобактерий

Год	Название работы	Количество идентифицированных белков	Источник
1997	Definition of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry	32	Sonnenberg M.G., and Belisle J.T. [26]
1999	Comparative proteome analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> and <i>Mycobacterium bovis</i> BCG strains: toward functional genomics of microbial pathogens	107	Jungblut P.R. <i>et al.</i> [27]
2000	Toward the proteome of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	167	Rosenkrands I. <i>et al.</i> [24]
2003	Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> strain	739	Gu S. <i>et al.</i> [28]
2004	Complementary analysis of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology	361	Schmidt F. <i>et al.</i> [29]
2005	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> functional network analysis by global subcellular protein profiling	1044	Mawuenyega K.G. <i>et al.</i> [30]
2010	Using a label-free proteomics method to identify differentially abundant proteins in closely related hypo- and hypervirulent clinical <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing isolates	1668	de Souza G.A. <i>et al.</i> [31]
2011	Comparison of membrane proteins of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv and H37Ra strains	1578	Malen H. <i>et al.</i> [32]
2011	Characterization of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> proteome by liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics techniques: a comprehensive resource for tuberculosis research	1051	Bell C. <i>et al.</i> [33]
2011	Proteogenomic analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> by high resolution mass spectrometry	3176	Kelkar D.S. <i>et al.</i> [34]
2013	The Mtb Proteome Library: A resource of assays to quantify the complete proteome of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3894	Schubert O.T. <i>et al.</i> [23]
2014	Disclosure of selective advantages in the “modern” sublineage of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Beijing genotype family by quantitative proteomics	2392	de Keijzer J. <i>et al.</i> [35]
2015	Quantitative proteomic analysis of <i>M. tuberculosis</i> cluster Beijing B0/W148 strains	1868	Bespyatykh J. <i>et al.</i> [36, 37]

(от англ. Stable Isotope Labeling by Amino acids in cell Culture, SILAC) основан на встраивании в структуру белка незаменимых аминокислот, содержащих стабильные изотопы (обычно $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ аргинин и/или лизин) [39, 40]. Подразумевается, что анализируемые клетки не должны синтезировать лизин и аргинин самостоятельно и использовать исключительно находящиеся в среде меченые аминокислоты. Однако *M. tuberculosis* обладает способностью синтезировать лизин эндогенно, что сразу ограничивает возможности данного подхода. В последнее время основной акцент в количественной протеомике микобактерий сделан на использовании безметочных методов МС

квантификации белков, обладающих большей чувствительностью и производительностью [31, 41].

Новые подходы к накоплению и обработке масс-спектров, например SWATH™ от компании ABSciEX, совмещают панорамные (data-independent acquisition, DIA) и подтверждающие (data-dependent acquisition, DDA) методики с целью минимизировать ограничения каждой из них [42]. При этом для SWATH™ не требуется отбор единичных родительских ионов, а ионы прекурсоры пропускаются большими окнами (к примеру, в 25 Да). Таким образом, SWATH™ позволяет идентифицировать и квантифицировать большой набор белков, подобно классическим панорам-

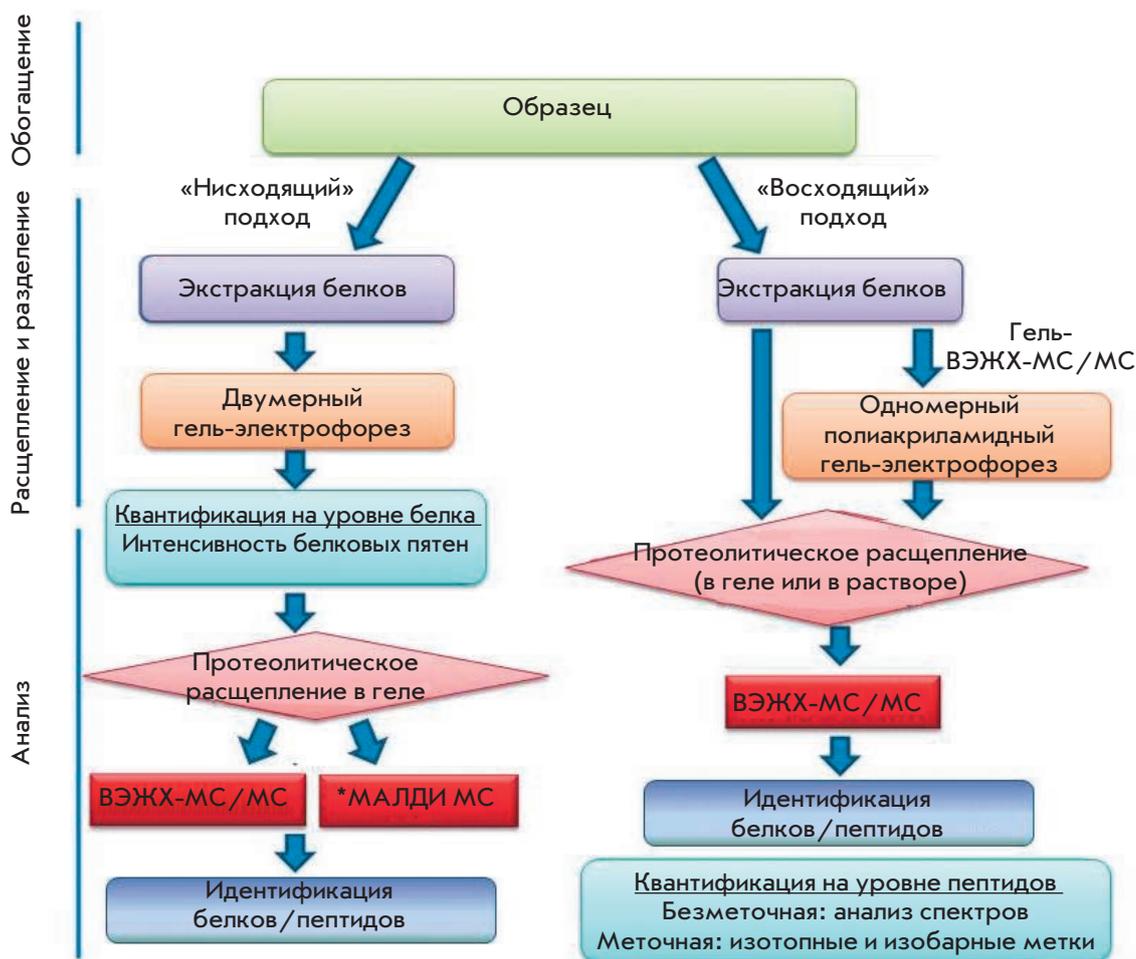


Рис. 1. Основные протеомные «нисходящей» и «восходящей» протеомики. Адаптировано из [118] с модификациями

* МАЛДИ МС – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация, совмещенная с масс-спектрометрией.

ным подходам, но с точностью и воспроизводимостью ММР для большего числа образцов.

ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП МИКОБАКТЕРИЙ

Протеомная характеристика штамма *M. tuberculosis* H37Rv

На сегодняшний день *M. tuberculosis* H37Rv является наиболее хорошо изученным штаммом микобактерий. Отметим, что геномная последовательность этого штамма была полностью расшифрована еще в 1998 году [43]. Закономерно, что протеом этого штамма также изучен максимально полно. К настоящему моменту с использованием комплексных протеомных подходов подтверждено существование 97% белков из 4012 аннотированных на основании геномной последовательности [23]. Описаны пулы мембранных белков и клеточной стенки [32, 44], цитозольные бел-

ки [25, 30, 45], секретлируемые белки, определяемые в культуральном фильтрате [46].

Анализ белков регулона DosR, ассоциированного с анаэробным выживанием *M. tuberculosis*, позволил выявить изменения их представленности в бактериальной культуре штамма H37Rv, помещенного в условия гипоксии [29]. В частности, при гипоксии представленность белка HspX увеличивалась в 340 раз по сравнению с культурой, находящейся в нормальных условиях. Стоит отметить, что до этого данный регулон изучали исключительно на уровне транскриптов [47, 48].

Отдельно стоит упомянуть исследования, в которых моделировали инфекционный процесс и оценивали белковый профиль *M. tuberculosis* в условиях, максимально приближенных к существованию бактериальных клеток в живом организме. В работе Cho и соавт. [49] проведен сравнительный протеомный анализ белков латентной формы штамма H37Rv в экспоненци-

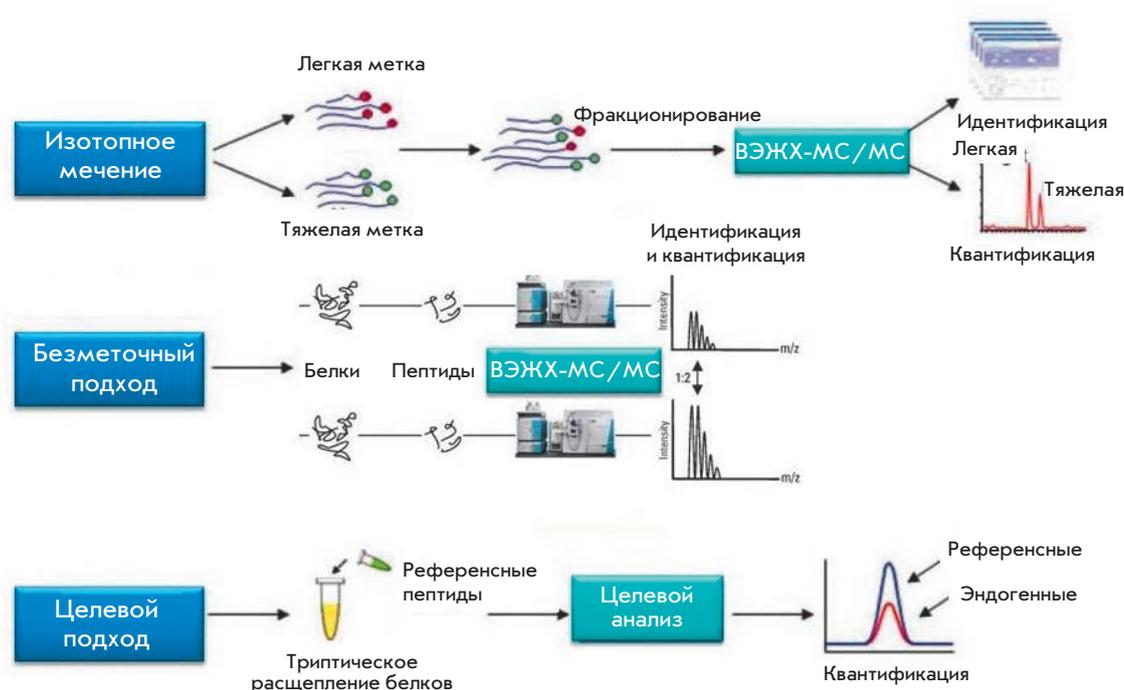


Рис. 2. Методы протеомного анализа, реализующие «восходящие» подходы

альной, логарифмической и стационарной фазах роста с использованием технологии сайт-специфического мечения остатков цистеина (от англ. isotope-coded affinity tags, ICAT), основанной на ковалентном мечении остатка цистеина в полипептидной цепи химически идентичными, но изотопно разными реагентами [22, 29]. По результатам были описаны высокопредставленные белки, характерные для экспоненциальной и стационарной фазы – 193 и 241 соответственно. Большинство этих белков относилось к системам деградации и энергетическому метаболизму.

С целью изучения факторов вирулентности *M. tuberculosis* и поиска потенциальных кандидатов для разработки вакцин оценивали различия в протеомных профилях вирулентного штамма H37Rv и авирулентных микобактерий (*M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG). Выявлена одинаковая представленность большинства мембранных белков в штаммах H37Rv и H37Ra, тогда как представленность 121 белка в этих штаммах различается более чем в 5 раз. Дальнейшее изучение мембранных липопротеинов и данные о регуляции этих белков позволили предположить, что изменение метаболического состояния может играть роль в повышенной вирулентности [32]. Изучение белков системы Esat-6 и ESAT-6-подобных белков, которые обнаруживаются только в штаммах H37Rv, но не в H37Ra, выявило мутации в генах пяти ESAT-6-подобных белков в штамме H37Ra. Стоит отметить, что антиген 6 кДа (Esat-6) образует гетеродимерный комплекс с белком CFP-10 [50]. Таким образом, предпо-

лагают, что система ESAT-6/CFP-10 ассоциирована с вирулентностью *M. tuberculosis* и препятствует слиянию фагосомы и лизосомы внутри макрофагов хозяина, тем самым предотвращая разрушение клеток микобактерий [51].

Несмотря на то что H37Rv и *M. bovis* BCG на геномном уровне имеют более 99.9% гомологии, выявлено 294 белка, статистически отличающихся между двумя штаммами [41]. Ранее при помощи сравнительного геномного анализа этих штаммов обнаружили отсутствие определенных регионов различия (от англ. Regions of difference, RD) в геноме BCG, и с потерей соответствующих генов было связано отсутствие патогенности [52]. Таким образом, ряд различающихся белков соответствовал описанным RD [41, 53, 54]. Среди них особое внимание было уделено системе ESAT-6, белки которой ранее предложили в качестве кандидатов для разработки новой вакцины [55]. Дополнительно для разработки диагностических и вакцинных препаратов предложены 22 дифференциально экспрессирующихся белка, таких, как ацетил-CoA ацетилтрансфераза (Rv0243) и некоторые Esat-6-подобные белки (Rv1198, Rv1793) [54].

Протеомная характеристика семейства штаммов Beijing *M. tuberculosis*

Как уже отмечалось выше, большинство работ посвящено изучению протеома лабораторного штамма *M. tuberculosis* H37Rv и лишь в небольшом количестве приведены протеомные характеристики других генетических семейств.

Согласно современной классификации штаммы *M. tuberculosis* делят на семь генетических линий [56]. С клинической точки зрения несомненный интерес представляет семейство Beijing. Штаммы данного семейства относятся к филогенетической линии 2 и представлены в наибольшем количестве стран на глобальном уровне: 13% от мирового количества изолятов [57]. Также для них характерна ассоциация с формированием лекарственной устойчивости [58] и большая, чем у других семейств, вирулентность [59].

Сравнение протеомов штаммов Beijing и H37Rv выявило существенные различия между ними. В штаммах Beijing представленность белков Rv0129c, Rv0831c, Rv1096, Rv3117 и Rv3804c, относящихся к известным факторам вирулентности [60], была выше, чем в H37Rv, а содержание белков Hsp65 (Rv0440), Pst1 (Rv0934) и Rv1886c – основных антигенов, снижение выработки которых может способствовать уходу микобактерий от иммунного ответа хозяина [61, 62], было уменьшено. Кроме того, белки эффлюксных помп Rv0341, Rv2688c и Rv3728 найдены исключительно в штаммах Beijing [35].

Однако нам известны только две работы [31, 35], в которых изучали белковое разнообразие штаммов Beijing. В первой из них de Souza и соавт. сравнили протеомы гипо- и гипервирулентных штаммов данного семейства и описали около 50 белков, высокопредставленных в каждой группе, при том, что всего идентифицировано 1668 белков [31]. Показано, что в гипервирулентных штаммах представленность белка ESAT-6 ниже, чем в гиповирулентных, причем этот результат дополнительно подтвержден сравнительной оценкой экспрессии соответствующего гена на уровне РНК-транскриптов. Стоит отметить, что увеличение относительной представленности белка ESAT-6 ранее рассматривали как характеристику вирулентных штаммов [51, 55]. Этот неоднозначный результат доказывает всю сложность роли путей секреции ESAT-6 в патогенности *M. tuberculosis*. Дополнительно он может свидетельствовать в пользу фенотипических различий между штаммами семейства Beijing и штаммами H37Rv.

Другая работа de Keijzer и соавт. посвящена сопоставлению белков штаммов *M. tuberculosis*, относящихся к древним (атипичным) и современным (типичным) сублиниям семейства Beijing [35]. Методом изотопного мечения аминокислот в культуре клеток в сочетании с ВЭЖХ-МС/МС идентифицировано и квантифицировано 2392 белка. Несмотря на то что по белковому профилю обе сублинии оказались крайне схожи, удалось выявить различия в представленности четырех белков – MmpL4 (Rv0450c), Rv3137, Rv1269c и SseA (Rv3283). Из них представленность белков MmpL4 (Rv0450c) и Rv3137

в группе типичных штаммов была значительно выше, чем в атипичных. Среди белков, низкопредставленных в современных Beijing, отмечают SseA (Rv3283), уровень транскриптов которого также был снижен.

Стоит отметить, что в структуре популяции возбудителя туберкулеза в России штаммы семейства Beijing занимают доминирующее положение (от 50 до 80%) [63, 64]. На основании VNTR-анализа представители данного семейства могут быть разделены на несколько типов [65, 66]. На территории страны наиболее распространены типы M2 и M11, составляющие около 80% всех выявляемых изолятов [66, 67]. Исследуя штаммы Beijing B0/W148, относящиеся к типу M11, мы подтвердили их ассоциацию с развитием мультирезистентности, обнаружили новые потенциальные пути формирования устойчивости к противотуберкулезным препаратам, а также описали уникальную геномную перестройку [15].

В свою очередь, нами проведен сравнительный протеомный анализ штаммов кластера Beijing B0/W148 и штамма H37Rv [37]. В общей сложности идентифицировано 1868 белков штаммов кластера B0/W148 и 1560 белков штамма H37Rv, из которых выделена группа из 266 дифференциально представленных белков. Представленность 41 белка в штаммах кластера Beijing B0/W148 была выше, чем в штамме H37Rv, в то время как представленность 225 белков была ниже. Потенциальный биологический эффект этих различий мы оценили по обогащению функциональных категорий белков в ходе Gene Ontology (GO) анализа и с привлечением регуляторной сети генов [68]. Мы предполагаем, что некоторые из описанных нами особенностей представителей кластера Beijing B0/W148 способствуют повышенной вирулентности и успешному распространению этих штаммов. В частности, мы наблюдали увеличение представленности ферментов, ответственных за биосинтез длинноцепочечных жирных кислот, наряду со снижением представленности белков, ответственных за их деградацию. Микобактерии используют длинноцепочечные жирные кислоты для получения микотиоловых кислот и различных липидов, которые рассматривают как основные факторы вирулентности *M. tuberculosis*, проявляющиеся на начальных стадиях инфекции, когда бактерии попадают в макрофаг. Мы также отметили увеличение представленности белка HsaA, вовлеченного в деградацию стероидов. Показано, что *M. tuberculosis* используют внеклеточный холестерин в качестве источника энергии и для биосинтеза липидов клеточной стенки. Указанные наблюдения могут свидетельствовать в пользу повышенной выживаемости микобактерий в макрофагах, что является известной характеристикой штаммов кластера Beijing B0/W148 [69, 70].

Кроме того, нами зафиксирован очень низкий уровень белка SseA в штаммах B0/W148, что, возможно, приводит к накоплению активных форм кислорода и, как следствие, к повреждению ДНК. Это, в свою очередь, может вести к образованию широкого спектра генетических вариантов, способствующих выживанию бактериальной клетки под действием селективного отбора, в частности, во время лекарственной терапии.

Отдельно стоит рассмотреть работы в области протеомики лекарственно-устойчивых штаммов *M. tuberculosis* [71–73]. Так, сравнение устойчивых и чувствительных штаммов позволило обнаружить пять белков (Rv0491, Rv1446c, Rv2145, Rv2971 и Rv3028c) с повышенной представленностью в штаммах, устойчивых к изониазиду [72]. Это мембранные белки, которые потенциально могут служить мишенью для новых лекарственных средств. Анализ штаммов, устойчивых к аминогликозидам, выявил в них повышенную представленность белков Rv0685, Rv1876 и Rv3841, ассоциированных с метаболизмом железа [73]. Ассимиляция и утилизация железа играют важную роль в росте, вирулентности и формировании латентной формы *M. tuberculosis*. Pandey и Rodriguez предположили, что ферритин (Rv3841) обязателен для поддержания гомеостаза железа в клетках микобактерий, при его недостатке бактерии становятся более восприимчивыми к воздействию антибиотиков [74]. В сходном исследовании также отмечено увеличение представленности белков Rv1876 и Rv3224, участвующих в обмене железа, с указанием их возможной роли в формировании устойчивости к противотуберкулезным препаратам второго ряда [71]. Комплексное сравнение чувствительных штаммов и штаммов с множественной лекарственной устойчивостью позволило определить в резистентных штаммах такие факторы вирулентности, как каталаза/пероксидаза (Rv1908c), активирующаяся в фагосомах [50]. Ранее было показано, что каталазная/пероксидазная активность необходима для роста клеток и их персистенции в мышцах и морских свинках [75], а также в моноцитах периферической крови человека [76]. Дополнительно идентифицировали белки Rv0036, Rv2032c, Rv0635, Rv1827 и Rv2896c, вовлеченные в клеточный метаболизм и способствующие внутриклеточному выживанию. В одной из работ последних лет белки Rv2031c, Rv3692 и Rv0444c предлагается использовать в качестве биомаркеров для эффективной серодиагностики резистентных штаммов микобактерий [77].

Анализ посттрансляционных модификаций

Развитие методов протеомного анализа позволяет не только провести инвентаризацию белков, сопоста-

вить их представленность, но и выявить известные посттрансляционные модификации.

На сегодняшний день описаны такие ПТМ белков *M. tuberculosis*, как O-гликозилирование [33, 78–84], фосфорилирование [85, 86], метилирование [87], ацетилирование [88], липидизация [33, 81, 82, 89–93], дезамидирование [94], N-формилирование [95, 96] и убиквитинирование [94, 97–102].

В частности, характеристика убиквитин-подобного белка Rv2111c *M. tuberculosis* стала первой описанной убиквитин-подобной системой бактерий [101]. Убиквитинирование (присоединение к белку цепи из нескольких молекул короткого белка убиквитина) является универсальной ПТМ у эукариот, служащей сигналом к расщеплению этого белка протеасомой. Идентификация соответствующих белков затруднительна, так как они довольно быстро элиминируются. Изначально сайты убиквитинирования были обнаружены в 41 белке *M. tuberculosis* [103]. На сегодняшний день описаны 602 убиквитин-подобных белка микобактерий, но только у 55 из них экспериментально установлены сайты модификаций [102].

Другая распространенная ПТМ – фосфорилирование. В 301 белке *M. tuberculosis* выявлено 516 сайтов фосфорилирования серина/треонина киназами. Эти данные использовали для поиска возможных мотивов для объяснения фосфорилирования киназами. Удивительно, но шесть из восьми исследованных киназ содержали консервативные мотивы, что указывает на высокий уровень избыточности функций киназ в *M. tuberculosis* [86].

Липопротеины, экспортируемые общим секреторным путем и процессируемые сигнальной пептидазой II, модифицируются путем ацилирования N-концевого цистеина. У микобактерий эти модификации недостаточно хорошо охарактеризованы. Некоторые липопротеины также могут подвергаться O-гликозилированию вблизи N-конца. В данной области часто содержатся несколько остатков треонина, которые служат мишенью для описанных модификаций. Роль таких модификаций пока не известна, однако, есть предположение, что они защищают белки от протеолитического расщепления. По крайней мере, некоторые липопротеины экспортируются на поверхность бактериальной клетки [104, 105] с помощью липидного хвоста, закоренного в наружной мембране [106]. Следовательно, N-концевые части полипептидной цепи уязвимы для протеолитического расщепления, и многие липопротеины в несколько усеченной и растворимой форме можно обнаружить в культуральных супернатантах. В настоящее время наиболее хорошо охарактеризованы гликозилированные липопротеины MPT 83 [107] и SodC [82]. На мышинной модели по-

1. Автоматическая аннотация



2. Соотнесение с экспериментальными пептидами



3. Коррекция аннотации

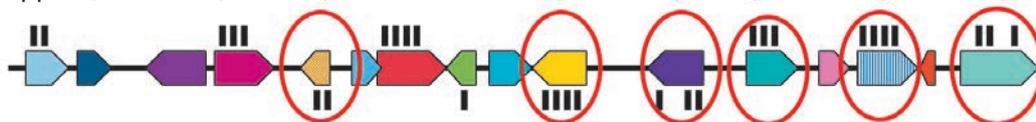


Рис. 3. Исправление аннотации генома с использованием данных масс-спектрометрии

казано, что *O*-маннозилрование (частный случай гликозилирования) приводит к ослаблению патогенных свойств *M. tuberculosis* [108], и с помощью протеомных подходов в супернатанте культуры *M. tuberculosis* выявлено более 40 *O*-гликозилированных белков [83, 109]. Стоит отметить, что известен только один гликозилированный белок МРТ 32, или Ара [78], не относящийся к липопротеинам. Ара является одним из наиболее распространенных внеклеточных белков, секретируемых через общий секреторный путь [110].

Наконец, интерес вызывает обнаружение противотуберкулезного антигена – поверхностного гепаринсвязывающего гемагглютинаина, который рассматривается как компонент для разработки новой вакцины [111, 112]. Уникальность этого белка состоит в метилировании нескольких остатков лизина [87]. Похоже, что эти метилированные остатки лизина имеют иммунологическое значение и входят в состав Т-клеточных эпитопов в гепаринсвязывающем гемагглютинине [113]. Существует достаточно доказательств того, что многие посттрансляционные модификации имеют большое значение для иммунитета и защиты организма от туберкулеза.

Как известно, путем ПТМ может регулироваться продолжительность жизни белков в клетке, их взаимодействие с другими белками, а также ферментативная активность. ПТМ многих эукариотических белков относятся к обязательным стадиям созревания белка. Белки, не подвергнутые ПТМ, оказываются функционально неактивными [114]. На сегодняшний день роль ПТМ белков микобактерий изучена недостаточно.

Протеогеномный анализ

Все описанные исследования показывают, что геномная вариабельность штаммов микобактерий от-

ражается на протеомном уровне, и, таким образом, сравнительные протеомные данные могут помочь в понимании фенотипических различий разных групп бактерий, таких, как степень лекарственной чувствительности или вирулентности. С другой стороны, протеомные исследования способствуют корректной расшифровке геномной информации.

Большинство масс-спектрометрических технологий опирается на базы данных, содержащие аннотированные аминокислотные последовательности белка. Однако в результате сравнительного анализа было показано, что аннотация на основании геномных данных зачастую неполная и содержит ошибки. Так, к примеру, последовательность генома *M. tuberculosis* штамма H37Rv была полностью расшифрована в Сенгеровском институте в 1998 году [43] и содержала 3924 открытые рамки считывания (ОРС), но уже через несколько лет авторы сообщили об увеличении ОРС до 3995 [115]. В настоящее время аннотированная версия *M. tuberculosis* H37Rv (27-я версия согласно базе данных TubercuList) содержит 4018 белкокодирующих генов, из которых 26% относятся к классу белков с гипотетической функцией. При этом протеомные исследования в значительной мере помогли переработать геномную аннотацию, представляя экспериментальные доказательства в случае ряда не аннотированных ранее генов, или генов, сайты инициации транскрипции которых были неправильно идентифицированы, а также просто подтверждая существующие ОРС (рис. 3). Kelkar и соавт. в 2011 на основании данных МС/МС-анализа идентифицировали 3176 белков *M. tuberculosis* H37Rv, а также 250 пептидов, не соответствующих имеющейся аннотации. В итоге аннотацию дополнили 41 белком и уточнили сайты инициации транскрипции 33 генов [34]. В том же году исследователи

из Норвегии с помощью MS-подходов исправили аннотацию еще 24 генов штамма H37Rv [116]. В целом же следует отметить, что за последние несколько лет проведено несколько крупных протеомных исследований *M. tuberculosis*, в каждом из которых описано от 20 до 40 не аннотированных ранее белков и были скорректированы текущие аннотации генома [23, 34, 116, 117].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие протеомики открыло новые подходы к изучению туберкулеза, облегчив решение многих сложных вопросов, в том числе и взаимодействий бактерии с хозяйской клеткой. Несмотря на то что протеомика отстает от геномики и транскриптомики из-за инструментальных проблем и недостаточной чувствительности, появляется все больше работ, в которых инфекционные агенты изучают с использованием протеомных подходов. Так, с помощью протеомного анализа описаны факторы вирулентности и механизмы их действия, реакция хозяина и патогена на инфекционный процесс. Протеомика позволила более полно описать уникальные отличительные особенности различных штаммов *M. tuberculosis*.

Изучение возбудителя туберкулеза на протеомном уровне может способствовать установлению метаболических и физиологических особенностей, необходимых для успешного протекания инфекционного процесса, а также механизмов вирулентности, позволяющих *M. tuberculosis* модулировать иммунный ответ хозяина. Белки, синтезируемые при попадании микобактерий внутрь клеток хозяина, важны для их выживания в этих условиях, поэтому они считаются потенциальными мишенями для разрабатываемых лекарственных препаратов. Создание новых препаратов и схем лечения особенно необходимо именно сейчас, когда широкое распространение получили штаммы с множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Таким образом, изучение полного протеомного профиля микобактерий может способствовать лучшему пониманию физиологии патогена и, возможно, лечению туберкулеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 14-15-00689).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Azhikina T., Skvortsov T., Radaeva T., Mardanov A., Ravin N., Apt A., Sverdlov E. // *Biotechniques*. 2010. V. 48. № 2. P. 139–144.
- Tailleux L., Waddell S.J., Pelizzola M., Mortellaro A., Withers M., Tanne A., Castagnoli P.R., Gicquel B., Stoker N.G., Butcher P.D., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 1. P. e1403.
- Talaat A.M., Lyons R., Howard S.T., Johnston S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 13. P. 4602–4607.
- Talaat A.M., Ward S.K., Wu C.W., Rondon E., Tavano C., Bannantine J.P., Lyons R., Johnston S.A. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 11. P. 4265–4274.
- Tortoli E. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006. V. 48. № 2. P. 159–178.
- WHO. World Health Statistic. 2015.
- Warner D.F., Mizrahi V. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1107–1108.
- Akhtar S., Sarkar S., Mishra A., Sarkar D. // *Anal. Biochem.* 2011. V. 417. № 2. P. 286–288.
- Ghodbane R., Asmar S., Betzner M., Linet M., Pierquin J., Raoult D., Drancourt M. // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. № 8. P. 2693–2696.
- Tyler A.D., Christianson S., Knox N.C., Mabon P., Wolfe J., van Domselaar G., Graham M.R., Sharma M.K. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 2. P. e0148676.
- Bespyatykh J.A., Zimenkov D.V., Shitikov E.A., Kulagina E.V., Lapa S.A., Gryadunov D.A., Ilina E.N., Govorun V.M. // *Infect. Genet. Evol.* 2014. V. 26. P. 41–46.
- Chernyaeva E.N., Shulgina M.V., Rotkevich M.S., Dobrynin P.V., Simonov S.A., Shitikov E.A., Ischenko D.S., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Ilina E.N., et al. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. P. 308.
- Ilina E.N., Shitikov E.A., Ikryannikova L.N., Alekseev D.G., Kamashev D.E., Malakhova M.V., Parfenova T.V., Afanas'ev M.V., Ischenko D.S., Bazaleev N.A., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e56577.
- Shitikov E., Ilina E., Chernousova L., Borovskaya A., Rukin I., Afanas'ev M., Smirnova T., Vorobyeva A., Larionova E., Andreevskaya S., et al. // *Infect. Genet. Evol.* 2012. V. 12. № 4. P. 838–845.
- Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., Alexeev D.G., Karpova I.Y., Kostryukova E.S., Isaeva Y.D., Nosova E.Y., Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. P. e84971.
- Sotnikova E.A., Shitikov E.A., Malakhova M.V., Kostryukova E.S., Ilina E.N., Atrasheuskaya A.V., Ignatyev G.M., Vinokurova N.V., Gorbachyov V.Y. // *Genome Announc.* 2016. V. 4. № 2. P. e00182–00116.
- Wilkins M.R., Pasquali C., Appel R.D., Ou K., Golaz O., Sanchez J.C., Yan J.X., Gooley A.A., Hughes G., Humphery-Smith I., et al. // *Biotechnology (N.Y.)*. 1996. V. 14. № 1. P. 61–65.
- James P. // *Q. Rev. Biophys.* 1997. V. 30. № 4. P. 279–331.
- Hakkinen L., Uitto V.J., Larjava H. // *Periodontol.* 2000. V. 24. P. 127–152.
- Molloy M.P., Witzmann F.A. // *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 2002. V. 1. № 1. P. 23–39.
- Monteoliva L., Albar J.P. // *Brief Funct. Genomic Proteomic.* 2004. V. 3. № 3. P. 220–239.
- Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 10. P. 994–999.
- Schubert O.T., Mouritsen J., Ludwig C., Rost H.L., Rosenberger G., Arthur P.K., Claassen M., Campbell D.S., Sun Z., Farrah T., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 13. № 5. P. 602–612.
- Rosenkrands I., King A., Weldingh K., Moniatte M., Moertz E., Andersen P. // *Electrophoresis*. 2000. V. 21. № 17. P. 3740–3756.
- Mehaffy C., Hess A., Prenni J.E., Mathema B., Kreiswirth B., Dobos K.M. // *Proteomics*. 2010. V. 10. № 10. P. 1966–1984.

26. Sonnenberg M.G., Belisle J.T. // *Infect. Immun.* 1997. V. 65. № 11. P. 4515–4524.
27. Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Zimny-Arndt U., Raupach B., Mattow J., Halada P., Lamer S., Hagens K., Kaufmann S.H. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 33. № 6. P. 1103–1117.
28. Gu S., Chen J., Dobos K.M., Bradbury E.M., Belisle J.T., Chen X. // *Mol. Cell Proteomics.* 2003. V. 2. № 12. P. 1284–1296.
29. Schmidt F., Donahoe S., Hagens K., Mattow J., Schaible U.E., Kaufmann S.H., Aebersold R., Jungblut P.R. // *Mol. Cell Proteomics.* 2004. V. 3. № 1. P. 24–42.
30. Mawuenyega K.G., Forst C.V., Dobos K.M., Belisle J.T., Chen J., Bradbury E.M., Bradbury A.R., Chen X. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. V. 16. № 1. P. 396–404.
31. de Souza G.A., Fortuin S., Aguilar D., Pando R.H., McEvoy C.R., van Helden P.D., Koehler C.J., Thiede B., Warren R.M., Wiker H.G. // *Mol. Cell Proteomics.* 2010. V. 9. № 11. P. 2414–2423.
32. Malen H., de Souza G.A., Pathak S., Softeland T., Wiker H.G. // *BMC Microbiol.* 2011. V. 11. P. 18.
33. Bell C., Smith G.T., Sweredoski M.J., Hess S. // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. № 1. P. 119–130.
34. Kelkar D.S., Kumar D., Kumar P., Balakrishnan L., Muthusamy B., Yadav A.K., Shrivastava P., Marimuthu A., Anand S., Sundaram H., et al. // *Mol. Cell Proteomics.* 2011. V. 10. № 12. P. M111.011627.
35. de Keijzer J., de Haas P.E., de Ru A.H., van Veelen P.A., van Soelingen D. // *Mol. Cell Proteomics.* 2014. V. 13. № 10. P. 2632–2645.
36. Bespyatykh J., Shitikov E., Altukhov I., Butenko I., Alexeev D., Melnikova N., Zhuravlev V., Ilina E. // *ProkaGenomics.* 2015. V. P GLOB 06. P. 117.
37. Bespyatykh J., Shitikov E., Butenko I., Altukhov I., Alexeev D., Mokrousov I., Dogonadze M., Zhuravlev V., Yablonsky P., Ilina E., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 28985.
38. Treumann A., Thiede B. // *Expert Rev. Proteomics.* 2010. V. 7. № 5. P. 647–653.
39. Ong S.E., Blagoev B., Kratchmarova I., Kristensen D.B., Steen H., Pandey A., Mann M. // *Mol. Cell Proteomics.* 2002. V. 1. № 5. P. 376–386.
40. Wang H., Dong D., Tang S., Chen X., Gao Q. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 5. P. 2055–2066.
41. Gunawardena H.P., Feltcher M.E., Wrobel J.A., Gu S., Braunstein M., Chen X. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 12. P. 5463–5474.
42. Gillet L.C., Navarro P., Tate S., Rost H., Selevsek N., Reiter L., Bonner R., Aebersold R. // *Mol. Cell Proteomics.* 2012. V. 11. № 6. P. O111.016717.
43. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, et al. // *Nature.* 1998. V. 393. № 6685. P. 537–544.
44. Xiong Y., Chalmers M.J., Gao F.P., Cross T.A., Marshall A.G. // *J. Proteome Res.* 2005. V. 4. № 3. P. 855–861.
45. Covert B.A., Spencer J.S., Orme I.M., Belisle J.T. // *Proteomics.* 2001. V. 1. № 4. P. 574–586.
46. Samanich K.M., Belisle J.T., Sonnenberg M.G., Keen M.A., Zolla-Pazner S., Laal S. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 178. № 5. P. 1534–1538.
47. Park H.D., Guinn K.M., Harrell M.I., Liao R., Voskuil M.I., Tompa M., Schoolnik G.K., Sherman D.R. // *Mol. Microbiol.* 2003. V. 48. № 3. P. 833–843.
48. Rodriguez J.G., Hernandez A.C., Helguera-Repetto C., Aguilar Ayala D., Guadarrama-Medina R., Anzola J.M., Bustos J.R., Zambrano M.M., Gonzalez Y.M.J., Garcia M.J., et al. // *MBio.* 2014. V. 5. № 3. P. e01125–01114.
49. Cho S.H., Goodlett D., Franzblau S. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2006. V. 86. № 6. P. 445–460.
50. Singhal N., Sharma P., Kumar M., Joshi B., Bisht D. // *Proteome Sci.* 2012. V. 10. № 1. P. 14.
51. Tan T., Lee W.L., Alexander D.C., Grinstein S., Liu J. // *Cell Microbiol.* 2006. V. 8. № 9. P. 1417–1429.
52. Brosch R., Pym A.S., Gordon S.V., Cole S.T. // *Trends Microbiol.* 2001. V. 9. № 9. P. 452–458.
53. Mattow J., Jungblut P.R., Schaible U.E., Mollenkopf H.J., Lamer S., Zimny-Arndt U., Hagens K., Muller E.C., Kaufmann S.H. // *Electrophoresis.* 2001. V. 22. № 14. P. 2936–2946.
54. Mattow J., Schaible U.E., Schmidt F., Hagens K., Siejak F., Brestrich G., Haeselbarth G., Muller E.C., Jungblut P.R., Kaufmann S.H. // *Electrophoresis.* 2003. V. 24. № 19–20. P. 3405–3420.
55. He X.Y., Zhuang Y.H., Zhang X.G., Li G.L. // *Microbes Infect.* 2003. V. 5. № 10. P. 851–856.
56. Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K.E., Kato-Maeda M., Parkhill J., Malla B., Berg S., Thwaites G., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 10. P. 1176–1182.
57. Parwati I., van Crevel R., van Soelingen D. // *Lancet Infect Dis.* 2010. V. 10. № 2. P. 103–111.
58. Hanekom M., Gey van Pittius N.C., McEvoy C., Victor T.C., van Helden P.D., Warren R.M. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2011. V. 91. № 6. P. 510–523.
59. Dormans J., Burger M., Aguilar D., Hernandez-Pando R., Kremer K., Roholl P., Arend S.M., van Soelingen D. // *Clin. Exp. Immunol.* 2004. V. 137. № 3. P. 460–468.
60. Pfeiffer C., Betts J.C., Flynn H.R., Lukey P.T., van Helden P. // *Microbiology.* 2005. V. 151. Pt 4. P. 1139–1150.
61. Monahan I.M., Betts J., Banerjee D.K., Butcher P.D. // *Microbiology.* 2001. V. 147. Pt2. P. 459–471.
62. Sherman D.R., Voskuil M., Schnappinger D., Liao R., Harrell M.I., Schoolnik G.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. № 13. P. 7534–7539.
63. Mokrousov I., Otten T., Vyazovaya A., Limeschenko E., Filipenko M.L., Sola C., Rastogi N., Steklova L., Vyshnevskiy B., Narvskaya O. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2003. V. 22. № 6. P. 342–348.
64. Норкина О.В., Киншт В.Н., Мокроусов И.В., Курунов Ю.Н., Краснов В.А. // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2003. № 3. P. 9–18.
65. Mokrousov I., Narvskaya O., Vyazovaya A., Millet J., Otten T., Vishnevsky B., Rastogi N. // *J. Clin. Microbiol.* 2008. V. 46. № 11. P. 3576–3584.
66. Surikova O.V., Voitech D.S., Kuzmicheva G., Tatkov S.I., Mokrousov I.V., Narvskaya O.V., Rot M.A., van Soelingen D., Filipenko M.L. // *Eur. J. Epidemiol.* 2005. V. 20. № 11. P. 963–974.
67. Drobniewski F., Balabanova Y., Nikolayevsky V., Ruddy M., Kuznetsov S., Zakharova S., Melentyev A., Fedorin I. // *Jama.* 2005. V. 293. № 22. P. 2726–2731.
68. Peterson E.J., Reiss D.J., Turkarslan S., Minch K.J., Rustad T., Plaisier C.L., Longabaugh W.J., Sherman D.R., Baliga N.S. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 18. P. 11291–11303.
69. Lasunskaja E., Ribeiro S.C., Manicheva O., Gomes L.L., Suffys P.N., Mokrousov I., Ferrazoli L., Andrade M.R., Kritski A., Otten T., et al. // *Microbes Infect.* 2010. V. 12. № 6. P. 467–475.
70. Pardini M., Niemann S., Varaine F., Iona E., Meacci F., Orru G., Yesilkaya H., Jarosz T., Andrew P., Barer M., et al. // *Tuberculosis (Edinb.).* 2009. V. 89. № 4. P. 317–324.
71. Kumar B., Sharma D., Sharma P., Katoch V.M., Venkatesan K., Bisht D. // *J. Proteomics.* 2013. V. 94. P. 68–77.
72. Mattow J., Siejak F., Hagens K., Becher D., Albrecht D., Kraha A., Schmidt F., Jungblut P.R., Kaufmann S.H., Schaible U.E. // *Proteomics.* 2006. V. 6. № 8. P. 2485–2494.

73. Sharma D., Kumar B., Lata M., Joshi B., Venkatesan K., Shukla S., Bisht D. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 10. P. e0139414.
74. Pandey R., Rodriguez G.M. // *Infect. Immun.* 2012. V. 80. № 10. P. 3650–3659.
75. Li Z., Kelley C., Collins F., Rouse D., Morris S. // *J. Infect. Dis.* 1998. V. 177. № 4. P. 1030–1035.
76. Manca C., Paul S., Barry C.E., 3rd, Freedman V.H., Kaplan G. // *Infect. Immun.* 1999. V. 67. № 1. P. 74–79.
77. Zhang L., Wang Q., Wang W., Liu Y., Wang J., Yue J., Xu Y., Xu W., Cui Z., Zhang X., et al. // *Proteome Sci.* 2012. V. 10. P. 12.
78. Dobos K.M., Khoo K.H., Swiderek K.M., Brennan P.J., Belisle J.T. // *J. Bacteriol.* 1996. V. 178. № 9. P. 2498–2506.
79. Espitia C., Mancilla R. // *Clin. Exp. Immunol.* 1989. V. 77. № 3. P. 378–383.
80. Herrmann J.L., Delahay R., Gallagher A., Robertson B., Young D. // *FEBS Lett.* 2000. V. 473. № 3. P. 358–362.
81. Herrmann J.L., O'Gaora P., Gallagher A., Thole J.E., Young D.B. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 14. P. 3547–3554.
82. Sartain M.J., Belisle J.T. // *Glycobiology.* 2009. V. 19. № 1. P. 38–51.
83. Smith G.T., Sweredoski M.J., Hess S. // *J. Proteomics.* 2014. V. 97. P. 296–306.
84. VanderVen B.C., Harder J.D., Crick D.C., Belisle J.T. // *Science.* 2005. V. 309. № 5736. P. 941–943.
85. Kusebauch U., Ortega C., Ollodart A., Rogers R.S., Sherman D.R., Moritz R.L., Grundner C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 25. P. 9265–9270.
86. Prisc S., Dankwa S., Schwartz D., Chou M.F., Locasale J.W., Kang C.M., Bemis G., Church G.M., Steen H., Husson R.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 16. P. 7521–7526.
87. Pethe K., Bifani P., Drobecq H., Sergheraert C., Debie A.S., Loch C., Menozzi F.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 16. P. 10759–10764.
88. Okkels L.M., Muller E.C., Schmid M., Rosenkrands I., Kaufmann S.H., Andersen P., Jungblut P.R. // *Proteomics.* 2004. V. 4. № 10. P. 2954–2960.
89. Lancioni C.L., Li Q., Thomas J.J., Ding X., Thiel B., Drage M.G., Pecora N.D., Ziady A.G., Shank S., Harding C.V., et al. // *Infect. Immun.* 2011. V. 79. № 2. P. 663–673.
90. Okuda S., Tokuda H. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2011. V. 65. P. 239–259.
91. Sanchez A., Espinosa P., Esparza M.A., Colon M., Bernal G., Mancilla R. // *Scand. J. Immunol.* 2009. V. 69. № 1. P. 20–28.
92. Sanchez A., Espinosa P., Garcia T., Mancilla R. // *Clin. Dev. Immunol.* 2012. V. 2012. P. 950503.
93. Sutcliffe I.C., Harrington D.J. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. V. 28. № 5. P. 645–659.
94. Striebel F., Imkamp F., Sutter M., Steiner M., Mamedov A., Weber-Ban E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 6. P. 647–651.
95. Chun T., Serbina N.V., Nolt D., Wang B., Chiu N.M., Flynn J.L., Wang C.R. // *J. Exp. Med.* 2001. V. 193. № 10. P. 1213–1220.
96. Doi T., Yamada H., Yajima T., Wajjwalku W., Hara T., Yoshikai Y. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 6. P. 3806–3813.
97. Barandun J., Delley C.L., Weber-Ban E. // *BMC Biol.* 2012. V. 10. P. 95.
98. Burns K.E., Cerda-Maira F.A., Wang T., Li H., Bishai W.R., Darwin K.H. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 5. P. 821–827.
99. Burns K.E., Pearce M.J., Darwin K.H. // *J. Bacteriol.* 2010. V. 192. № 11. P. 2933–2935.
100. Cerda-Maira F.A., Pearce M.J., Fuortes M., Bishai W.R., Hubbard S.R., Darwin K.H. // *Mol. Microbiol.* 2010. V. 77. № 5. P. 1123–1135.
101. Pearce M.J., Mintseris J., Ferreyra J., Gygi S.P., Darwin K.H. // *Science.* 2008. V. 322. № 5904. P. 1104–1107.
102. Tung C.W. // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. P. 40.
103. Poulsen C., Akhter Y., Jeon A.H., Schmitt-Ulms G., Meyer H.E., Stefanski A., Stuhler K., Wilmanns M., Song Y.H. // *Mol. Syst. Biol.* 2010. V. 6. № 386. P. 10.1038/msb.2010.1039.
104. Braibant M., Lefevre P., de Wit L., Peirs P., Ooms J., Huygen K., Andersen A.B., Content J. // *Gene.* 1996. V. 176. № 1–2. P. 171–176.
105. Harboe M., Wiker H.G., Ulvund G., Lund-Pedersen B., Andersen A.B., Hewinson R.G., Nagai S. // *Infect. Immun.* 1998. V. 66. № 1. P. 289–296.
106. Young D.B., Garbe T.R. // *Res. Microbiol.* 1991. V. 142. № 1. P. 55–65.
107. Michell S.L., Whelan A.O., Wheeler P.R., Panico M., Easton R.L., Etienne A.T., Haslam S.M., Dell A., Morris H.R., Reason A.J., et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 18. P. 16423–16432.
108. Liu C.F., Tonini L., Malaga W., Beau M., Stella A., Bouyssie D., Jackson M.C., Nigou J., Puzo G., Guilhot C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 16. P. 6560–6565.
109. Gonzalez-Zamorano M., Mendoza-Hernandez G., Xolalpa W., Parada C., Vallecillo A.J., Bigi F., Espitia C. // *J. Proteome Res.* 2009. V. 8. № 2. P. 721–733.
110. Nagai S., Wiker H.G., Harboe M., Kinomoto M. // *Infect. Immun.* 1991. V. 59. № 1. P. 372–382.
111. Guerrero G.G., Debie A.S., Loch C. // *Vaccine.* 2010. V. 28. № 27. P. 4340–4347.
112. Vidal Pessolani M.C., Marques M.A., Reddy V.M., Loch C., Menozzi F.D. // *Microbes Infect.* 2003. V. 5. № 7. P. 677–684.
113. Temmerman S., Pethe K., Parra M., Alonso S., Rouanet C., Pickett T., Drowart A., Debie A.S., Delogu G., Menozzi F.D., et al. // *Nat. Med.* 2004. V. 10. № 9. P. 935–941.
114. Jensen O.N. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 6. P. 391–403.
115. Camus J.C., Pryor M.J., Medigue C., Cole S.T. // *Microbiology.* 2002. V. 148. Pt 10. P. 2967–2973.
116. de Souza G.A., Arntzen M.O., Fortuin S., Schurch A.C., Malen H., McEvoy C.R., van Soolingen D., Thiede B., Warren R.M., Wiker H.G. // *Mol. Cell Proteomics.* 2011. V. 10. № 1. P. M110.002527.
117. de Souza G.A., Malen H., Softeland T., Saelensminde G., Prasad S., Jonassen I., Wiker H.G. // *BMC Genomics.* 2008. V. 9. P. 316.
118. Yadeta K.A., Elmore J.M., Coaker G. // *Front Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 10.3389/fpls.2013.00086.

УДК 591.28

Холестерин в патогенезе болезней Альцгеймера, Паркинсона и аутизме: связь с синаптической дисфункцией

А. М. Петров^{*}, М. Р. Касимов, А. Л. Зефирова

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения, кафедра нормальной физиологии, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

^{*}E-mail: fysio@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.04.2016

Принята к печати 28.11.2016

РЕФЕРАТ Ранее мы описали метаболизм мозгового холестерина в норме и при ряде редких патологий нервной системы, вызванных дефектами генов, непосредственно вовлеченных в биосинтез и/или трафик холестерина. В представленном обзоре проведен анализ нарушений метаболизма холестерина при широко распространенных нейродегенеративных заболеваниях (болезнях Альцгеймера, Паркинсона) и расстройствах аутистического спектра. Особое внимание уделено дефектам синаптической передачи, возникновение которых может быть связано с изменением содержания холестерина в нейрональных мембранах и продукцией оксистеролов. Примечательно, что альтерации обмена мозгового холестерина, как и нейропередачи, происходят на очень ранних стадиях данных патологий, и полиморфизм генов, ассоциированных с метаболизмом холестерина или синаптической передачей, влияет на риск их развития и тяжесть. В модельных системах фармакологические и/или генетические вмешательства в гомеостаз мозгового холестерина зачастую имеют выраженные эффекты на протекание нейродегенеративных заболеваний. Таким образом, развитие болезней Альцгеймера, Паркинсона и расстройств аутистического спектра частично может быть связано с дисбалансом обмена холестерина в мозге, ведущего к изменениям содержания мембранного холестерина и оксистеролов, что, в свою очередь, влияет на ключевые этапы синаптической передачи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА оксистеролы, липидные рафты, нейродегенеративные заболевания, синаптическая передача, холестерин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ А β – амилоидный пептид β ; АВС – АТФ-связывающие кассетные транспортеры; АроЕ – аполипопротеин Е; АФК – активные формы кислорода; БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; ГХ – гидроксистерин; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; LRP – белки, сходные с рецептором LDL; LX-рецептор – печеночный X-рецептор; PAC – расстройства аутистического спектра; СУР46A1 – холестерин-24-гидроксилаза; СУР7B1 – оксистерол-7 α -гидролаза; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее мы описали изменения обмена холестерина при редких наследственных патологиях ЦНС, вызванных мутациями в генах, либо непосредственно вовлеченных в биосинтез холестерина (синдром Смита–Лемли–Опица), либо в его внутриклеточный трафик (болезнь Ниманна–Пика типа С) и регуляцию синтеза (болезнь Гентингтона) [1]. В данном обзоре проанализирована связь таких широко распространенных нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, и расстройств аутистического спектра с обменом холестерина и синаптическими нарушениями.

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА (БА)

Это наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, которое встречается обычно у по-

жилых людей и проявляется ухудшением памяти и когнитивных способностей. При этом в мозге наблюдается отложение амилоидных бляшек во внеклеточной среде, в состав которых входит амилоидный пептид β (А β), и пучков нейрофиламентов из гиперфосфорилированного белка tau внутри клеток. Накопление А β и гибель нейронов, особенно в гиппокампе, считаются основными проявлениями симптомов БА. Накопление А β отражает нарушение баланса между его продукцией и удалением из мозга. А β формируется в ходе двухэтапного расщепления трансмембранного белка APP (белок-предшественник амилоида) протеазами, названными секретазами. Сначала APP расщепляется секретазой α или β , затем – γ . Если APP расщепляется α -секретазой, то образуется неамилоидогенный продукт sAPP α , который не вызывает патологии

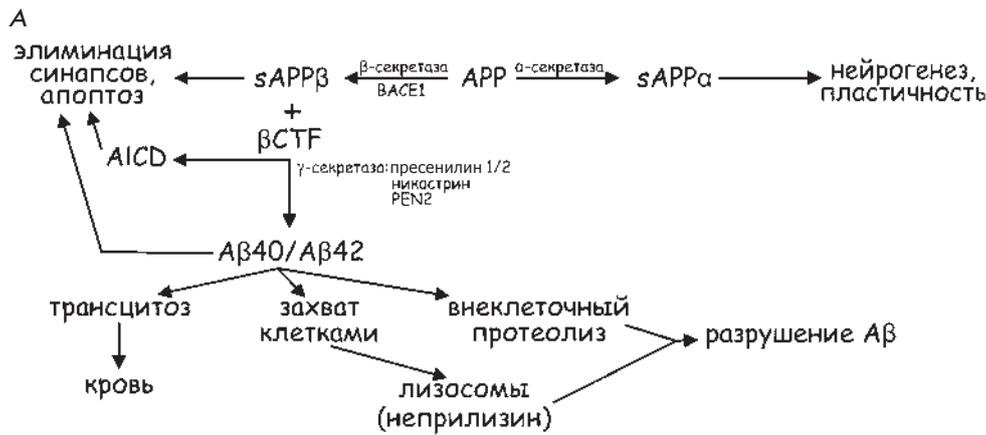
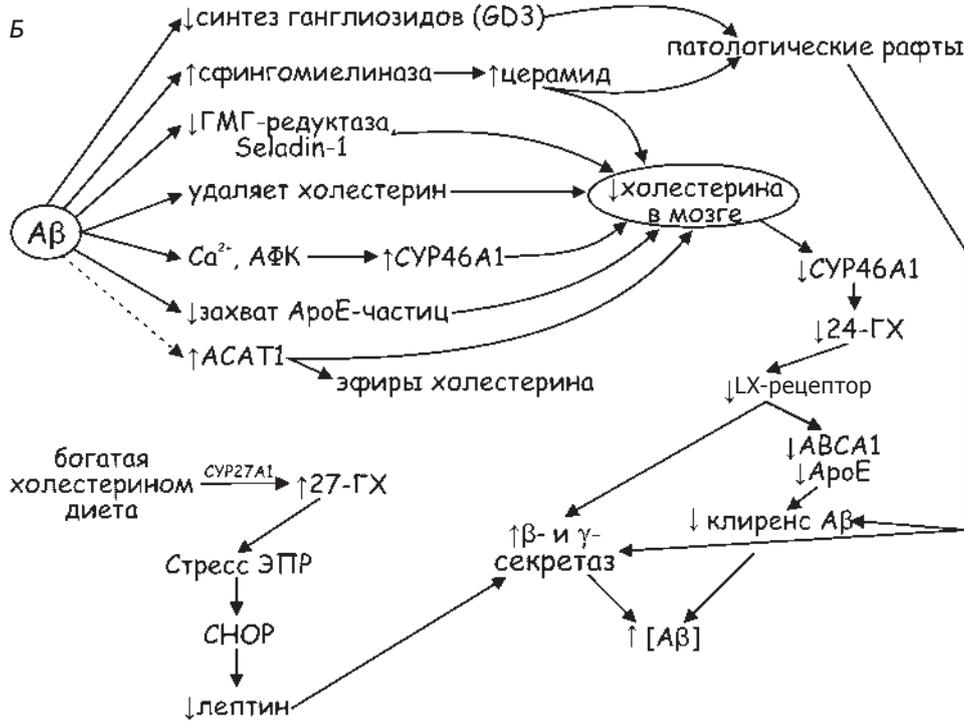


Рис. 1. Продукция амилоидного пептида в мозге и уровень холестерина. А – процессинг белка-предшественника амилоида (APP). Роль α-, β- и γ-секретаз. Б – взаимосвязь продукции амилоидного пептида β (Aβ) и уровня холестерина в мозге. Влияние обогащенной холестерином диеты. Подробные объяснения в тексте



и имеет нейропротекторные эффекты, усиливает долговременную потенциацию и обучение. В случае воздействия β-секретазы (BACE1) APP расщепляется на sAPPβ (вовлечен в элиминацию синапсов и апоптоз) и C-концевой фрагмент (βCTF), который в дальнейшем разрезается γ-секретазой (комплекс нескольких белков, включающий пресенилин 1 или 2, APH, никастрин и PEN2) с образованием токсичного Aβ из 40 или 42 (более токсичен) аминокислотных остатков. Кроме того, при протеолизе γ-секретазой βCTF освобождается внутриклеточный домен APP (AICD), способный запускать (при участии Fe65 и TIR60) транскрипцию генов, ускоряющих гибель клеток и нарушающих нейрогенез [2]. Поступивший

в интерстициальную среду Aβ удаляется при помощи нескольких механизмов: переброски через ГЭБ, захвата клетками для деградации в лизосомах, расщепления специфичными протеазами (рис. 1А). Лизосомы содержат специфичную к Aβ протеазу – неприлизин, вне клетки деградация Aβ осуществляется инсулиндеградирующим ферментом (IDE), который выделяется микроглией и астроцитами [3]. Выделяют две формы БА – с ранним (5–10%) и поздним (90–95%) началом, при которых признаки болезни проявляются до 65 лет и после соответственно. Ранняя форма имеет строго наследственную причину и связана с избыточной продукцией Aβ. У пациентов с поздним началом БА обнаруживается скорее не-

эффективность выведения А β , нежели усиленная его продукция [4, 5].

Содержание холестерина в мозге и плазме: связь с БА, значение оксистеролов

Экспериментальные данные указывают на существенный вклад изменений метаболизма холестерина в патогенез БА, (рис. 1Б). Однако непонятно, является ли нарушение гомеостаза холестерина одной из причин или последствием заболевания. В ранней работе было обнаружено появление скоплений А β в мозге кроликов, регулярно получающих богатую холестерином пищу [6]. Позднее показали, что холестериновая диета увеличивает фосфорилирование tau, вызывает окислительный стресс и когнитивные дефекты, но не меняет уровень холестерина в мозге кроликов [7]. В ряде эпидемиологических исследований (но не во всех) выявлено увеличение риска развития БА у людей с повышенным содержанием холестерина в плазме, особенно в середине жизни [2, 8]. Подтверждена корреляция между высоким/низким содержанием холестерина в составе липопротеинов низкой/высокой плотности с уровнем мозгового А β у пациентов на ранней стадии БА [9]. Однако связь между уровнем холестерина в плазме и БА опосредуется, вероятно, изменением сосудистого тонуса и воспалительными реакциями, нежели влиянием на мозговой холестерин. Хроническая гипоперфузия мозга крыс и мышей с БА увеличивает экспрессию VАСЕ1, концентрацию А β и когнитивные дефекты [10]. Гипоперфузия и воспаление, высокое содержание холестерина в плазме могут вызывать способствующие БА сосудистые дефекты и изменение продукции оксистеролов.

При БА в мозге уменьшается концентрация 24S-гидроксихолестерина (24-ГХ). Однако у пациентов с начальной стадией БА содержание 24-ГХ временно увеличивается в плазме и спинномозговой жидкости [11]. У людей с повышенной концентрацией 24-ГХ в плазме с более высокой вероятностью в ближайшие 8 лет могут развиваться когнитивные нарушения [12]. Возможно, избыточный выброс 24-ГХ является попыткой скомпенсировать зарождающуюся дисфункцию [1]. Усиление экспрессии 24-ГХ синтезирующего фермента СУР46А1 (с помощью аденовирусной терапии) в мозге APP23-мышей значительно уменьшает накопление А β , глиоз и когнитивные дефекты [13]. Влияние активации СУР46А1 может опосредоваться 24-ГХ, стимулирующим LХ α и β -рецепторы, которые увеличивают экспрессию генов, вовлеченных в транспорт и синтез холестерина [1]. Делеция генов LХ α или β -рецепторов вызывает возрастные нейродегенеративные изменения [14]. Наоборот, активация LХ-рецепторов увеличи-

вает клиренс А β и формирование памяти у трансгенных мышей APP/PS1 и APP23, вероятно, за счет увеличения мозгового уровня ApoE и ABCA1 [15]. ABCA1 может активно удалять избыток А β из мембран во внеклеточную среду, что защищает нейроны от токсического действия накопления А β [16]. В эндотелиальных клетках капилляров мозга 24-ГХ увеличивает клиренс А β , повышая экспрессию ABCA1, и снижает продукцию А β , изменяя экспрессию секретаз [17].

Уровень 27-ГХ в мозге значительно увеличивается при БА [18]. У кроликов, получающих богатую холестерином диету, уровни 24-ГХ и 27-ГХ в плазме увеличиваются, тогда как в мозге отношение 24-ГХ/27-ГХ снижается, что может увеличивать риск нейродегенерации. Предполагается, что увеличенный вход 27-ГХ в мозг и/или усиленный выход 24-ГХ из мозга могут лежать в основе связи между высоким уровнем холестерина в плазме и БА [11, 19]. Исследования на органотипичных срезах мозга взрослых животных показали, что 27-ГХ увеличивает уровни А β и фосфорилированного tau, тогда как 24-ГХ способствует неамилоидогенному процессингу APP. Более того, 24-ГХ препятствует токсическим эффектам 27-ГХ при коапликации. 27-ГХ может вызывать стресс ЭПР, в результате чего активируется транскрипционный фактор СНОР (С/ЕВР α homologous protein), подавляющий экспрессию лептина, который в норме уменьшает экспрессию VАСЕ1, продукцию А β и фосфорилирование tau [19].

Хотя ранние работы указали на увеличение холестерина в мозге больных БА, в других исследованиях обнаружено снижение содержания общего холестерина в мозге и его синтеза [8] (рис. 1Б). При БА выявлено уменьшение холестерина в височной извилине, гиппокампе, во фракции рафтов в целом мозге и в белом веществе [20–22]. Однако при БА уровень холестерина был увеличен в сердцевинах зрелых амилоидных бляшек и нервных терминалях, обогащенных амилоидными агрегатами [23]. Эти наблюдения указывают на существование А β -зависимого удаления холестерина из мембран нервных терминалей. Другие пути снижения содержания холестерина в мозге при БА могут быть связаны с: APP/А β -зависимым угнетением синтеза холестерина за счет ингибирования 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктазы (ГМГ-редуктаза) [24]; уменьшением захвата холестерина в составе ApoE-частиц под влиянием А β [15]; увеличением окисления холестерина в результате возросшей активности СУР46А1 [11]; модификацией липидных рафтов, вызванной А β [1, 25]. Усиление активности СУР46А1 может быть следствием вызванных А β альтераций в гомеостазе Са²⁺ и окислительного стресса [11, 26]. В процессе старе-

ния наблюдается снижение содержания холестерина, особенно заметное в регионах, восприимчивых к БА, и, вероятно, связанное с усилением экспрессии/активности СУР46А1, уменьшением синтеза/трафика холестерина [26, 27].

В биоптатах мозга больных БА выявлено накопление капель эфиров холестерина в Аβ-позитивных нейронах, и чем больше было таких капель, тем больше была концентрация Аβ [28]. Ингибирование (ацетилСоА-холестерин-ацилтрансферазы/АСАТ1) синтеза эфиров холестерина сопровождалось увеличением 24-ГХ и явно снижало генерацию Аβ, образование бляшек и когнитивные дефекты в модели БА [29]. Возможно, на ранних стадиях БА увеличивается синтез ферментов, ответственных за образование эфиров холестерина [30]. Одним из путей стимуляции этерификации холестерина может быть повышение продукции 25-ГХ, которое возникает вследствие воспаления. Кроме того, экспрессия фермента СУР7В1, метаболизирующего 25- и 27-ГХ, снижается при БА [31].

При БА в мозге снижается содержание сфингомиелина, а уровень церамидов, продуктов его гидролиза сфингомиелиназами, повышается. В итоге «обычные» рафты распадаются, холестерин вытесняется из мембран, а церамиды агрегируют с образованием больших «патологических» липидных платформ, участвующих в инициации гибели клетки. Активация сфингомиелиназ может происходить на ранних стадиях БА под действием Аβ [32, 33]. В старости и при БА (сильнее выражено) в мозге уменьшается концентрация ганглиозидов (компоненты рафтов). Аβ и АICD могут ингибировать и уменьшать экспрессию ферментов синтеза ряда ганглиозидов. Однако содержание ганглиозидов GM1 и GM2, вовлеченных в агрегацию Аβ, увеличивается [21]. Дисбаланс состава ганглиозидов может участвовать в конверсии Аβ в высокотоксичную олигомерную форму [1, 33].

Образование Аβ и холестерин

Внеклеточный N-концевой фрагмент APP включает холестеринсвязывающий сайт [34], но большинство молекул APP располагаются вне липидных рафтов. Секретазы β и γ, вовлеченные в образование Аβ, локализованы в рафтах. Экспрессия каркасного белка RanBP9 (увеличена у APP-мышей) способствует локализации APP в рафтах, включающих VACE1 [35]. Зависимая от липидных рафтов димеризация и стабилизация требуются для активации β-секретазы. При увеличении холестерина и сфинголипидов в рафтах γ-секретаза продуцирует более токсичный вариант Аβ42. Однако образование основного количества Аβ (~70%) происходит внутри клетки [28], поэтому сначала следует этап рафт-зависимого эндоцитоза,

в ходе которого APP, β- и γ-секретазы попадают в везикулу, и затем в эндосомы/лизосомы, где в условиях кислого pH (способствует активности VACE1) образуется Аβ. Впоследствии часть Аβ путем экзоцитоза (в том числе в составе синаптических везикул) выбрасывается во внеклеточную среду [3] (рис. 2А). Агрегацию Аβ в токсичные олигомеры и фибриллы усиливают ионы цинка, выбрасываемые из синаптических везикул [36]. Следует отметить, что неамилоидогенное расщепление APP α-секретазой протекает на клеточной поверхности [3].

Связываясь с компонентами мембран, Аβ может вызывать токсические эффекты. В фибробластах больных БА взаимодействие Аβ с плазматической мембраной выше при недостатке холестерина, тогда как высокий уровень холестерина предотвращает вызванную Аβ генерацию активных форм кислорода и окисление липидов [37]. С другой стороны, нарушение долговременной синаптической потенциации и усиление депрессии под влиянием Аβ могут вызываться его связыванием с PrP (метаботропный глутаматный рецептор 5 и LRP1 выступают как корцепторы) и последующей активацией тирозинкиназы Fyn, фосфорилирующей tau. Снижение стабильности рафтов путем удаления холестерина нарушает комплекс PrP-метаботропный глутаматный рецептор 5-LRP1, снижая связывание Аβ с постсинаптическими мембранами [8, 38] (рис. 2А).

В соответствии с одной точкой зрения увеличение уровня мембранного холестерина способствует объединению в рафтах APP, β- и γ-секретаз и увеличению продукции Аβ, а другие авторы полагают, что секретазы и APP распределяются по разным рафтам [3, 34, 39]. Уменьшение содержания мембранного холестерина усиливает расщепление APP α-секретазой, уменьшая образование токсичного Аβ [3]. Однако активация плазминогена, расщепляющего Аβ, в плазмин протекает на поверхности рафтов и, следовательно, их дестабилизация может снизить скорость деградации Аβ [39]. При распаде рафтов содержащиеся в них компоненты, в частности β- и γ-секретазы, попадают в жидкую мембрану, где преимущественно распределен APP, следовательно, продукция Аβ может повышаться [32]. При БА снижается экспрессия гена seladin-1 (selective Alzheimer disease indicator 1), кодирующего фермент, превращающий десмостерол в холестерин. Делеция seladin-1 приводит к снижению уровня холестерина, дезорганизации рафтов и накоплению Аβ. Наоборот, сверхпродукция seladin-1 (например, под влиянием эстрогенов) ускоряет обмен холестерина в мозге, повышает устойчивость нейронов к действию Аβ [40]. Интересно, что нокаут гена кавеолина 1, стабилизирующего рафты, ведет к заболеванию, аналогичному

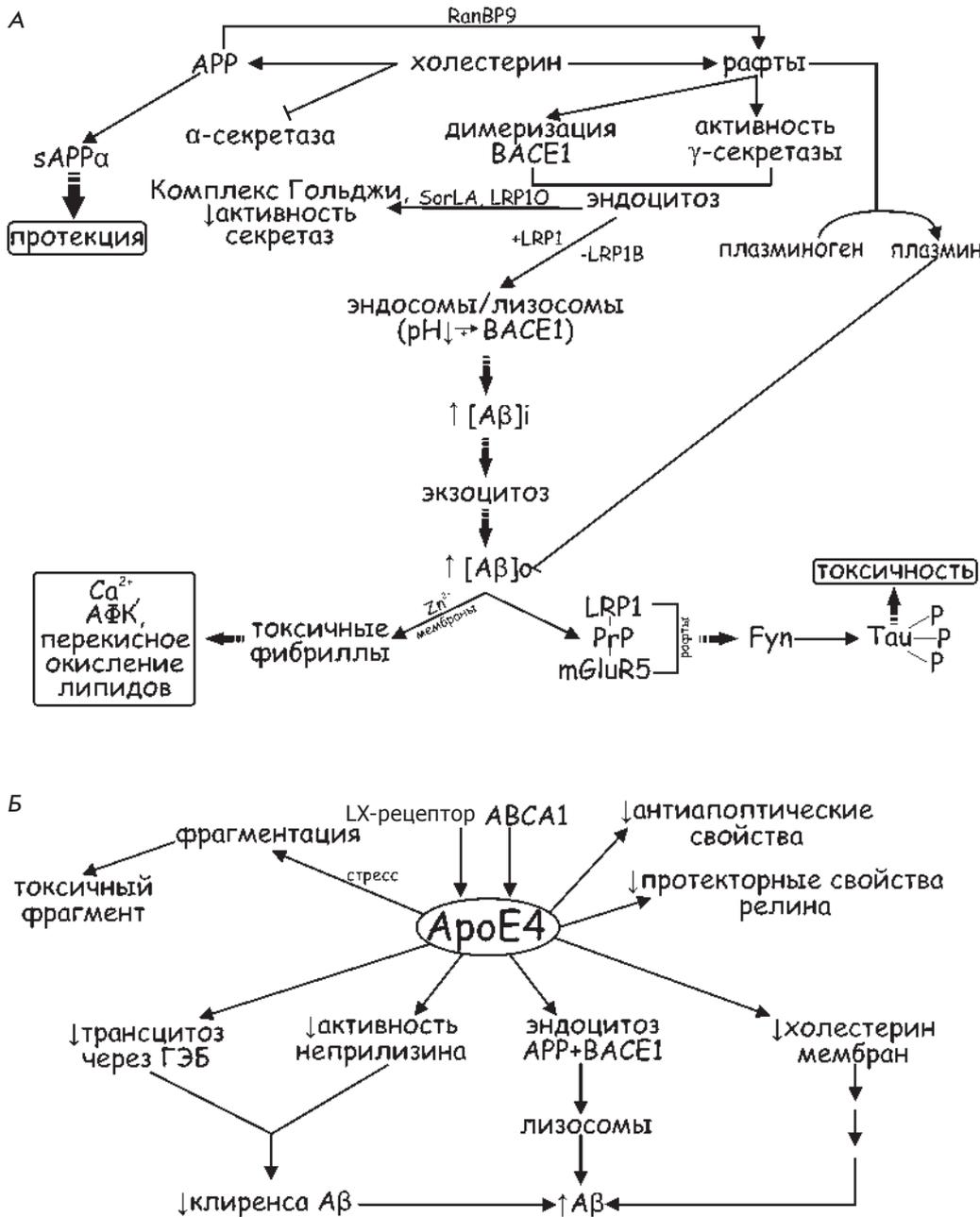


Рис. 2. Холестерин, липидные рафты и ApoE4 в обмене амилоидного пептида β (Aβ). А – роль холестерина и липидных рафтов в продукции и токсичности Aβ. Б – влияние ApoE4 на баланс образования/клиренса Aβ и жизнеспособность нейронов. Подробные объяснения в тексте

БА, которое сопровождается накоплением Aβ и нейродегенерацией. С возрастом снижается количество кавеолина 1 в нейронах и увеличивается текучесть синапсомембранных мембран [41]. При недостатке кавеолина 1 уменьшается содержание холестерина, поскольку кавеолин 1 участвует в доставке вновь синтезированного холестерина в плазматическую мембрану [42].

Некоторые исследования показывают, что фармакологическое снижение содержания холестерина в клетках с его нормальным исходным уровнем ингибирует образование Aβ при сверхэкспрессии APP.

Однако непонятно, насколько это заключение можно экстраполировать к заболеванию или процессу нормального старения, особенно, если принять во внимание уменьшение содержания холестерина в нормальном и патологическом (при БА) стареющем мозге [8]. Более вероятен сценарий, при котором низкое содержание холестерина в нейрональных мембранах в сочетании с увеличенной продукцией Aβ, сниженной деградацией Aβ, усиленным воспалительным ответом участвует в развитии БА [22, 39]. Следует отметить, что лечение статинами не является достоверно эффективным при БА, хотя существенно понижает

уровень холестерина в плазме [43]. В ряде работ показано нарушение когнитивной сферы под влиянием статинов [44], поэтому в январе 2014 г. Управление по надзору за качеством медикаментов США (FDA) выдало рекомендацию о риске применения статинов. Перспективным считают использование фитостеролов при БА, которые *in vitro* уменьшают продукцию А β , подавляя активность и экспрессию β - и γ -секретаз, интернализацию ВАСЕ1 в эндосомы. Эффект фитостеролов на процессинг А β может быть связан с их стимулирующим действием на LXR-рецепторы или способностью аккумулироваться в рафтах, что облегчает релокализацию APP и пресенилина в не-рафт фазу [45].

АроЕ и БА

Низкий уровень АроЕ-частиц в мозгу коррелирует с ростом риска БА, но непонятно, сопряжено ли это с транспортом холестерина или нет. АроЕ, взаимодействуя с рецепторами, запускает антиапоптотические сигнальные пути. АроЕ связывается с А β , затем комплекс при участии LRP перебрасывается через ГЭБ, снижая концентрацию А β в мозге. Взаимодействие А β с АроЕ-частицами усиливается сульфатированными производными галактоцереброзидов, содержание которых снижается в ЦНС при БА [2, 46, 47]. Агонист ядерных ретиноидных рецепторов X, быстро увеличивающий продукцию АроЕ, усиливает деградацию А β и ослабляет образование А β -бляшек [48]. Подобные эффекты оказывают оксистеролы (24-ГХ), стимулирующие LXR-рецепторы, способствующие экспрессии АроЕ, ABCA1, ABCG1 [1, 30].

Известны три изоформы АроЕ человека, которые отличаются друг от друга только одним аминокислотным остатком. Наиболее распространен аллель *АроЕ3*, тогда как *АроЕ4* обнаружен только у 15–20% населения и считается фактором риска БА с поздним началом. Вероятность развития БА у индивидов с одной копией *АроЕ4* в 4 раза, а с двумя – в 12–20 раз выше, чем у носителей аллеля *АроЕ3*. Наличие *АроЕ2*, наоборот, препятствует формированию БА. Почему *АроЕ4* провоцирует заболевание до сих пор не установлено [2, 8]. Существует несколько мнений [2, 5, 48–51]: 1) АроЕ4 слабее связывает А β , менее эффективно обеспечивая клиренс А β ; 2) АроЕ4 образуется в меньшем количестве, быстрее распадается и не формирует димеры, способствующие деградации А β , наоборот, в комплексе с АроЕ4 А β становится устойчивым к разрушению неприлизинами; 3) АроЕ4 менее эффективно поддерживает аксональный рост и выживаемость нейронов; 4) АроЕ4 способствует эндоцитозу APP и ВАСЕ1 и их колокализации в ранних эндосомах, усиливая синтез А β ; 5) АроЕ4 уменьшает

экспрессию в синапсах рецепторов реллина, блокируя его протекторные свойства (рис. 2Б).

При БА в мозге может образовываться С-концевой фрагмент АроЕ, который способствует накоплению нейрофибриллярных пучков. Клеточный стресс *in vitro* может запускать фрагментацию АроЕ с образованием токсичного фрагмента. Причем АроЕ4 более восприимчив к расщеплению, и экспрессия укороченного АроЕ4 ведет к БА-подобной нейродегенерации [8, 52].

Вариации других генов, вовлеченных в метаболизм холестерина, также являются факторами риска развития БА, например, полиморфизм генов рецепторов (LRP1, LRP10, SorLA, АроЕR2) и транспортеров (ABCA1, ABCA7, кластерин) липопротеинов [2]. LRP1 участвует в захвате и очищении от А β , а снижение его экспрессии способствует накоплению А β . Однако LRP1 ускоряет эндоцитоз и направление APP в лизосомы, что может способствовать накоплению А β [53]. Для LRP1В характерна меньшая скорость эндоцитоза, поэтому LRP1В препятствует образованию А β [2]. SorLA/LR11, уровень которого уменьшается при поздних формах БА, взаимодействует с мономерами APP, препятствуя их димеризации, что уменьшает расщепление APP γ - и β -секретазами, предпочтительными использовать в качестве субстрата димеры APP [54]. LRP10 и SorLA усиливают трафик APP в комплекс Гольджи, где секретазы менее активны [55]. Слабая активность ABCA1 может способствовать БА, тогда как сверхэкспрессия снижает накопление А β . При дефиците ABCA1 появляются АроЕ-частицы с низким содержанием липидов и количество АроЕ снижено (~ на 80%); в периферических тканях накапливаются эфиры холестерина [56].

Синаптическая патология при БА

Дисфункции, связанные с нарушением синаптической передачи при БА, представляют собой наиболее ранние события, приводящие к когнитивным расстройствам. На ранних стадиях БА в коре и гиппокампе происходит снижение глутаматергической передачи. Сначала изменяются пресинаптические процессы, а воздействие на постсинаптические рецепторы регистрируется позже. Задолго до образования амилоидных бляшек, элиминации синапсов и гибели нейронов уменьшается синтез важных белков экзо- и эндоцитоза (SNAP-25, синаптофизина, AP-2, AP-180, динамина 1, синаптотагмина) в префронтальной коре, наблюдаются первые когнитивные дефекты [8, 57–59]. Несмотря на разнообразные эффекты АроЕ4 – изменение процессинга APP, снижение клиренса А β , нарушения синаптической пластичности, – существует общий механизм действия АроЕ4 – изменение эндоцитозного рециклирования,

возможно, за счет снижения экспрессии и активности белков эндоцитоза [51]. У пациентов с БА ранние эндосомы в 32 раза больше в объеме, а увеличение эндосом начинается до появления клинических симптомов у носителей *Apoε4* [60]. Леветирацетам, действующий на SV2A белок синаптических везикул, изменяет в обратном направлении дисфункцию эндосомального трафика и усиленный процессинг Aβ, вызванный *ApoE4* [51].

Повышение нейрональной активности увеличивает продукцию Aβ как в норме, так и при патологии (например, эпилепсии). Частично это связано с интенсивным эндоцитозом синаптических везикул, в ходе которого в эндосомы захватываются APP, где происходит его расщепление [61]. Также вскоре после всплеска синаптической активности экспрессируется ранний ген *Arc*, затем белок *Arc* увеличивает ассоциацию γ-секретазы с APP в эндосомах [62]. В ходе везикулярного экзоцитоза образованный Aβ попадает в синаптическую щель, где может регулировать освобождение медиатора и рецепцию (рис. 3). Синаптическая активность может снижать внутринейрональное накопление Aβ за счет увеличения активности неприлизина [63]. Предполагается, что APP/Aβ являются элементами «физиологической» обратной связи, контролирующей синаптическую передачу. Блокирование продукции Aβ у молодых мышей снижало показатели в тестах на память [64]. Сверхпродукция Aβ может быть следствием избыточной/нарушенной синаптической активности. У носителей мутации в гене пресенилина 1 за 15 лет до начала БА наблюдается усиленная активация гиппокампа [65]. До проявления гистологических и когнитивных дефектов может увеличиваться экспрессия/активность риадиноновых рецепторов в нервных терминалах, в итоге увеличивается цитозольный Ca^{2+} и экзоцитоз [59]. *ApoE4* меняет активность мозга в раннем периоде: у носителей аллеля *Apoε4* выше активация гиппокампа в покое и при выполнении тестов на запоминание [66]. *ApoE4* вмешивается в релин-зависимую сигнализацию, которая вовлечена в миграцию, созревание, поддержание жизнеспособности нейронов и синаптическую пластичность [2, 8]. *ApoE4* угнетает эффекты релина, поскольку уменьшает количество доступных ApoE-рецепторов, снижая возвращение рецепторов на мембрану после эндоцитоза, вызванного связыванием с релином и ApoE [50]. Релиновая сигнализация становится восприимчивой к токсичному действию Aβ. Aβ через механизм, связанный с митохондриальной дисфункцией, может активировать каспазу 3, которая (1) стимулирует кальцинейрин (фосфатаза PP2B), дефосфорилирующий NMDA-рецепторы в сайтах фосфорилирования Fyn,

и (2) расщепляет протеинкиназу Akt, ингибирующую GSK3β-киназу [67]. В итоге, в гиппокампе угнетается долговременная потенция в ответ на активацию рецепторов ApoE релином, который в норме вызывает активацию Fyn и ингибирование GSK3β-киназы [50]. Сверхактивность GSK3β-киназы может быть одним из факторов избыточного фосфорилирования tau, что ведет к образованию нейрофибриллярных клубков, которые отсоединяются от микротрубочек и могут диффундировать по нейрону [8, 67].

Эффекты вне- и внутриклеточного Aβ на синаптическую передачу

В синапсах со слабой активностью Aβ (пМ) может активировать пресинаптические α7-никотиновые холинорецепторы, способствующие увеличению цитозольного Ca^{2+} и освобождению нейромедиатора. В высокой дозе Aβ (нМ) может усиливать интернализацию постсинаптических NMDA- и AMPA-рецепторов и долговременную депрессию [58, 68]. Увеличение Aβ, блокируя обратный захват глутамата, ведет к снижению размера кванта и стойкому повышению глутамата в синаптической щели. В результате постсинаптические NMDA-рецепторы десенситизируются, а пресинаптические NMDA и метаботропные глутаматные рецепторы активируются, запуская долговременную депрессию [57]. Aβ связывается с кальциевыми каналами P/Q-типа в пресинапсе, ингибируя освобождение нейромедиатора [69]. Aβ способен формировать Ca^{2+} -пору, вход Ca^{2+} через которую активирует расщепление протеазой кальпаином белка эндоцитоза динамина 1 [70]. При БА увеличивается уровень Cu^{2+} , Aβ в комплексе с Cu^{2+} приобретает способность переводить холестерин в 4-холестен-3-он, содержание которого повышается при БА [36]. Накопление 4-холестен-3-она может ингибировать синаптическую Ca^{2+} -АТФ-азу, нарушать стабильность липидных рафтов и угнетать нейротрансмиттерную передачу [71]. Возможно, Aβ вовлечен в процесс формирования баланса между слабо- и высокоактивными синапсами: «слабоактивные» синапсы в ответ на Aβ увеличивают свои ответы, а высокоактивные синапсы, наоборот, снижают (рис. 3). Стоит отметить, что нервные терминалы старых животных, для которых характерны меньший запас синаптических везикул, слабая активность митохондрий и антиоксидантная защита, более подвержены негативному действию Aβ. При этом ингибирование рециклирования синаптических везикул, вызванное Aβ, существенно снижается на фоне антиоксидантов [72].

Тяжесть БА коррелирует с присутствием Aβ42 внутри нейронов (особенно неокортекса), а депрессия нейротрансмиттерной передачи совпадает по времени с появлением Aβ внутри терминалы задолго до обнаружения вне-

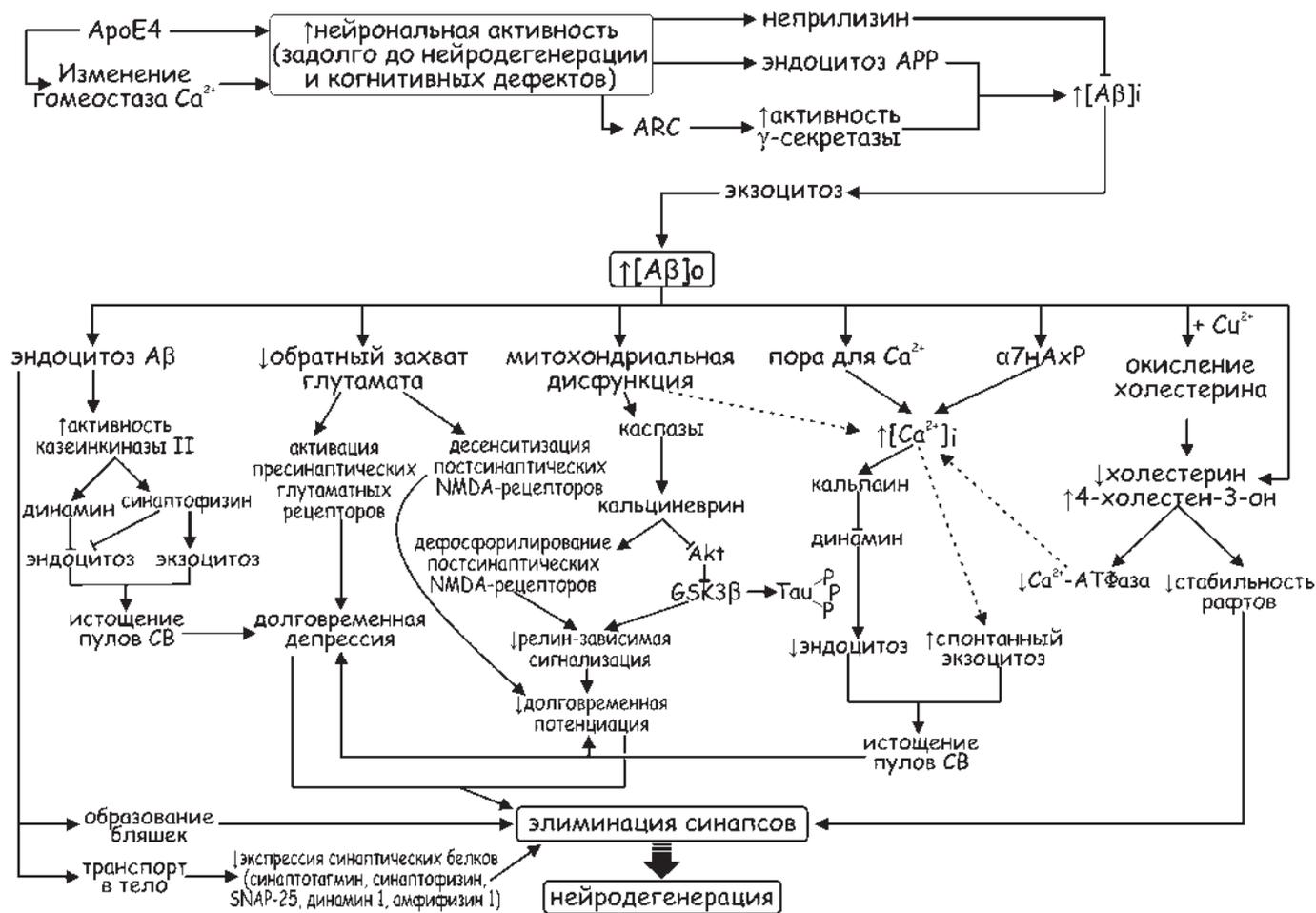


Рис. 3. Механизмы воздействия амилоидного пептида β (Aβ) на синаптическую передачу и пластичность. Роль нейрональной активности в генезе Aβ. Подробные объяснения в тексте

клеточных бляшек [28]. Aβ проникает путем эндоцитоза в нервные окончания, а наличие Aβ42 в составе эндоцитозных везикул активирует казеинкиназу 2, которая, фосфорилируя динамин и синаптофизин, способствует угнетению эндоцитоза и истощению пулов синаптических везикул после активности [73]. Поглощенный в везикулы Aβ, непосредственно взаимодействуя с синаптофизин, нарушает формирование комплекса между синаптофизин и VAMP2, что увеличивает количество праймированных везикул и способствует экзоцитозу [74]. Однако после усиленного экзоцитоза эндоцитоз протекает ослабленно, так как взаимодействие синаптофизина/VAMP2 важно в эндоцитозе. Хроническое введение Aβ в нетоксичных концентрациях угнетает освобождение глутамата нейронами гиппокампа за счет снижения размера готового к освобождению и рециклирующего пулов [75]. Возможно, это также связано с тем, что Aβ42 в составе эндосом способен

перемещаться при помощи аксонального транспорта из нервных окончаний в тело нейрона и угнетать экспрессию белков экзоцитоза и эндоцитоза: SNAP-25, синаптотагмина, синаптофизина, динамина 1 и амфифизина 1 [57, 58]. Поглощенные путем эндоцитоза Aβ при попадании в мультивезикулярные тельца нейронов образуют фибриллы, протыкающие мембрану, провоцируя гибель клетки. Затем эти фибриллы формируют бляшки [76]. В целом, многие исследования указывают на эндоцитоз как на ключевой элемент, с которым связаны образование, элиминация и токсичность Aβ.

БОЛЕЗЬ ПАРКИНСОНА (БП)

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, для которого характерны тремор, заторможенность движений, ригидность, когнитивные нарушения. Как и при БА, существенно меньше случаев БП связано с мутациями

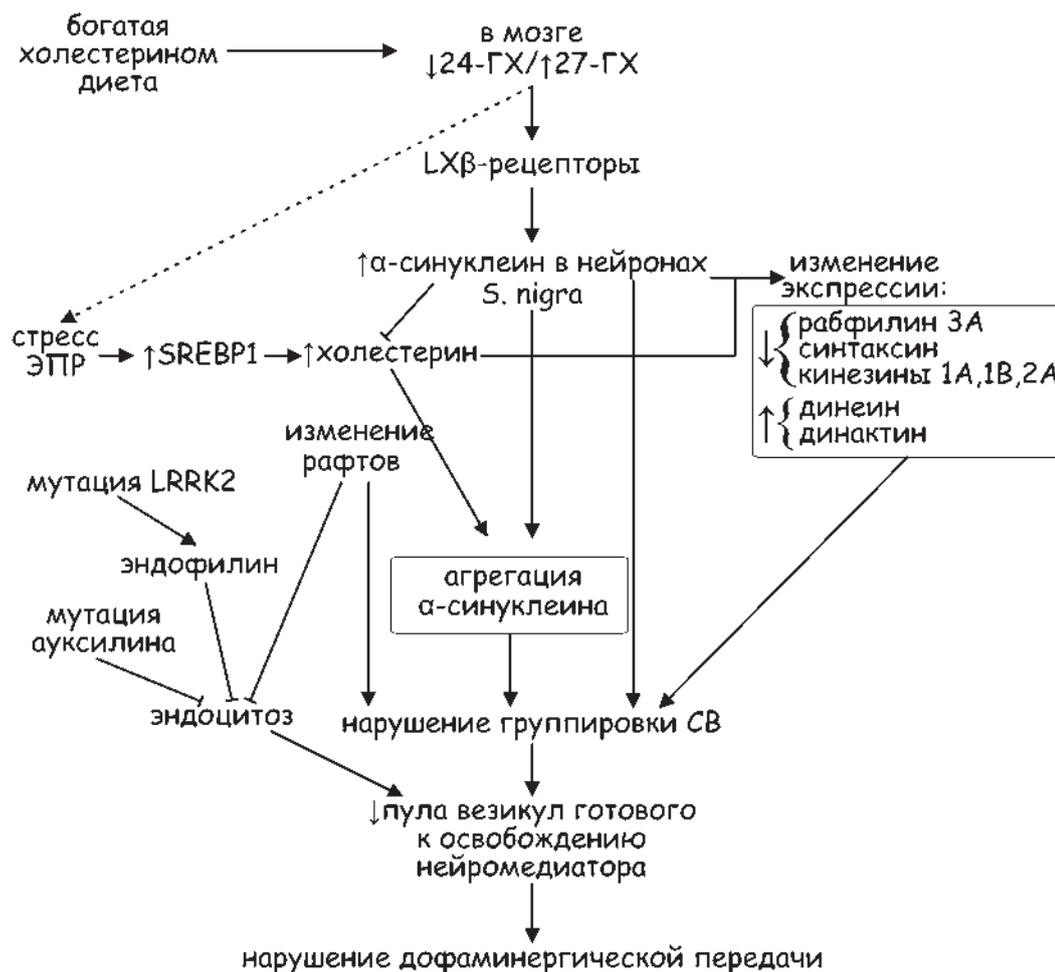


Рис. 4. Взаимосвязь холестерина, α-синуклеина и альтераций в пресинаптических процессах с дисфункцией дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона. Подробные объяснения в тексте

специфичных генов, в частности α-синуклеина, паркина, LRRK2, PINK1, DJ-1, АТР13А2. Особенностью БП является накопление в нейронах α-синуклеина в составе белковых включений – телец Леви. При этом страдают дофаминергические нейроны черной субстанции среднего мозга. Стоит отметить, что у 60% пациентов с БА постмортально обнаруживаются отложения α-синуклеина в амигдале, а у некоторых пациентов с БП в мозге накапливается Аβ [8, 19, 30, 77]. Это предполагает, что специфические пути, ведущие к развитию БП или БА, конвергируют, приводя к появлению общих признаков.

Роль холестерина в БП остается дискуссионной (рис. 4). Исследование рафтов, выделенных из фронтальной коры субъектов с ранней стадией БП, выявило снижение полиненасыщенных жирных кислот без изменения в содержании холестерина и сфингомиелина [78]. Однако α-синуклеин содержит два холестеринсвязывающих домена, и холестерин влияет на его агрегацию [41]. Теоретически синуклеин способен нарушать целостность рафтов, взаимодействуя с холестерином мембран [1]. Истощение холестерина

(с помощью метил-β-циклодекстрина) уменьшает содержание α-синуклеина в мембранах и его накопление в телах/синапсах нейронов. Статины ингибируют агрегацию α-синуклеина в культуре нейронов, а добавление экзогенного холестерина увеличивает агрегацию α-синуклеина, подавляя рост нейронов [79]. Лишение питания (на модели 3D5-клеток) вызывает агрегацию α-синуклеина и апоптоз, что связано со стрессом ЭПР и активацией SREBP1 с последующим усилением синтеза холестерина [80]. При БП в мозге увеличивается содержание ряда оксистеролов, образующихся под влиянием активных форм кислорода [81]. Обогащенная холестерином диета, не изменяя уровня мозгового холестерина, вызывает снижение соотношения 24-ГХ:27-ГХ в мозге и увеличивает уровень α-синуклеина в черной субстанции. 27-ГХ способствует, а 24ГХ препятствует увеличению концентрации α-синуклеина в клетках SH-SY5Y нейробластомы человека. Причем 27-ГХ оказывает такой эффект через активацию LXβ-рецепторов, которые затем связываются с промотором гена α-синуклеина [19].

При БП задолго до гибели нейронов угнетается освобождение дофамина. Мутации и дубликации/трипликации гена α -синуклеина вызывают БП с ранним началом. α -Синуклеин концентрируется в нервных окончаниях и связывается с синаптическими везикулами. В норме синуклеин важен для группировки везикул в активной зоне, связываясь одновременно с синаптобревином-2 одной везикулы и фосфолипидами мембраны другой. Мутация α -синуклеина может снижать его кластеризующую способность, а сверхэкспрессия вызывает массивную агрегацию синаптических везикул, в итоге и то и другое ведет к уменьшению размеров готового к освобождению пула [82]. Сверхэкспрессия α -синуклеина способствует его интенсивному взаимодействию с мембранами синаптических везикул и мультивезикулярных телец и нарушению их работы [83]. При сверхэкспрессии мутантного α -синуклеина уровень белков, вовлеченных в экзоцитоз и везикулярный транспорт, значительно изменяется (уменьшается количество рабфилина 3А, синтаксина, кинезинов 1А, 1В, 2А; возрастает концентрация динеина, динактина 1) в черной субстанции и стриатуме [82]. Значительное снижение уровней транскриптов (динамин 2, AP-2, синтаксин-2, VAMPА, VAMP4), вовлеченных в везикулярный трафик, обнаружено в периферической крови у пациентов с первой стадией БП [84].

При наследственной форме БП, связанной с мутацией в гене *LRRK2* (киназа, содержащая богатый лейцином повтор), в самом начале заболевания нарушается трафик синаптических везикул. *LRRK2* в норме фосфорилирует эндофинлин, угнетая его ассоциацию с мембраной. При этом как ее избыточная, так и недостаточная активность затрудняют экзоцитоз синаптических везикул [85]. Ювенильная форма БП возникает при мутации в ауксилине, участвующем в разборке клатринового покрытия при эндоцитозе.

РАССТРОЙСТВА АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА (РАС)

Расстройства аутистического спектра (РАС) характеризуются значительными аномалиями в социальном взаимодействии, сложностями в коммуникации, стереотипными поведенческими паттернами. Эти расстройства могут возникать в результате генетических альтераций, пренатального воздействия вирусов и токсинов, взаимодействий иммунных систем матери и плода [30]. РАС часто ассоциируются с такими наследственными заболеваниями, как синдром Ретта и ломкой X-хромосомы, нейрофиброматоз типа 1, туберозный склероз, фенилкетонурия, синдром Смита–Лемли–Опица.

Недавно появились сведения о связи метаболизма холестерина и патогенеза ряда РАС. Синдром

Ретта, который поражает преимущественно женщин (1/10000), часто связан с мутациями в X-сцепленном гене метил-СрG-связывающего белка 2 (*MeCP2*). *MeCP2* взаимодействует с метилированной ДНК в ядре и рекрутирует различные транскрипционные факторы, регулируя транскрипцию генов, в том числе вовлеченных в гомеостаз холестерина. При синдроме Ретта общий уровень холестерина, липопротеинов высокой и низкой плотности повышен, а экспрессия скавенджер рецептора *B1*, отвечающего за захват холестерина, снижена [86]. Экспрессия генов, вовлеченных в метаболизм холестерина, была несколько повышена в мозге у однопольных мышей с мутацией *MeCP2/Y*. В 2-месячном возрасте у этих мышей общее содержание холестерина в мозге увеличивалось, однако продукция холестерина была подавлена, вероятно, в результате активации отрицательной обратной связи. В результате к 70 дню постнатального развития концентрация холестерина возвращалась к нормальному уровню. Снижение продукции холестерина (опосредованное мутацией в гене *Sqle*/скваленэпоксидазы или статинами) у мутантных мышей *MeCP2/Y* препятствовало прогрессированию заболевания [87]. Лечение женщин с синдромом Ретта статинами также улучшает их состояние. Следовательно, ранние нарушения метаболизма холестерина при синдроме Ретта могут вносить вклад в поведенческий фенотип и уменьшение выживаемости [86]. Следует отметить, что статины также ингибируют синтез изопреноидных посредников (фарнезилпирофосфата и убихинонов), воздействуя на такие модификации белков, как пренилирование, которое важно для функционирования сигнальных белков, например *Ras* [88].

Статины эффективны при синдроме ломкой X-хромосомы и нейрофиброматозе типа 1 [88]. Синдром ломкой X – одна из известных причин (1/4000) умственной отсталости и аутизма. Этот синдром возникает из-за экспансии CGC-повтора (больше 200 повторов, полная мутация) в промоторе гена *FMR1* (*fragile X mental retardation 1*), ведущей к гиперметилованию и подавлению транскрипции гена *FMR1* [30]. Снижение продукции белка *FMR* (РНК-связывающий белок, подавляющий в дендритах трансляцию, вызванную активацией ряда рецепторов) способствует усилению синтеза некоторых белков, вовлеченных в нейропередачу. В животных моделях синдрома ломкой X выявлена аномально высокая активность метаболитных глутаматных рецепторов группы I (мГР-I). Кавеолин 1 и содержание мембранного холестерина могут регулировать сигнализацию и трафик этих рецепторов [42]. Под влиянием статинов в нейронах мутантных мышей ослабляется как сигнализация, опосредуемая мГР-I,

так и аномально усиленный синтез белков, феномены долговременной депрессии в гиппокампе, аудиогенные припадки и гипервозбудимость зрительной коры [88]. При синдроме ломкой Х в крови снижен уровень общего холестерина, липопротеинов низкой и высокой плотности, что может быть связано с влиянием потери белка FMR на гены, регулирующие липидный метаболизм (ApoE, Gsk3B, Setd2, Mtmr3, March8, Abca1) [89].

РАС тесно связаны с синаптической дисфункцией. Черты РАС обычно появляются в раннем детстве, когда сенсорный опыт модифицирует развитие и баланс возбуждения/торможения, поэтому предполагается, что нарушение соотношения глутамат/ГАМКергической передачи может вносить вклад в РАС. Синаптическая теория развития РАС началась с выявления мутации, ведущей к заболеванию, в генах нейрוליгина, молекулы постсинаптической адгезии. Затем было обнаружено, что многие гены предрасположенности к аутизму кодируют синаптические белки [90]. Мутации пресинаптических молекул адгезии – нейрексинов – угнетают экзоцитоз синаптических везикул в синапсах гиппокампа и вызывают аномалии социального поведения. Нарушение белка CASP2, регулирующего освобождение электронно-плотных гранул с нейропепти-

дами (нейротрофин-3, мозговой нейротрофический фактор) и моноаминами, увеличивает риск развития аутизма [91]. При мутации в гене *Mesp2* снижается уровень синаптических белков, в том числе синапсина, и везикулярного переносчика глутамата. Также наблюдается снижение экспрессии ГАМК-синтезирующего фермента GAD и размера кванта нейромедиатора в ГАМКергических синапсах [92]. При синдроме ломкой Х происходит снижение экспрессии $\alpha 5$ - и γ -субъединиц рецепторов ГАМК-А и тонических токов через эти рецепторы. Мыши без релина, в норме экспрессирующегося в кортикальных интернейронах, имеют фенотип РАС и сниженный круговорот ГАМК [93]. Генетический полиморфизм белка экзоцитоза SNAP-25, мутации пресинаптических синапсина 1, 2 и белка активной зоны – RIMS3, влияющие на освобождение нейромедиатора, связаны с вероятностью возникновения аутизма. Мутации в постсинаптических белках IL1RAPL1 и SynGAP1, вовлеченных в формирование синапса, также ассоциированы с РАС [91].

Работа поддержана грантом РФФИ (№ 14-04-00094), а также частично грантами РФФИ (№ 16-34-00127) и РНФ (№ 14-15-00847).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Petrov A.M., Kasimov M.R., Zefirov A.L. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 1. P. 58–73.
- Bu G. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. № 5. P. 333–344.
- Di Paolo G., Kim T.W. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2011. V. 12. № 5. P. 284–296.
- Mawuenyega K.G., Sigurdson W., Ovod V., Munsell L., Kasten T., Morris J.C., Yarasheski K.E., Bateman R.J. // *Science*. 2010. V. 330. № 6012. P. 1774.
- Nalivaeva N., Belyaev N.D., Kerridge C., Turner A.J. // *Front. Aging Neurosci.* 2014. V. 6. A.235.
- Sparks D.L., Scheff S.W., Hunsaker J.C. 3rd, Liu H., Landers T., Gross D.R. // *Exp. Neurol.* 1994. V. 126. № 1. P. 88–94.
- Ghribi O., Larsen B., Schrag M., Herman M.M. // *Exp. Neurol.* 2006. V. 200. № 2. P. 460–467.
- Martin M.G., Ahmed T., Korovaichuk A., Venero C., Menchón S.A., Salas I., Munck S., Herreras O., Balschun D., Dotti C.G. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6. № 7. P. 902–917.
- Reed B., Villeneuve S., Mack W., DeCarli C., Chui H.C., Jagust W. // *JAMA Neurol.* 2014. V. 71. № 2. P. 195–200.
- Kitaguchi H., Tomimoto H., Ihara M., Shibata M., Uemura K., Kalaria R.N., Kihara T., Asada-Utsugi M., Kinoshita A., Takahashi R. // *Brain Res.* 2009. V. 1294. P. 202–210.
- Leoni V., Caccia C. // *Biochimie*. 2013. V. 95. № 3. P. 595–612.
- Hughes T.M., Kuller L.H., Lopez O.L., Becker J.T., Evans R.W., Sutton-Tyrrell K., Rosano C. // *J. Alzheimers Dis.* 2012. V. 30. № 1. P. 53–61.
- Hudry E., van Dam D., Kulik W., De Deyn P.P., Stet F.S., Ahouansou O., Benraiss A., Delacourte A., Bougnères P., Aubourg P. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 1. P. 44–53.
- Wang L., Schuster G.U., Hultenby K., Zhang Q., Andersson S., Gustafsson J.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 21. P. 13878–13883.
- Fitz N.F., Castranio E.L., Carter A.Y., Kodali R., Lefterov I., Koldamova R. // *J. Alzheimers Dis.* 2014. V. 41. № 2. P. 535–549.
- Matsuda A., Nagao K., Matsuo M., Kioka N., Ueda K. // *J. Neurochem.* 2013. V. 126. № 1. P. 93–101.
- Gosset F., Saint-Pol J., Fenart L. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 446. № 3. P. 687–691.
- Heverin M., Bogdanovic N., Lütjohann D., Bayer T., Pikuleva I., Bretillon L., Diczfalusy U., Winblad B., Björkhem I. // *J. Lipid Res.* 2004. V. 45. № 1. P. 186–193.
- Marwarha G., Ghribi O. // *Exp. Gerontol.* 2014. pii: S0531-5565(14)00270-8.
- Mason R.P., Shoemaker W.J., Shajenko L., Chambers T.E., Herbert L.G. // *Neurobiol. Aging*. 1992. V. 13. № 3. P. 413–419.
- Molander-Melin M., Blennow K., Bogdanovic N., Dellheden B., Månsson J.E., Fredman P. // *J. Neurochem.* 2005. V. 92. № 1. P. 171–182.
- Abad-Rodríguez J., Ledesma M.D., Craessaerts K., Perga S., Medina M., Delacourte A., Dingwall C., De Strooper B., Dotti C.G. // *J. Cell Biol.* 2004. V. 167. № 5. P. 953–960.
- Gylys K.H., Fein J.A., Yang F., Miller C.A., Cole G.M. // *Neurobiol. Aging*. 2007. V. 28. № 1. P. 8–17.
- Pierrot N., Tyteca D., D'auria L., Dewachter I., Gailly P., Hendrickx A., Tasiaux B., Haylani L.E., Muls N., N'kuli F. // *EMBO Mol. Med.* 2013. V. 5. № 4. P. 608–625.
- Evangelisti E., Zampagni M., Cascella R., Becatti M., Fiorillo C., Caselli A., Bagnoli S., Nacmias B., Cecchi C. // *J. Alzheimers Dis.* 2014. V. 41. № 1. P. 289–300.

26. Sodero A.O., Vriens J., Ghosh D., Stegner D., Brachet A., Pallotto M., Sassoè-Pognetto M., Brouwers J.F., Helms J.B., Nieswandt B. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 7. P. 1764–1773.
27. Sodero A.O., Weissmann C., Ledesma M.D., Dotti C.G. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 6. P. 1043–1053.
28. Gómez-Ramos P., Asunción Morán M. // *J. Alzheimers Dis.* 2007. V. 11. № 1. P. 53–59.
29. Bryleva E.Y., Rogers M.A., Chang C.C., Buen F., Harris B.T., Rousselet E., Seidah N.G., Oddo S., LaFerla F.M., Spencer T.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. P. 3081–3086.
30. Anchisi L., Dessi S., Pani A., Mandas A. // *Front Physiol.* 2013. V. 3. P. 1–12.
31. Lathe R., Saprova A., Kotelevtsev Y. // *BMC Geriatrics.* 2014. V. 14. A. 36.
32. Rushworth J.V., Hooper N.M. // *Int. J. Alzheimers. Dis.* 2011. P. 603052.
33. Matsuzaki K. // *Int. J. Alzheimers Dis.* 2011. V. 2011. P. 956104.
34. Barrett P.J., Song Y., van Horn W.D., Hustedt E.J., Schafer J.M., Hadziselimovic A., Beel A.J., Sanders C.R. // *Science.* 2012. V. 336. P. 1168–1171.
35. Woo J.A., Roh S.E., Lakshmana M.K., Kang D.E. // *FASEB J.* 2012. V. 26. № 4. P. 1672–1681.
36. Puglielli L., Friedlich A.L., Setchell K.D., Nagano S., Opazo C., Cherny R.A., Barnham K.J., Wade J.D., Melov S., Kovacs D.M., Bush A.I. // *J. Clin. Invest.* 2005. V. 115. № 9. P. 2556–2563.
37. Pensalfini A., Zampagni M., Liguri G., Becatti M., Evangelisti E., Fiorillo C., Bagnoli S., Cellini E., Nacmias B., Sorbi S., Cecchi C. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 2. P. 210–222.
38. Rushworth J.V., Griffiths H.H., Watt N.T., Hooper N.M. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 13. P. 8935–8951.
39. Ledesma M.D., Abad-Rodríguez J., Galvan C., Biondi E., Navarro P., Delacourte A., Dingwall C., Dotti C.G. // *EMBO Rep.* 2003. V. 4. № 12. P. 1190–1196.
40. Sarajärvi T., Haapasalo A., Viswanathan J., Mäkinen P., Laitinen M., Soininen H., Hiltunen M. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 49. P. 34433–34443.
41. Head B.P., Peart J.N., Panneerselvam M., Yokoyama T., Pearn M.L., Niesman I.R., Bonds J.A., Schilling J.M., Miyahara A., Headrick J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. P. e15697.
42. Stary C.M., Tsutsumi Y.M., Patel P.M., Head B.P., Patel H.H., Roth D.M. // *Front. Physiol.* 2012. V. 3. P. 393.
43. Sano M., Bell K.L., Galasko D., Galvin J.E., Thomas R.G., van Dyck C.H., Aisen P.S. // *Neurology.* 2011. V. 77. P. 556–563.
44. Schilling J.M., Cui W., Godoy J.C., Risbrough V.B., Niesman I.R., Roth D.M., Patel P.M., Drummond J.C., Patel H.H., Zemljic-Harph A.E., Head B.P. // *Behav. Brain Res.* 2014. V. 267. P. 6–11.
45. Burg V.K., Grimm H.S., Rothhaar T.L., Grösgen S., Hunds-dörfer B., Hauptenthal V.J., Zimmer V.C., Mett J., Weingärtner O., Laufs U. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 41. P. 16072–16087.
46. Vance J.E. // *Disease Models Mechanisms.* 2012. V. 5. P. 746–755.
47. Lane-Donovan C., Philips G.T., Herz J. // *Neuron.* 2014. V. 83. № 4. P. 771–787.
48. Cramer P.E., Cirrito J.R., Wesson D.W., Lee C.Y., Karlo J.C., Zinn A.E., Casali B.T., Restivo J.L., Goebel W.D., James M.J., et al. // *Science.* 2012. V. 335. P. 1503–1506.
49. Hayashi H. // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34. № 4. P. 453–461.
50. Durakoglugil M.S., Chen Y., White C.L., Kavalali E.T., Herz J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 37. P. 15938–15943.
51. Rhinn H., Fujita R., Qiang L., Cheng R., Lee J.H., Abeliovich A. // *Nature.* 2013. V. 500. № 7460. P. 45–50.
52. Harris F.M., Brecht W.J., Xu Q., Tesseur I., Kekoni L., Wyss-Coray T., Fish J.D., Masliah E., Hopkins P.C., Scearce-Levie K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 19. P. 10966–10971.
53. Liu Q., Trotter J., Zhang J., Peters M.M., Cheng H., Bao J., Han X., Weeber E.J., Bu G. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 50. P. 17068–17078.
54. Schmidt V., Baum K., Lao A., Rateitschak K., Schmitz Y., Teichmann A., Wiesner B., Petersen C.M., Nykjaer A., Wolf J. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 1. P. 187–200.
55. Brodeur J., Thériault C., Lessard-Beaudoin M., Marcil A., Dahan S., Lavoie C. // *Mol. Neurodegener.* 2012. V. 7. P. 31.
56. Karasinska J.M., de Haan W., Franciosi S., Ruddell P., Fan J., Krut J.K., Stukas S., Lütjohann D., Gutmann D.H., Wellington C.L. // *Neurobiol. Dis.* 2013. V. 54. P. 445–455.
57. Palop J.J., Mucke L. // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 7. P. 812–818.
58. Sheng M., Sabatini B.L., Südhof T.C. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 5. pii: a005777.
59. Chakroborty S., Kim J., Schneider C., Jacobson C., Molgó J., Stutzmann G.E. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 24. P. 8341–8353.
60. Israel M.A., Yuan S.H., Bardy C., Reyna S.M., Mu Y., Herrera C., Hefferan M.P., van Gorp S., Nazor K.L., Boscolo F.S. // *Nature.* 2012. V. 482. № 7384. P. 216–220.
61. Cataldo A.M., Barnett J.L., Pieroni C., Nixon R.A. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 16. P. 6142–6151.
62. Wu J., Petralia R.S., Kurushima H., Patel H., Jung M.Y., Volk L., Chowdhury S., Shepherd J.D., Dehoff M., Li Y. // *Cell.* 2011. V. 147. № 3. P. 615–628.
63. Tampellini D., Rahman N., Gallo E.F., Huang Z., Dumont M., Capetillo-Zarate E., Ma T., Zheng R., Lu B., Nanus D.M. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 31. P. 9704–9713.
64. Puzzo D., Privitera L., Fa' M., Staniszewski A., Hashimoto G., Aziz F., Sakurai M., Ribe E.M., Troy C.M., Mercken M. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. № 5. P. 819–830.
65. Quiroz Y.T., Budson A.E., Celone K., Ruiz A., Newmark R., Castrillón G., Lopera F., Stern C.E. // *Ann. Neurol.* 2010. V. 68. № 6. P. 865–875.
66. Dean D.C. 3rd, Jerskey B.A., Chen K., Protas H., Thiyyagura P., Roontiva A., O'Muircheartaigh J., Dirks H., Waskiewicz N., Lehman K., Siniard A.L. // *JAMA Neurol.* 2014. V. 71. № 1. P. 11–22.
67. Jo J., Whitcomb D.J., Olsen K.M., Kerrigan T.L., Lo S.C., Brum-Cier G., Dickinson B., Scullion S., Sheng M., Collingridge G., Cho K. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. № 5. P. 545–547.
68. Bezprozvanny I.B. // *Acta Naturae.* 2010. V. 2. № 1(4). P. 72–80.
69. Nimrich V., Grimm C., Draguhn A., Barghorn S., Lehmann A., Schoemaker H., Hillen H., Gross G., Ebert U., Bruehl C. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 4. P. 788–797.
70. Sinjoanu R.C., Kleinschmidt S., Bitner R.S., Brioni J.D., Moeller A., Ferreira A. // *Neurochem. Int.* 2008. V. 53. № 3–4. P. 79–88.
71. Kasimov M.R., Giniatullin A.R., Zefirov A.L., Petrov A.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1851. № 5. P. 674–685.
72. Quiroz-Baez R., Flores-Domínguez D., Arias C. // *Curr. Alzheimer Res.* 2013. V. 10. № 3. P. 324–331.
73. Moreno H., Yu E., Pigino G., Hernandez A.I., Kim N., Moreira J.E., Sugimori M., Llinás R.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 14. P. 5901–5906.
74. Russell C.L., Semerdjieva S., Empson R.M., Austen B.M., Beesley P.W., Alifragis P. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. P. e43201.
75. Parodi J., Sepúlveda F.J., Roa J., Opazo C., Inestrosa N.C., Aguayo L.G. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 4. P. 2506–2514.

76. Friedrich R.P., Tepper K., Rönicke R., Soom M., Westermann M., Reymann K., Kaether C., Fändrich M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 5. P. 1942–1947.
77. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // *Neuroscience*. 2011. V. 181. P. 175–188.
78. Fabelo N., Martín V., Santpere G., Marín R., Torrent L., Ferrer I., Díaz M. // *Mol. Med.* 2011. V. 17. № 9–10. P. 1107–1118.
79. Bar-On P., Crews L., Koob A. O., Mizuno H., Adame A., Spencer B., Masliah E. // *J. Neurochem.* 2008. V. 105. P. 1656–1667.
80. Jiang P., Gan M., Lin W.L., Yen S.H. // *Front. Aging Neurosci.* 2014. V. 6. P. 1–12.
81. Brown A.J., Jessup W. // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 3. P. 111–122.
82. Diao J., Burré J., Vivona S., Cipriano D.J., Sharma M., Kyoung M., Südhof T.C., Brunger A.T. // *Elife*. 2013. V. 2. P. e00592.
83. Boassa D., Berlanga M.L., Yang M.A., Terada M., Hu J., Bushong E.A., Hwang M., Masliah E., George J.M., Ellisman M.H. // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. № 6. P. 2605–2615.
84. Alieva A.Kh., Shadrina M.I., Filatova E.V., Karabanov A.V., Illarioshkin S.N., Limborska S.A., Slominsky P.A. // *Biomed. Res. Int.* 2014. Article ID 718732.
85. Matta S., van Kolen K., da Cunha R., van den Bogaart G., Mandemakers W., Miskiewicz K., De Bock P.J., Morais V.A., Vilain S., Haddad D. // *Neuron*. 2012. V. 75. № 6. P. 1008–1021.
86. Nagy G., Ackerman S.L. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 9. P. 965–967.
87. Buchovecky C.M., Turley S.D., Brown H.M., Kyle S.M., McDonald J.G., Liu B., Pieper A.A., Huang W., Katz D.M., Russell D.W., Shendure J. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. № 9. P. 1013–1020.
88. Osterweil E.K., Chuang S.C., Chubykin A.A., Sidorov M., Bianchi R., Wong R.K., Bear M.F. // *Neuron*. 2013. V. 77. № 2. P. 243–250.
89. Berry-Kravis E., Levin R., Shah H., Mathur S., Darnell J.C., Ouyang B. // *Am. J. Med. Genet. A*. 2015. V. 167A. № 2. P. 379–384.
90. Qiu S., Aldinger K.A., Levitt P. // *Dev. Neurosci.* 2012. V. 34. № 2–3. P. 88–100.
91. Shinoda Y., Sadakata T., Furuichi T. // *Exp. Anim.* 2013. V. 62. № 2. P. 71–78.
92. Nguyen M.V., Du F., Felice C.A., Shan X., Nigam A., Mandel G., Robinson J.K., Ballas N. // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. № 29. P. 10021–10034.
93. Cea-Del Rio C.A., Huntsman M.M. // *Front Cell Neurosci.* 2014. V. 8. P. 245.

УДК 576.5, 577.27

Сфероиды HER2-положительной аденокарциномы молочной железы человека как модель для тестирования противоопухолевых иммунотоксинов

И. В. Балалаева^{1,2*}, Е. А. Соколова^{1,2}, А. Д. Пужихина¹, А. А. Брилкина¹, С. М. Деев^{1,2,3}¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10³Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30

*E-mail: irin-b@mail.ru

Поступила в редакцию 22.08.2016

Принята к печати 18.11.2016

РЕФЕРАТ Ответ опухоли на терапевтическое воздействие во многом определяется ее гетерогенностью и межклеточными контактами, которые затрудняют проникновение крупных молекул в глубь трехмерной структуры. В связи с этим все большее распространение получают трехмерные модели опухолей *in vitro*, такие, как сфероиды опухолевых клеток. Нами получены сфероиды аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3, сверхэкспрессирующей онкомаркер HER2. Показано, что токсичность HER2-специфичного противоопухолевого иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении сфероидов на несколько порядков ниже, чем для монослойной культуры той же линии клеток. Существенную разницу в выраженности действия иммунотоксина можно объяснить его неэффективным проникновением в глубь сфероида и воздействием только на клетки внешних слоев. Полученная модель опухолевого сфероида может быть использована как при разработке препаратов для таргетной терапии, так и при исследовании путей повышения эффективности противоопухолевых агентов за счет направленного воздействия на межклеточные контакты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА иммунотоксин 4D5scFv-PE40, онкомаркер HER2/неу, сфероиды, проникновение терапевтического агента в опухоль, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HER2 – рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 2); scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (single-chain variable fragment); PE40 – 40 кДа фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (*Pseudomonas* exotoxin A); ДМСО – диметилсульфоксид; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

Сложная структура солидных опухолей *in vivo* создает объективные трудности в исследовании опухолевого процесса и оценке терапевтического потенциала противоопухолевых препаратов *in vitro*. Использование с этой целью монослойной культуры опухолевых клеток, несмотря на ее широчайшее распространение, не отражает ряда особенностей реальной опухоли, прежде всего, ее трехмерной организации. Трехмерное строение опухоли предполагает существование многочисленных межклеточных контактов, а также значительных градиентов концентрации газов, питательных веществ и катаболитов

по всему объему образования, способствуя формированию специфического микроокружения клеток различных слоев. В свою очередь, это приводит к гетерогенности клеточных популяций в опухоли, выражающейся в варьировании профилей экспрессии генов и метаболизма. Гетерогенность опухоли во многом определяет ответ новообразования на терапевтическое воздействие. Кроме того, наличие межклеточных контактов затрудняет проникновение крупных молекул внутрь опухоли, в результате чего на эффективность лекарственных препаратов влияет их способность к диффузии через опухолевую массу [1]. В связи с этим все большее распространение по-

лучают трехмерные модели опухоли *in vitro*, такие, как сфероиды опухолевых клеток. Многоклеточные опухолевые сфероиды представляют собой плотные конгломераты опухолевых клеток и воспроизводят аваскулярную стадию развития опухолевого узла, т.е. небольшую первичную опухоль, ранний метастаз или зону опухоли, расположенную далеко от сосуда. Структурная близость сфероида к реальной опухоли обуславливает большую релевантность данной модели, позволяя с ее помощью более корректно оценивать противоопухолевый эффект исследуемых агентов в условиях *in vitro* [2, 3]. Учитывая стремительное развитие таргетной (направленной) терапии [4], актуально получение и использование сфероидов клеток, экспрессирующих молекулярные мишени, определяющие специфичность исследуемого таргетного агента.

Нами получены сфероиды аденокарциномы молочной железы человека, сверхэкспрессирующей рецептор-мишень HER2, и показана информативность использования данной модели для оценки глубины проникновения HER2-специфичного иммунотоксина 4D5scFv-PE40 и его противоопухолевого эффекта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение сфероидов аденокарциномы молочной железы человека

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека SKBR-3 (номер по каталогу ATCC – HTB-30), характеризующиеся сверхэкспрессией рецептора HER2 [5]. Клетки культивировали в среде McCoy's 5A, содержащей 1.5 mM глутамин (HyClone, США), с добавлением 10% (v/v) эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США), при 37°C и 5% CO₂. Для снятия клеток с подложки использовали раствор Версена («ПанЭко», Россия).

Сфероиды получали тремя способами. В первом варианте использовали 96-луночный культуральный планшет со стандартной адгезией поверхности (Corning, США), предварительно покрытый 1% раствором агарозы (AppliChem, Германия), приготовленным на дистиллированной воде (50 мкл на лунку). Во втором и третьем вариантах использовали 96-луночные планшеты из пластика со сверхнизкой адсорбцией Ultra Low Attachment Microplate с плоским и круглым дном соответственно (Corning, США). Во всех вариантах суспензию клеток SKBR-3 вносили в лунки соответствующих планшетов в количестве 200 клеток на лунку.

Изображения сфероидов получали методом фазового контраста на инвертированном микроскопе Axiovert 200 с использованием объектива EC Plan-Neofluar 10 × /0.3 (Carl Zeiss, Германия). Объем фор-

мировавшихся сфероидов (V , мкм³) рассчитывали по формуле: $V = a \times b^2 / 2$, где a – больший диаметр (мкм), b – меньший диаметр (мкм).

Получение иммунотоксина 4D5scFv-PE40

Рекомбинантный иммунотоксин 4D5scFv-PE40 [6] нарабатывали в клетках *Escherichia coli* штамма BL21(DE3), трансформированных плазмидой pSD-4D5scFv-PE40, содержащей ген соответствующего белка под контролем *lac*-промотора. Очистку белка проводили последовательно методами металл-хелатной аффинной хроматографии на колонке HisTrap FF 1 ml (GE Healthcare, США) и анионообменной хроматографии на колонке QSepharose FF 1 ml (GE Healthcare, США) согласно инструкциям производителя. Фракции, содержащие белок, анализировали с помощью электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях согласно стандартному протоколу.

Анализ цитотоксичности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении монослоя и сфероидов SKBR-3

Для исследования цитотоксичности иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении монослойной культуры SKBR-3 суспензию клеток высевали на 96-луночный культуральный планшет (Corning, США) по 2000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи. После этого ростовую среду в лунках заменяли на свежую, содержащую 4D5scFv-PE40 в различных концентрациях (10⁻⁵–10² нМ), и инкубировали в течение 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ-теста [7]. Для этого заменяли среду в лунках на свежую, содержащую 0.5 мг/мл МТТ (Alfa Aesar, Великобритания), и инкубировали в течение 4 ч. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в ДМСО («ПанЭко», Россия), затем измеряли оптическую плотность в лунках при 570 нм с использованием планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США). Сфероиды получали по описанной выше методике с использованием 96-луночных круглодонных планшетов из пластика со сверхнизкой адсорбцией и культивировали в течение ночи. Цитотоксичность иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в отношении сфероидов изучали таким же образом, но увеличивали время инкубации в его присутствии до 168 ч.

Относительную жизнеспособность клеток представляли в виде процентного отношения усредненной оптической плотности в лунках с обработанными клетками к усредненной оптической плотности в лунках с необработанными клетками. Оценку цитотоксичности иммунотоксина в отношении сфероидов оценивали также по данным объема сфероидов на последний день инкубации в присутствии

иммунотоксина: в этом случае относительную жизнеспособность клеток рассчитывали как процентное отношение усредненных объемов обработанных и необработанных сфероидов. Обработку полученных данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Расчет IC_{50} проводили методом нелинейной регрессии с использованием четырехпараметрической модели доза–эффект.

Оценка проникновения иммунотоксина 4D5scFv-PE40 в сфероиды

Для визуализации проникновения иммунотоксина в сфероид 4D5scFv-PE40 конъюгировали с низкомолекулярным флуоресцентным красителем DyLight650. Для проведения реакции конъюгации белок переводили в боратный буфер (400 мМ H_3BO_3 , 70 мМ $Na_2B_4O_7$, pH 8.0) методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25 (GE Healthcare, США). Для конъюгации использовали N-гидроксисукцинимидное производное DyLight650 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, США), обеспечивающее конъюгацию красителя по первичным аминогруппам белка. Инкубировали белок с 7-кратным молярным избытком DyLight650 NHS Ester, разведенного в ДМСО, в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте в соответствии с рекомендациями производителя. Несвязавшийся краситель удаляли методом гель-фильтрации на колонке PD SpinTrap G-25, уравновешенной фосфатно-солевым буфером (PBS), pH 7.4 («ПанЭко», Россия).

Для получения сфероидов суспензию клеток SKBR-3 вносили в лунки 96-луночного круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией по 1000 клеток на лунку и культивировали в течение ночи. Сфероиды инкубировали в среде, содержащей флуоресцентные конъюгаты 4D5scFv-PE40, в течение 2 ч при 37°C. После этого сфероиды дважды промывали PBS и фиксировали 10% формалином, приготовленным на PBS, в течение 15 мин в темноте. Изображения сфероидов получали с помощью конфокального микроскопа Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) с объективом EC Plan-Neofluar 20×/0.50. Для возбуждения флуоресценции DyLight650 использовали гелий-неоновый лазер 633 нм. Сигнал регистрировали в диапазоне 643–735 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что раковые клетки, в том числе ряд линий рака молочной железы человека, как правило, характеризуются высокой склонностью к образованию сфероидов в культуре [8–12]. Однако в ряде работ обнаружены сложности получения хорошо оформленных сфероидов клеток линии SKBR-3 в широком

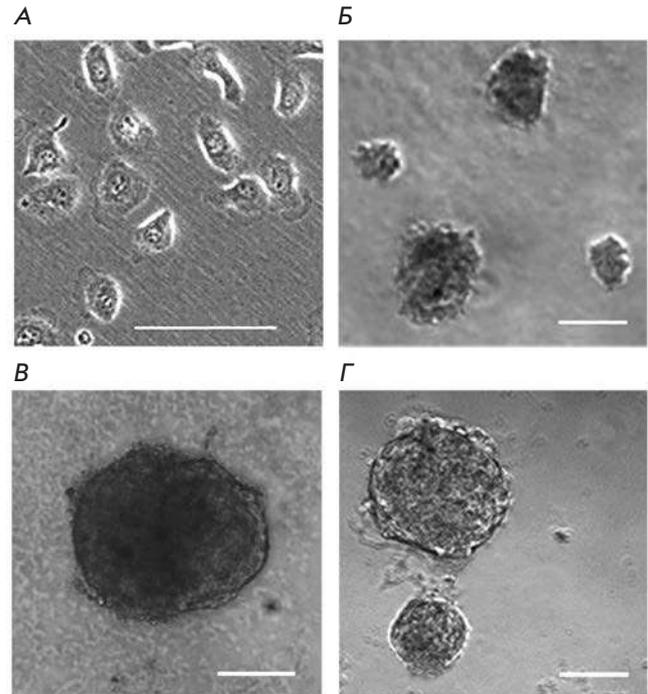


Рис. 1. Морфология клеток SKBR-3 в монослойной культуре (А) и при культивировании в течение 8-ми дней в условиях, препятствующих адгезии клеток к подложке: на агарозной подложке (Б) и на планшетах из пластика со сверхнизкой адсорбцией с круглым (В) и плоским (Г) дном. Бар на А – 50 мкм, на Б, В, Г – 100 мкм

диапазоне условий культивирования, в том числе при включении в ростовую среду компонентов внеклеточного матрикса (Matrigel) или повышении ее вязкости за счет добавления метилцеллюлозы [9, 10].

Культивирование клеток SKBR-3 в различных условиях, препятствующих формированию монослойной культуры (рис. 1А), показало их существенное влияние на способность данной культуры клеток формировать сфероиды. При выращивании на агарозной подложке клетки формировали рыхлые агрегаты неправильной формы, сильно варьирующие по размеру, с неровными краями. Диаметр наиболее крупных агрегатов на 2-е сут после посадки клеток составлял 30–100 мкм и достигал 60–140 мкм в течение 8 дней культивирования (рис. 1Б).

Более успешным оказалось использование низкоадгезивного пластика. Уже через сутки культивирования в лунках круглодонного планшета формировалось по одному сфероиду, представляющему собой плотный округлый конгломерат клеток диаметром около 160–200 мкм с четко очерченной границей.

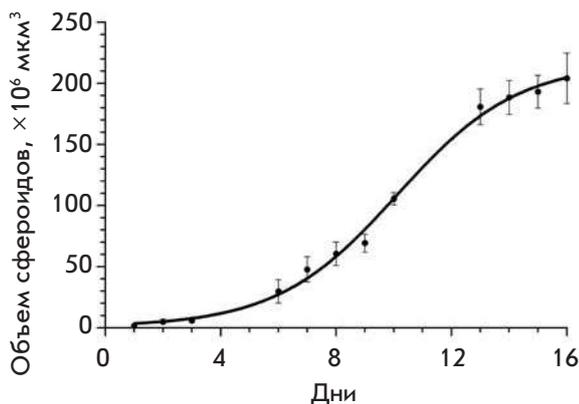


Рис. 2. Кривая роста сфероидов SKBR-3, полученных с использованием круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией. Показаны средние значения \pm SEM, $n = 5$. День «0» – посадка клеток на планшет

К 8-му дню культивирования сфероиды достигали 250–560 мкм в диаметре (рис. 1B). На плоскодонных планшетах формировалось 20–30 сфероидов округлой формы, в большинстве с четкой ровной границей, размером 30–60 и 130–360 мкм на 2-й и 8-й дни культивирования соответственно (рис. 1Г).

С учетом особенностей формирования трехмерных структур SKBR-3 в различных условиях культивирования оптимальным признано использование круглодонного планшета из пластика со сверхнизкой адсорбцией, который применяли в дальнейшем.

Показано, что динамика роста сфероидов, полученных с помощью этого подхода, имеет сложный характер: начальная экспоненциальная фаза, в нашем эксперименте длившаяся около 10 дней, сменяется фазой замедления роста (рис. 2). Аналогичная зависимость, описываемая функцией Гомпертца, характеризует рост опухолей *in vivo* [13]. Замедление роста сфероида может быть связано с изменением соотношения различных популяций клеток по мере увеличения его размеров и все более затрудненного поступления кислорода и нутриентов в глубь сфероида: увеличением доли неделящихся (покоящихся) клеток и/или гибелью покоящихся клеток, сопровождающейся разрастанием некротического ядра [3, 14].

Одна из важных особенностей линии SKBR-3, использованной нами для получения сфероидов, – сверхэкспрессия рецептора HER2. Этот рецептор относится к семейству рецептора эпидермального фактора роста человека и является важным участником сети сигнальной трансдукции, контролирующей процессы пролиферации, дифференцировки, апоптоза клеток [15]. Высокий уровень экспрессии HER2, характерный для многих типов рака, и его роль в патогенезе опухолей делают данный рецептор перспективной мишенью для создания таргетных противоопухолевых препаратов [16, 17]. Многообещающими агентами для таргетной терапии считаются рекомбинантные иммунотоксины – белки слияния, содержащие функционально независимые направляющий и токсический модули. Направляющим модулем, обеспечивающим нацеленную доставку таких кон-

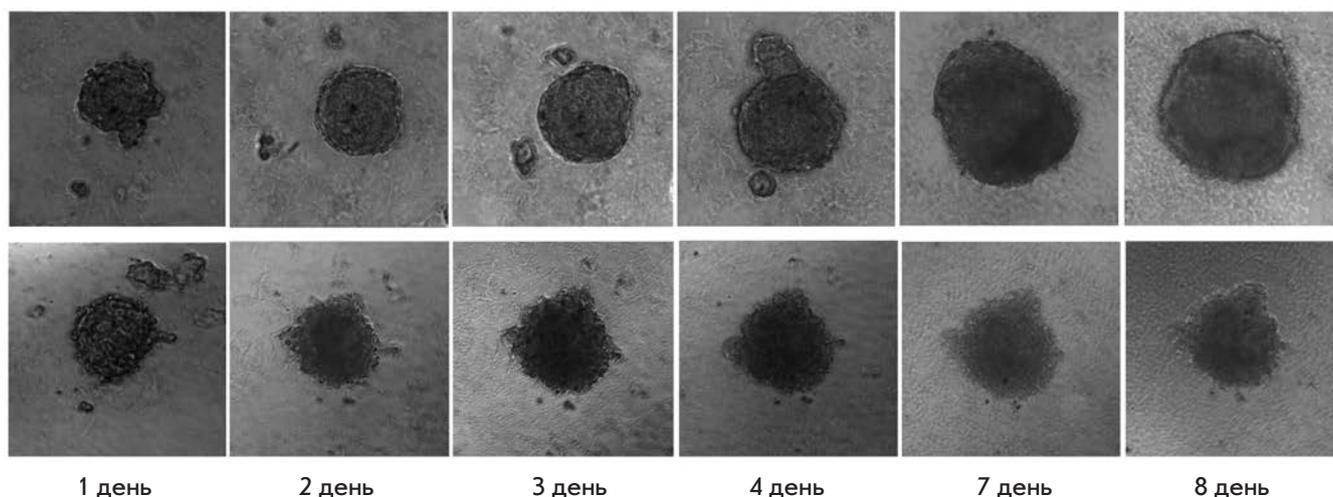


Рис. 3. Морфология сфероидов SKBR-3 на разные дни роста в контроле (верхний ряд) и в присутствии в среде 100 нМ 4D5scFv-PE40 (нижний ряд). Размер изображений 400 × 400 мкм

струкций к опухолевым клеткам, служат фрагменты антитела или узнающие полипептиды неиммуноглобулиновой природы, а токсическое действие обусловлено модифицированными природными белковыми токсинами различного происхождения [18]. Нами проанализировано влияние на рост полученных сфероидов созданного ранее рекомбинантного иммунотоксина 4D5scFv-PE40, содержащего HER2-специфичное антитело 4D5scFv в качестве направляющего модуля и 40 кДа фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (PE40) в качестве токсического модуля [6].

В присутствии 4D5scFv-PE40 в ростовой среде рост сфероидов значительно замедлялся (рис. 3). Эффект иммунотоксина на размер сфероидов имел дозозависимый характер (рис. 4). Полное ингибирование роста сфероидов было достигнуто при концентрациях иммунотоксина более 1 нМ (рис. 3, нижний ряд). При этом иммунотоксин влиял также на морфологию сфероидов: в отличие от контроля, уже на 2-е сут инкубации с иммунотоксином сфероиды разрыхлялись и теряли характерные очертания (рис. 3, нижний ряд). Известно, что плотная упаковка клеток в структуре сфероида обеспечивается повышением экспрессии и накоплением на поверхности клеток белков межклеточных контактов, в частности кадгеринов [19, 20]. Поскольку токсический эффект псевдомонадного экзотоксина А проявляется блокадой биосинтеза белка в клетках-мишенях [21], обнаруженный эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на морфологию сфероидов может быть обусловлен снижением количества белков клеточной адгезии в клетках.

Сравнительный анализ цитотоксичности 4D5scFv-PE40 в отношении клеток SKBR-3 в монослое и в сфероидах методом МТТ показал значительную резистентность сфероидов к данному агенту. Так, эффект 4D5scFv-PE40 в отношении монослойной

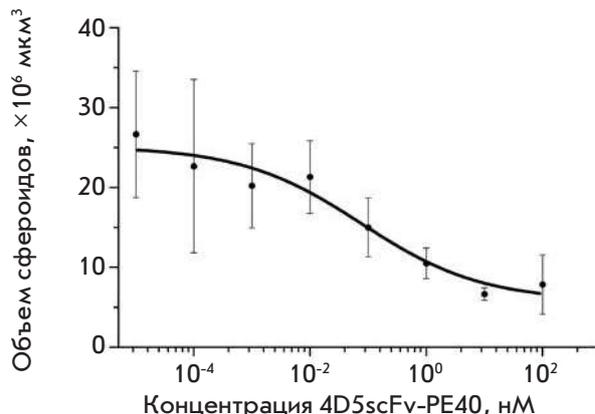


Рис. 4. Размер сфероидов SKBR-3 на 7-й день инкубации в среде с 4D5scFv-PE40 в зависимости от концентрации иммунотоксина. Показаны средние значения ± SEM, n = 6 для каждой точки

культуры проявлялся в диапазоне концентраций от 0.1 пМ до 0.1 нМ с IC₅₀ около 0.8 пМ в результате 72-часовой инкубации (рис. 5, слева). Это хорошо согласуется с результатами, полученными ранее для другой HER2-сверхэкспрессирующей линии клеток, SKOV-3 [22]. В то же время жизнеспособность клеток в сфероидах практически не снижалась в аналогичных условиях. При увеличении длительности инкубации до 168 ч токсическое действие иммунотоксина 4D5scFv-PE40 наблюдали только при увеличении его концентрации до 1 нМ, а значение IC₅₀ составило более 100 нМ (рис. 5, справа).

Явление большей резистентности опухолей *in vivo* к терапевтическим агентам по сравнению с соответствующими опухолевыми клетками в культуре хорошо известно [23, 24]. Ранее нами был показан токсический эффект иммунотоксина 4D5scFv-PE40, взятого в пикомолярных концентрациях, на HER2-

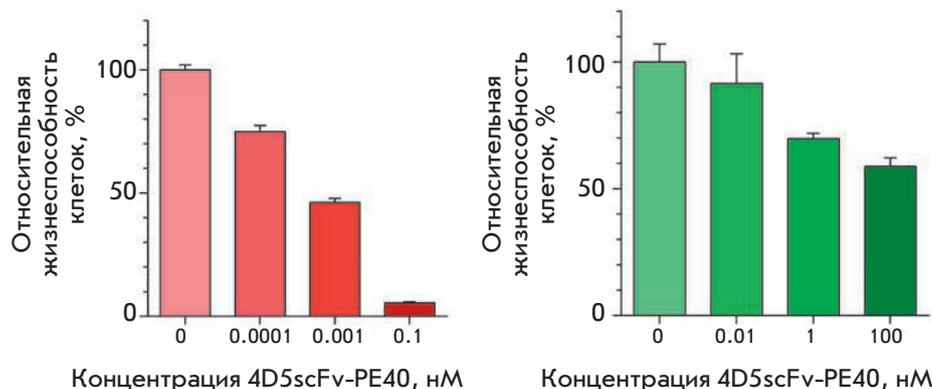


Рис. 5. Влияние 4D5scFv-PE40 на рост культур SKBR-3. Слева: относительная жизнеспособность монослойной культуры клеток после 72 ч инкубации в среде с иммунотоксином. Справа: относительная жизнеспособность клеток сфероидов, определенная через 168 ч после внесения в среду 4D5scFv-PE40. Показаны средние значения ± SEM, n = 6 для каждой точки

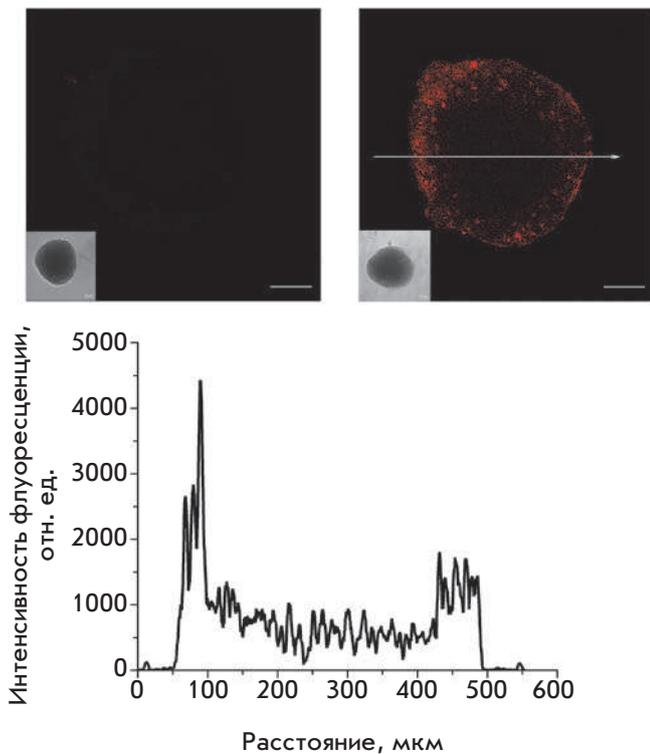


Рис. 6. Неокрашенный сфероид SKBR-3 (слева) и сфероид SKBR-3, окрашенный в течение 2 ч конъюгатом 4D5scFv-PE40 с флуоресцентным красителем DyLight650 (справа). Бар 100 мкм. На врезке показаны изображения соответствующих сфероидов, полученные методом просветной микроскопии. Снизу приведен профиль флуоресцентного сигнала вдоль линии, указанной на правом изображении

сверхэкспрессирующие клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-kat в культуре, в то время как его активность *in vivo* в отношении ксенографтной опухоли SKOV-kat проявлялась при введении в наномолярной концентрации [25]. Очевидно, что использование монослойной культуры опухолевых клеток не позволяет предсказать диапазон эффективных концентраций тестируемого агента в условиях организма.

Резистентность, как правило, определяется совокупностью факторов различной природы, отражающих как свойства самой опухоли, так и фармакокинетику препарата. Один из таких факторов – недостаточное накопление препарата в опухоли в результате его плохого проникновения в опухолевую массу, что, в свою очередь, может быть вызвано высоким давлением интерстициальной жидкости, неравномерным расположением сосудов в опухоли, многочисленными межклеточными

контактами и/или присутствием элементов внеклеточного матрикса. Это имеет особенное значение в случае белковых препаратов, в частности, рекомбинантных иммунотоксинов, размер молекул которых (50–70 кДа) обуславливает, с одной стороны, небольшое время циркуляции в кровотоке (20–30 мин), а с другой – медленную диффузию в ткани [26–28].

Для оценки глубины проникновения иммунотоксина в толщу сфероидов мы получили конъюгаты 4D5scFv-PE40 с флуоресцентным красителем DyLight650. Показано, что в результате 2-часовой инкубации 4D5scFv-PE40, меченный флуоресцентным красителем, проникает на глубину около 80–100 мкм (при диаметре сфероидов 400–500 мкм), что соответствует нескольким поверхностным слоям клеток (рис. 6). Эти результаты согласуются с данными о проникновении Fab-фрагментов антител, размер которых лежит в том же диапазоне (около 50 кДа), в сфероиды рака толстой кишки человека [29].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, существенная разница в выраженности токсического действия иммунотоксина 4D5scFv-PE40 на сфероиды и монослой клеток SKBR-3 может во многом объясняться его неэффективным проникновением в глубь сфероидов и воздействием только на клетки внешних слоев. В этом случае использование сфероидов, состоящих только из опухолевых клеток, позволяет оценить влияние непосредственно межклеточных контактов на эффективность тестируемого препарата. В связи с этим мы полагаем, что полученная нами модель опухолевого сфероидов может быть успешно использована при поиске путей повышения эффективности накопления противоопухолевых агентов в опухоли за счет одновременного воздействия на межклеточные контакты. Это представляет особый интерес для разработки и исследования HER2-специфичных агентов, поскольку рецептор HER2, как правило, скрыт белками клеточной адгезии и может быть недоступен для связывания с таргетным препаратом [30, 31]. Такое воздействие, в частности, возможно при использовании белков, действие которых направлено на плотные межклеточные контакты [32]. Указанный подход, предложенный несколько лет назад, показал свою эффективность при использовании полноразмерных терапевтических антител и, по-видимому, представляет интерес для развития таргетной противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки РФ (соглашение № 14.578.21.0051, уникальный идентификатор RFMEFI57814X0051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minchinton A.I., Tannock I.F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. № 8. P. 583–592.
2. Antoni D., Burckel H., Josset E., Noel G. // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. № 3. P. 5517–5527.
3. Weiswald L.B., Bellet D., Dangles-Marie V. // *Neoplasia*. 2015. V. 17. № 1. P. 1–15.
4. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev*. 2015. V. 84. P. 1–26.
5. Hynes N.E., Gerber H.A., Saurer S., Groner B. // *J. Cell Biochem*. 1989. V. 39. № 2. P. 167–173.
6. Sokolova E.A., Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Biochemistry (Mosc)*. 2014. V. 79. № 12. P. 1376–1381.
7. Mosmann T. // *J. Immunol. Meth*. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
8. Glinsky V.V., Huflejt M.E., Glinsky G.V., Deutscher S.L., Quinn T.P. // *Cancer Res*. 2000. V. 60. № 10. P. 2584–2588.
9. Ivascu A., Kubbies M. // *Int. J. Oncol*. 2007. V. 31. № 6. P. 1403–1413.
10. Froehlich K., Haeger J.D., Heger J., Pastuschek J., Photini S.M., Yan Y., Lupp A., Pfarrer C., Mrowka R., Schleussner E., Markert U.R., Schmidt A. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2016. doi: 10.1007/s10911-016-9359-2.
11. Akasov R., Haq S., Haxho F., Samuel V., Burov S.V., Markvicheva E., Neufeld R.J., Szewczuk M.R. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 40. P. 66119–66134. doi: 10.18632/oncotarget.11868.
12. Debnath J., Brugge J.S. // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. V. 5. № 9. P. 675–688.
13. Hjelstuen M.H., Rasch-Halvorsen K., Brekken C., Bruland O., de L.D.C. // *Acta Oncol*. 1996. V. 35. № 3. P. 273–279.
14. Lin R.Z., Chang H.Y. // *Biotechnol. J*. 2008. V. 3. № 9–10. P. 1172–1184.
15. Polanowski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Biochemistry*. 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
16. Harari D., Yarden Y. // *Oncogene*. 2000. V. 19. № 53. P. 6102–6114.
17. Yan M., Parker B.A., Schwab R., Kurzrock R. // *Cancer Treat Rev*. 2014. V. 40. № 6. P. 770–780.
18. Kreitman R.J. // *Aaps J*. 2006. V. 8. № 3. P. E532–551.
19. Mueller S., Cadenas E., Schonthal A.H. // *Cancer Res*. 2000. V. 60. № 1. P. 156–163.
20. Xiang X., Phung Y., Feng M., Nagashima K., Zhang J., Broaddus V.C., Hassan R., Fitzgerald D., Ho M. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. P. e14640.
21. Weldon J.E., Pastan I. // *FEBS J*. 2011. V. 278. № 23. P. 4683–4700.
22. Sokolova E.A., Stremovskiy O.A., Zdobnova T.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 4. P. 93–96.
23. Niero E.L., Rocha-Sales B., Lauand C., Cortez B.A., de Souza M.M., Rezende-Teixeira P., Urabayashi M.S., Martens A.A., Neves J.H., Machado-Santelli G.M. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2014. V. 33. P. 37.
24. Fong E.L., Harrington D.A., Farach-Carson M.C., Yu H. // *Biomaterials*. 2016. V. 108. P. 197–213.
25. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
26. Weldon J.E., Xiang L., Zhang J., Beers R., Walker D.A., Onda M., Hassan R., Pastan I. // *Mol. Cancer Ther*. 2013. V. 12. № 1. P. 48–57.
27. Zielinski R., Lyakhov I., Hassan M., Kuban M., Shafer-Weaver K., Gandjbakhche A., Capala J. // *Clin. Cancer Res*. 2011. V. 17. № 15. P. 5071–5081.
28. Cao Y., Marks J.W., Liu Z., Cheung L.H., Hittelman W.N., Rosenblum M.G. // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 4. P. 429–439.
29. Sutherland R., Buchegger F., Schreyer M., Vacca A., Mach J.P. // *Cancer Res*. 1987. V. 47. № 6. P. 1627–1633.
30. Choi I.K., Strauss R., Richter M., Yun C.O., Lieber A. // *Front. Oncol*. 2013. V. 3. P. 193.
31. Beyer I., van Rensburg R., Lieber A. // *Tissue Barriers*. 2013. V. 1. № 1. P. e23647.
32. Beyer I., van Rensburg R., Strauss R., Li Z., Wang H., Persson J., Yumul R., Feng Q., Song H., Bartek J., Fender P., Lieber A. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 22. P. 7080–7090.

УДК 577.152.23: 577.151.02: 577.151.042:579.234

Построение полноатомной модели *L,D*-транспептидазы 2 из *Mycobacterium tuberculosis* для скрининга новых ингибиторов

С. М. Балдин^{1,2}, Н. М. Мисюра³, В. К. Швядас^{1,3*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

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

Поступила в редакцию 03.09.2016

Принята в печать 15.11.2016

РЕФЕРАТ *L,D*-транспептидаза 2-го типа из *Mycobacterium tuberculosis* играет ключевую роль в формировании неклассических 3-3 поперечных сшивок пептидогликана в клеточной стенке патогена, обуславливая его устойчивость к широкому спектру антибиотиков пенициллинового ряда. Впервые проведенное исследование взаимодействия фермента с тетрапептидным фрагментом пептидогликана клеточной стенки при помощи методов молекулярного моделирования позволило выявить особенности связывания N- и C-концевых фрагментов растущей цепи пептидогликана этим ферментом при образовании 3-3 поперечных сшивок и построить полноатомную модель LdtMt2 для скрининга и оптимизации структуры ингибиторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *L,D*-транспептидаза, *Mycobacterium tuberculosis*, ингибиторы, каталитический механизм, молекулярный докинг, молекулярная динамика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Ac – ацетил; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; Ldt – *L,D*-транспептидаза; LdtMt1 и LdtMt2 – *L,D*-транспептидазы *Mycobacterium tuberculosis* первого и второго типа; m-DAP – мезо-диаминопимелиновая кислота; IG – иммуноглобулин; МД – молекулярная динамика; PME – метод учета дальнедействующих кулоновских взаимодействий Particle Mesh Ewald.

ВВЕДЕНИЕ

Опасность заболевания туберкулезом непрерывно растет с появлением штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, обладающих множественной и широкой лекарственной устойчивостью. Согласно оценкам ВОЗ, в 2015 году туберкулезом заболели 10.4 миллиона человек и около 1.8 миллиона умерли [1]. Становится очевидной необходимость поиска новых противотуберкулезных препаратов и технологий лечения, а также дизайна более эффективных антибиотиков для подавления инфекции. Большой интерес представляет использование ранее не известных молекулярных мишеней, связанных с особенностями жизнедеятельности и структурной организации возбудителя туберкулеза.

Одним из существенных отличительных свойств *M. tuberculosis* является строение ее клеточной стен-

ки. В отличие от многих бактерий, в формировании клеточной стенки которых важную роль играют классические 4-3 поперечные сшивки пептидогликана (образование пептидной связи между *D*-центром мезо-диаминопимелиновой кислоты (m-DAP) и *D*-аланином), клеточная стенка *M. tuberculosis* формируется за счет образования неклассических 3-3 поперечных сшивок (до 80% в стационарной фазе). С открытием этого факта стало понятным, почему β-лактамы антибиотики, способные инaktivировать пенициллинсвязывающие ферменты *D,D*-транспептидазы, которые катализируют образование классических 4-3 поперечных сшивок пептидогликана клеточной стенки [2], малоэффективны при лечении туберкулеза. В последние годы было установлено, что образование неклассических 3-3 поперечных сшивок катализируют ранее не извест-

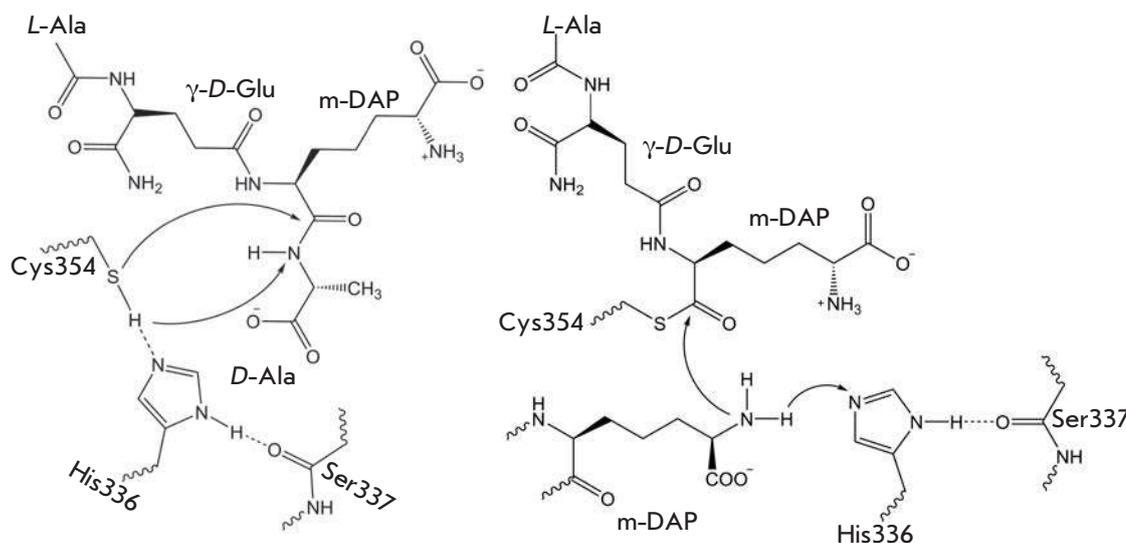


Рис. 1. Каталитический механизм LdtMt2 на примере трипептидного аналога природного субстрата. Реакция образования ацилфермента (левый рисунок) и последующая реакция переноса ацильной части на нуклеофил и образование 3-3 поперечной сшивки в пептидогликане (правый рисунок)

ные ферменты *L,D*-транспептидазы [3–6]. Действие *L,D*-транспептидаз приводит к завершению формирования поперечных сшивок в пептидогликане *M. tuberculosis* в результате образования пептидной связи между *L*-центром третьего остатка *m*-DAP одного олигопептида и *D*-центра аналогичного остатка другого (рис. 1).

Геном *M. tuberculosis* кодирует пять белков, содержащих домен, обладающий *L,D*-транспептидазной активностью (участки Rv0116c, Rv0192, Rv0483, Rv1433 и Rv2518c) [5], среди которых наиболее активно экспрессируется *L,D*-транспептидаза второго типа (LdtMt2) Rv2518c [6]. Потеря гена *Rv2518c*, кодирующего LdtMt2, ведет к существенному изменению морфологии колоний, ослаблению роста бактерий и усилению чувствительности к классическим антибиотикам (действию комплексного препарата на основе амоксициллина и клавулановой кислоты) [3].

LdtMt2 состоит из 408 аминокислотных остатков и является липопротеином. N-Концевой фрагмент фермента погружен в липидный бислой. Полипептидная цепь содержит короткий фрагмент, экспонированный внутрь клетки (остатки 1–17), трансмембранный участок (остатки 18–34) и надмембранный участок (остатки 35–408), который, в свою очередь, можно разделить на три домена: два некаталитических IG-подобных домена А и В (остатки 55–146 и 149–250 соответственно) и каталитический домен С (остатки 251–408), который обладает транспептидазной активностью [6]. Ключевыми для катализа остатками LdtMt2 являются Cys354, His336 и Ser337, составляющие цепь переноса протона [6]. Активный центр LdtMt2 не экспонирован непосредственно в растворитель, а расположен под так назы-

ваемой «крышкой» [7] Tyr298–Trp324, формирующей три канала, по двум из которых возможна доставка субстрата в активный центр. Данный элемент вторичной структуры представляет собой антипараллельный β-лист, соединенный неупорядоченной петлей. Доступ субстрата и растворителя в активный центр фермента ограничен объемными гидрофобными остатками, образующими саму «крышку» (Tyr308 и Tyr318), а также расположенными на входе в активный центр (Tyr330, Phe334 и Trp340).

Полноразмерная структура LdtMt2 неизвестна, однако установлены кристаллографические структуры доменов А и В, а также доменов С и В (PDB 4HU2 и 4HUC соответственно) [6]. Наряду с этим определена структура комплекса с дипептидным фрагментом (N-γ-*D*-глутамил-*m*-DAP) пептидогликана в активном центре фермента, PDB 3TUR [5], а также получены структурные данные для ковалентных комплексов LdtMt2 с меропенемом и LdtMt1 с имипенемом [7, 8]. Обращает на себя внимание противоречивость представленных структур (рис. 2): остатки ингибиторов одного класса расположены в разных каналах, несмотря на гомологичную структуру каталитических *L,D*-транспептидазных доменов в транспептидазах 1-го и 2-го типов.

Важные данные для понимания механизма действия LdtMt2 получены при QM/MM-моделировании взаимодействия фермента с трипептидным аналогом (N-γ-*D*-Glu-*m*-DAP-*D*-Ala) природного субстрата – пептидогликана клеточной стенки [9]. Эта работа позволила определить энергетические профили стадии образования ацилфермента, а также последующей стадии переноса ацильной группы и образования пептидной связи между *L*-центром *m*-DAP ацилфермента и *D*-центром *m*-DAP нуклеофила (см.

Рис. 2. Наложение структур ферментингибиторных комплексов LdtMt2–меропенем (4GSU) и LdtMt1–имипенем (4JMX), показывающее, что остатки меропенема (бирюзовый) и имипенема (фиолетовый) расположены в разных каналах

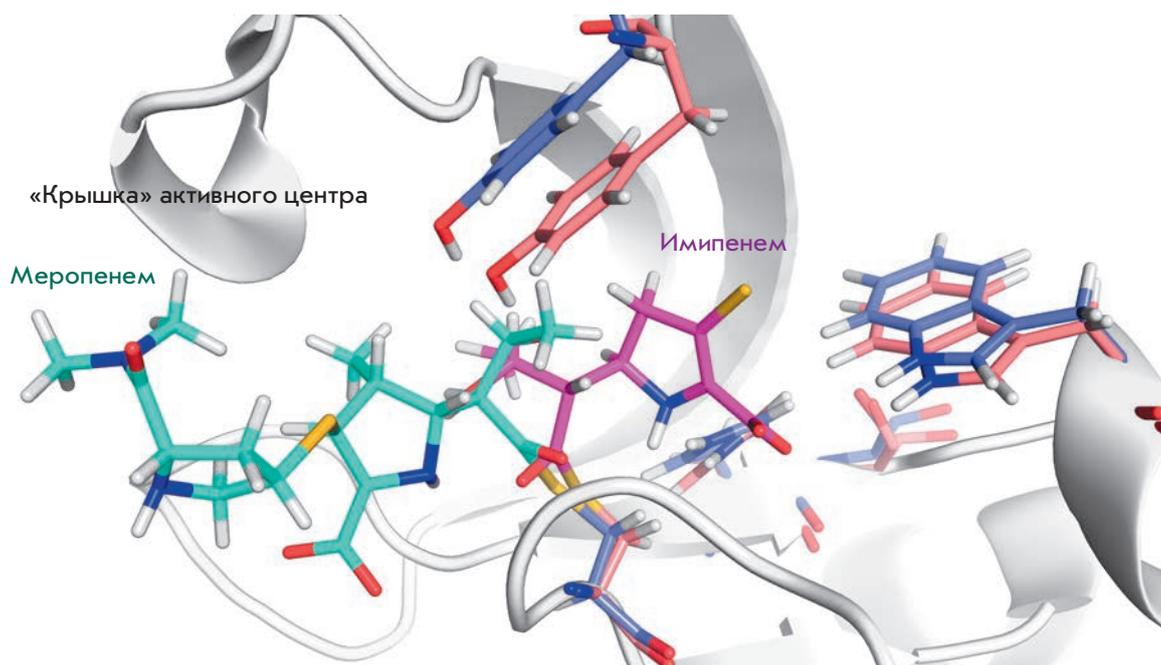


рис. 1). Методы молекулярного моделирования могут также позволить выявить особенности структурной организации активных центров *L,D*-транспептидаз, характер их взаимодействий с субстратами и существенно облегчить поиск ингибиторов. Однако для достижения этой цели необходимо иметь адекватные молекулярные модели, которые можно использовать при скрининге библиотек соединений. Целью настоящей работы было моделирование взаимодействия фермента с субстратом и β -лактамными соединениями, а также построение полноатомной модели LdtMt2 для скрининга и оптимизации структуры ингибиторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Программное обеспечение для молекулярного моделирования

Расчет ионизационных состояний аминокислотных остатков проводили с помощью программы PROPKA 3.0 [10]. Подготовку стартовой структуры к расчетам и анализ траекторий выполняли в пакете AmberTools 16 [11]. Минимизацию энергии и молекулярную динамику проводили в пакете Amber 14 [11], молекулярный докинг – с помощью программы AutoDock 4.0 [12]. Моделирование пространственных структур субстрата и ингибиторов осуществляли с помощью программы ACD/ChemSketch. Оптимизацию геометрии и расчет точечных зарядов атомов субстрата проводили с помощью программы PC GAMESS Firefly 8.1 [13] и модуля resp из пакета AmberTools

16 соответственно. Визуализацию и редактирование структур осуществляли с помощью программ VMD 1.9.2 [14] и PyMol 1.8 [15]. Параллельные вычисления молекулярно-динамических траекторий проводили с использованием суперкомпьютера МГУ «Ломоносов» [16].

Подготовка структуры

В качестве стартовых моделей фермента и фермент-субстратного комплекса LdtMt2 были выбраны две кристаллографические структуры: 4HU2 [6], содержащая координаты остатков некаталитических доменов А и В, и 3TUR [5], содержащая координаты остатков каталитического домена С и некаталитического домена В, а также дипептидный фрагмент пептидогликана клеточной стенки *M. tuberculosis* (γ -D-Glu-m-DAP). Структуры выравнивали по общему домену В, и соединяли цепи, получая полную трехдоменную структуру LdtMt2. Фрагмент пептидогликана дополняли недостающими остатками D-Ala и L-Ala, для нейтрализации заряда концевой аминокислотной группы присоединяли N-ацетильную группу. Точечные заряды на атомах субстрата определяли следующим образом: первоначально оптимизировали геометрию молекул на уровне теории MP2/6-31G*, затем рассчитывали электростатический потенциал по методу HF/6-31G* и определяли точечные заряды на атомах. Полученную структуру фермент-субстратного комплекса помещали в ячейку воды типа TIP3P с минимальным расстоянием 10 Å от фермента до края ячейки. Для нейтрализации суммарного за-

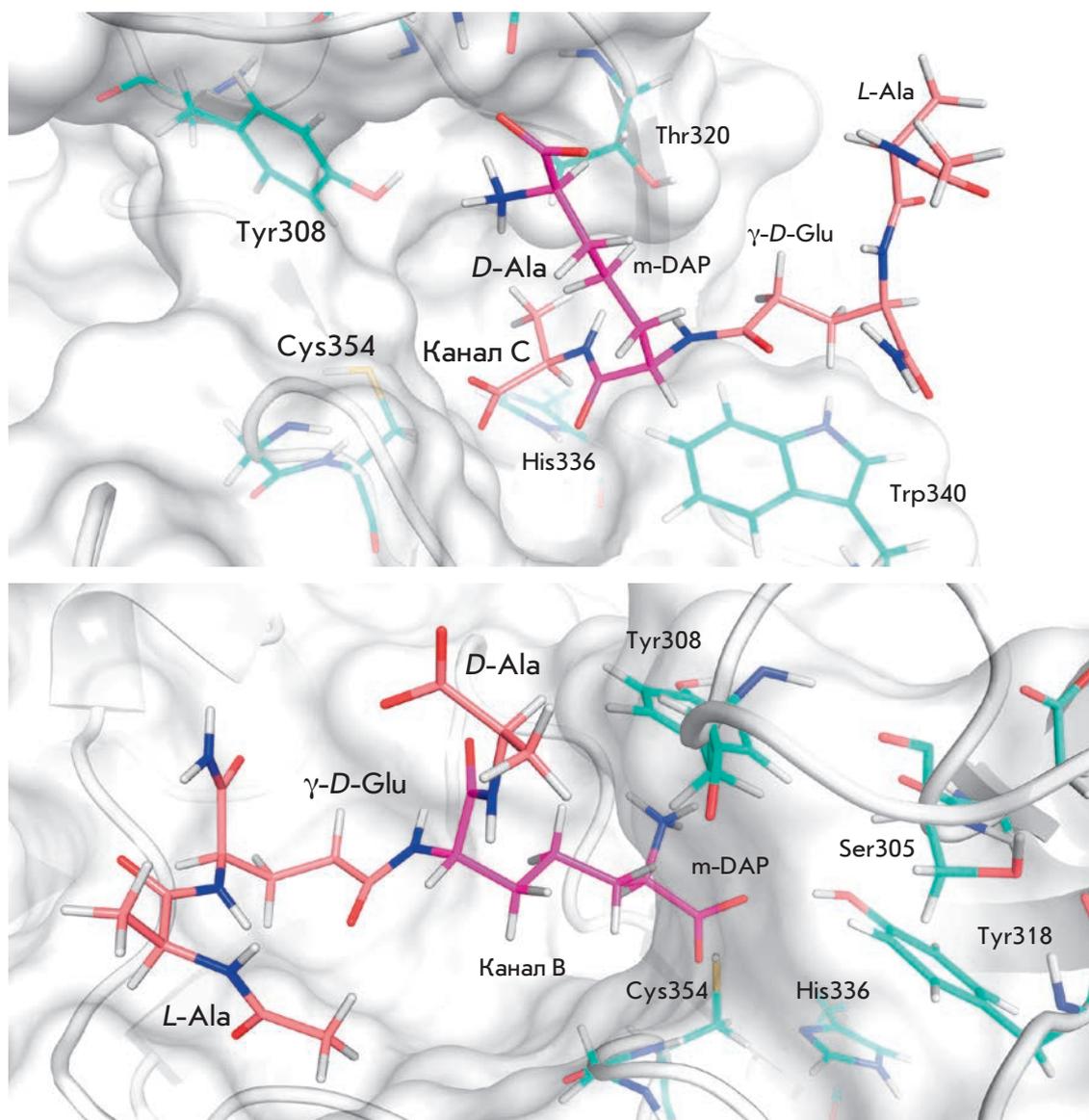


Рис. 3. Взаимодействие тетрапептидного фрагмента пептидогликана с аминокислотными остатками активного центра LdtMt2 в канале С (верхний рисунок) и в канале В (нижний рисунок)

ряда системы добавляли ионы натрия. Расчет молекулярно-динамических траекторий проводили в силовом поле AMBER ff14SB [17]. Силовые константы для связей, углов и двугранных углов субстрата брали из силового поля ff14SB, недостающие параметры из поля GAFF.

Минимизация энергии системы и молекулярная динамика

Модели фермент-субстратного комплекса и фермента LdtMt2 уравнивали и рассчитывали молекулярно-динамическую траекторию по следующему протоколу. Первоначально проводили двухстадийную минимизацию энергии системы. Минимизацию остатков растворителя осуществляли сначала по алгоритму наискорейшего спуска (2000 шагов), затем

по алгоритму сопряженных градиентов (2000 шагов). Дальнейшее уравнивание системы проводили следующим образом. При постоянном объеме разогревали систему от 0 до 310 К в течение 50 пс, затем проводили уравнивание при постоянном давлении в течение 1000 пс. Шаг интегрирования составлял 0.002 пс. При уравнивании системы и получении молекулярно-динамических траекторий использовали периодические граничные условия и метод учета дальнедействующих кулоновских взаимодействий PME. Радиус отсечения несвязных кулоновских взаимодействий составлял 8 Å.

Молекулярный докинг

Модель LdtMt2 для проведения молекулярного докинга β-лактамыных соединений различной природы

получали следующим образом. Из сольватированной структуры фермент-субстратного комплекса, полученного в процессе минимизации энергии системы, удаляли молекулы растворителя, ионы натрия и субстрат – фрагмент пептидогликана. Затем в области активного центра рассчитывали карту потенциала взаимодействия. В активный центр фермента с помощью генетического алгоритма Ламарка докировали потенциальные ингибиторы LdtMt2 – β -лактамы соединения различной природы. Выполняли от 50 до 100 запусков докинга. Полученные фермент-ингибиторные комплексы кластеризовали и анализировали особенности строения комплекса в каждом кластере. В качестве критерия продуктивного связывания ингибитора в активном центре фермента и образования реакционноспособного фермент-ингибиторного комплекса, приводящего к образованию стабильного ацилфермента, рассматривали следующие показатели:

1. Существование водородных связей ингибитора с оксианионным центром (образование водородных связей между N-атомами основной цепи остатков Gly353 и Cys354 с карбонильным кислородом ингибиторов);

2. Расстояние между атакующим атомом серы S^γ остатка Cys354 каталитического цистеина и атакующим карбонильным углеродом β -лактамы ядра, не превышающее 5 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярное моделирование альтернативного связывания пептидогликана в активном центре LdtMt2

Сложность в изучении расположения субстрата в активном центре *L,D*-транспептидаз обусловлена тем, что необходимо рассматривать связывание двух молекул одного соединения – одной молекулы в качестве ацильного донора, что в дальнейшем приводит к образованию промежуточного ацилфермента, другой – в качестве нуклеофила, что приводит к образованию комплекса ацилфермент–нуклеофил, последующему переносу на нуклеофил ацильного остатка и формированию поперечной 3-3 сшивки в пептидогликане клеточной стенки. Противоречивость данных о локализации субстратоподобных ингибиторов в активном центре фермента может быть обусловлена недостаточным вниманием к возможностям двух разных способов связывания природного субстрата. При поиске оптимальной структуры ковалентных ингибиторов фермента, какими являются β -лактамы соединения карбопептинового ряда, необходимо иметь адекватную структуру фермент-субстратного комплекса, в котором молекула субстрата

занимает положение ацильного донора, способного образовать ацилфермент. Для дискриминации двух разных способов локализации субстрата на основе структуры 3TUR созданы модели альтернативного связывания фрагмента пептидогликана в активном центре LdtMt2 и изучено их поведение при помощи молекулярной динамики. В одной модели фермент-субстратного комплекса N-Ас-L-Ala- γ -D-Glu-m-DAP-D-Ala фрагмент пептидогликана располагали в канале С, в альтернативной модели субстрат был локализован в канале В (рис. 3).

При связывании фрагмента пептидогликана в канале В основными остатками, образующими водородные связи с субстратом, являются His352, Ser331, Tyr308 и Tyr318. В модели фермент-субстратного комплекса с локализацией субстрата в канале С тетрапептидный фрагмент пептидогликана образует лабильные водородные связи с остатками Asn356, Trp340, His352 и Tyr318, подобно связыванию более короткого трипептидного аналога природного субстрата [9]. Проведенное моделирование показало, что остаток L-Ala в тетрапептидном фрагменте пептидогликана не играет определяющей роли при связывании субстрата как в канале С, так и в канале В и значительную часть времени экспонирован в растворитель, хотя способен образовать кратковременные водородные связи с N- и O-атомами пептидных связей основной цепи, образованных остатками Arg319 и Thr320. Данный факт позволяет предположить, что остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, следующие за L-Ala в структуре пептидогликана, не участвуют или играют минорную роль в процессе узнавания ацильного донора активным центром фермента.

При связывании субстрата в канале С образуется реакционноспособный фермент-субстратный комплекс: S^γ-атом каталитического остатка Cys354 находится на благоприятном для образования ацилфермента расстоянии 3.1–5.7 Å от карбонильного углерода пептидной связи между остатками m-DAP-D-Ala по всей траектории (рис. 4, оранжевая линия). Интересно отметить, что в модели фермент-субстратного комплекса, в которой фрагмент пептидогликана связан в канале В, субстрат расположен по-другому и не способен образовать ацилфермент. Расстояние между S^γ-атомом каталитического остатка Cys354 и карбонильным углеродом пептидной связи, образованной остатками m-DAP-D-Ala по всей MD-траектории (рис. 5, оранжевая линия), изменяется в интервале 8.1–12.3 Å, что исключает возможность этой молекулы субстрата служить ацильным донором. В то же время ориентация молекулы субстрата в канале В соответствует возможности этой молекулы субстрата выполнять роль нуклеофила

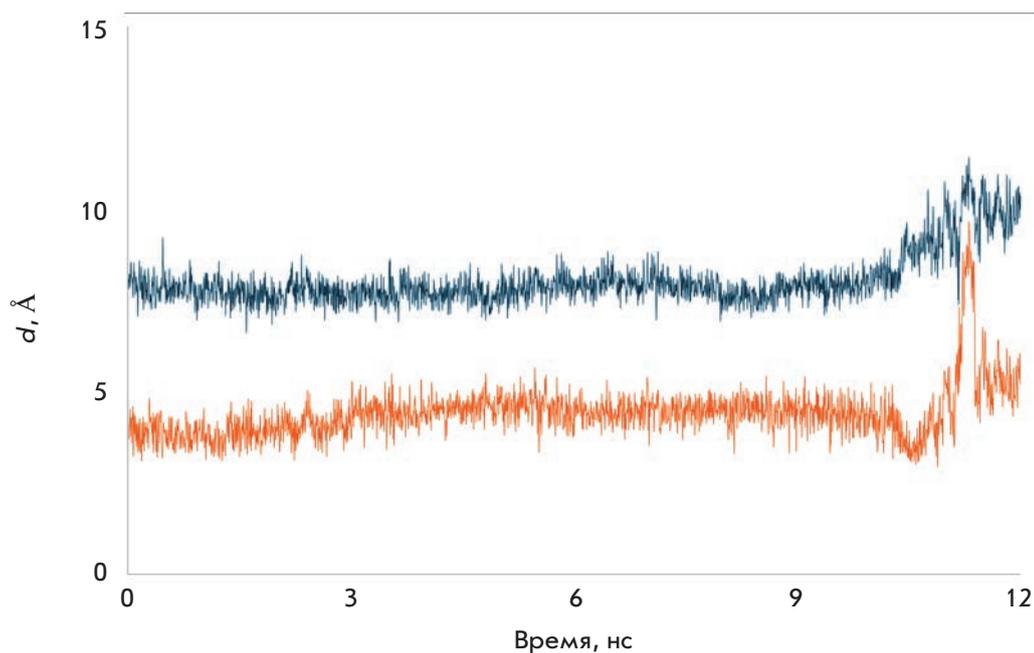


Рис. 4. Изменение характеристических расстояний между S^{γ} -атомом Cys354 и C-атомом пептидной связи m-DAP–D-Ala (оранжевая линия), а также N-атомом D-центра m-DAP (синяя линия) в ходе молекулярно-динамической траектории при связывании тетрапептидного фрагмента природного пептидогликана в канале C LdtMt2

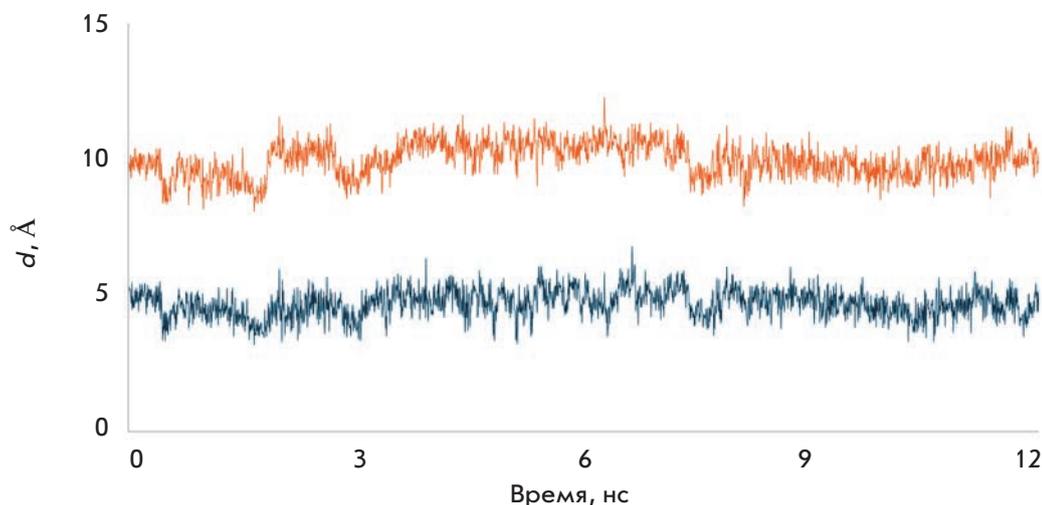


Рис. 5. Изменение характеристических расстояний между S^{γ} -атомом Cys354 и N-атомом D-центра m-DAP (синяя линия), а также C-атомом пептидной связи m-DAP–D-Ala (оранжевая линия) в ходе молекулярно-динамической траектории при связывании тетрапептидного фрагмента природного пептидогликана в канале B LdtMt2

в реакции формирования поперечной сшивки 3-3: расстояние между N-атомом D-центра m-DAP и каталитическим цистеином по всей траектории (рис. 5, синяя линия) находится в диапазоне 3.2–6.8 Å.

Проведенное моделирование также показало, что возможность выполнения альтернативной роли для каждой молекулы субстрата практически исключена: молекула субстрата, связанная в канале C, не может быть нуклеофилом (рис. 4, синяя линия), а молекула субстрата, связанная в канале B, не может быть ацильным донором (рис. 5, оранжевая линия). Установление этого факта важно как для понимания полного каталитического цикла

действия фермента, так и для поиска его ингибиторов. Так при оптимизации структуры β-лактамных соединений, способных ингибировать фермент с образованием стабильного ацилфермента, необходимо учитывать связывание ингибитора в канале C, т.е. на месте связывания молекулы субстрата, выполняющей роль ацильного донора при образовании поперечной 3-3 сшивки пептидогликана.

Моделирование взаимодействия LdtMt2 с β-лактамными соединениями

В двух известных структурах ацилферментов (4JMX, образованной при взаимодействии LdtMt1

с имипенемом, и 4GSU, образованной при взаимодействии LdtMt2 с меропенемом), остатки ингибиторов локализованы в разных каналах. Остаток меропенема в активном центре LdtMt2 расположен в канале В на входе в активный центр и экспонирован в растворитель, в то время как тиазольное кольцо имипенема в структуре LdtMt1 целиком погружено в канал С.

В данном случае важно установить первичное расположение ингибиторов β -лактамы природы в активном центре фермента, которое бы соответствовало реакционноспособному состоянию комплексов фермента с ингибиторами, приводящему к образованию ацилферментов. В соответствии с критериями теоретической химии и с учетом механизма действия LdtMt2 нуклеофильная атака тиолят-иона каталитического остатка цистеина, приводящая к раскрытию β -лактамного кольца, может осуществляться при удалении атома серы каталитического цистеина на 3.5–4.0 Å и расположении кислорода карбонильной группы β -лактамного кольца в области оксианионного центра. Опираясь на результаты моделирования

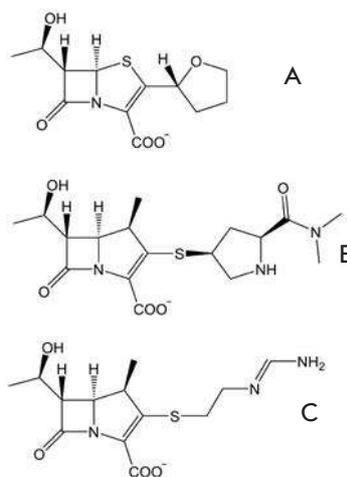


Рис. 6. Структуры β -лактамы антибиотиков, докированных в активный центр LdtMt2. А – фаропенем, В – меропенем, С – имипенем

взаимодействия LdtMt2 с тетрапептидным фрагментом природного пептидогликана, проведен молекулярный докинг трех β -лактамы соединений, ингибирующая способность которых по отношению к LdtMt2 описана в литературе, и исследована их способность образовывать реакционноспособные ком-

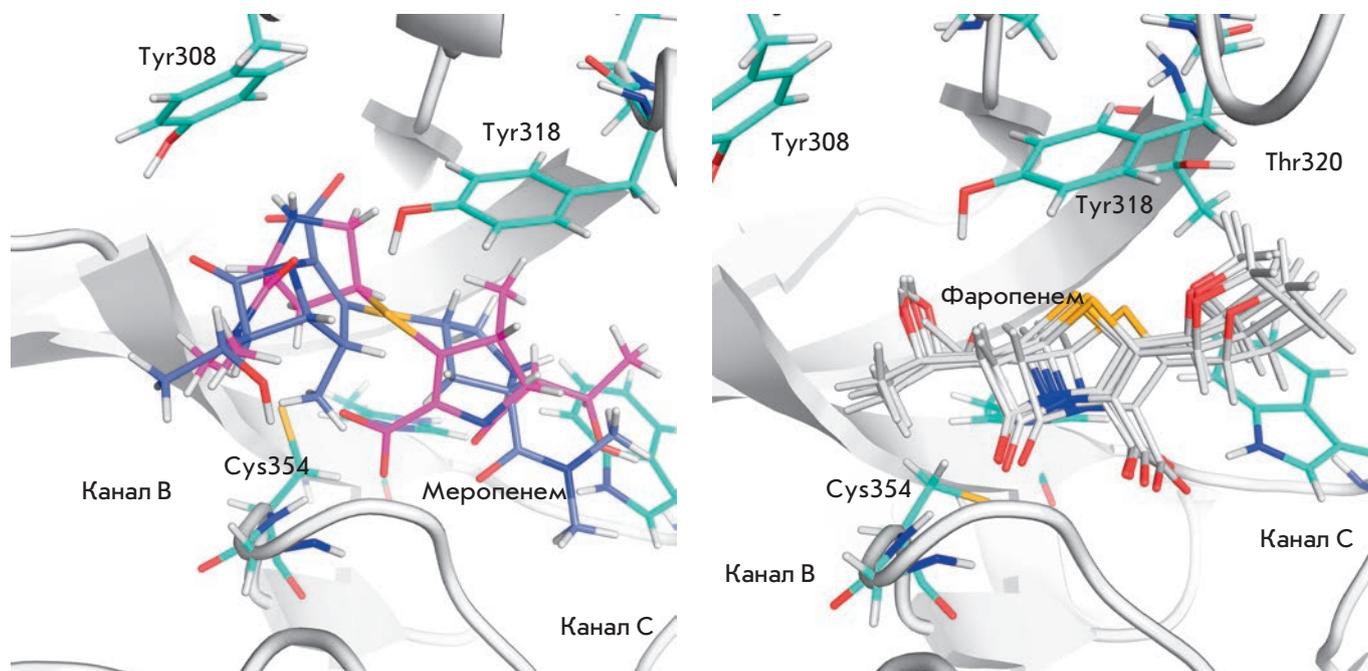


Рис. 7. Локализация β -лактамы антибиотиков в активном центре LdtMt2 при моделировании связывания меропенема в канале В (левый рисунок) и фаропенема в канале С (правый рисунок) с использованием докинга. В случае меропенема нет четкого места связывания ингибитора, ни одна из структур не отвечает требованиям образования реакционноспособного фермент-ингибиторного комплекса, а расстояние от S^{γ} -атома каталитического остатка Cys354 до С-атома β -лактамного кольца не оптимально для нуклеофильной атаки. При связывании фаропенема в канале С (правый рисунок) все докированные структуры образуют единый кластер, образуется реакционноспособный комплекс фермента с ингибитором, в котором расстояние от S^{γ} -атома каталитического остатка Cys354 до карбонильного С-атома β -лактамного кольца оптимально для нуклеофильной атаки каталитического цистеина, а кислород β -лактамного ядра образует водородные связи в оксианионном центре

плексы (рис. 6). Как и в случае природного субстрата, рассматривали возможность связывания ингибиторов в канале В и в канале С.

При моделировании связывания соединений в канале В ни для одного докированного ингибитора не наблюдали образования реакционноспособного комплекса с ферментом. Характерный пример меропенема показан на рис. 7 (левый рисунок). Расстояние от S^γ-атома каталитического остатка Cys354 LdtMt2 до карбонильного С-атома β-лактаманного кольца у всех лигандов превышало 5 Å во всех докированных состояниях. Такое связывание не могло также обеспечить взаимодействие карбонильного кислорода β-лактаманного кольца с оксианионным центром фермента (атомами азота остатков Cys354 и Gly353 полипептидной цепи). Таким образом, сделан вывод о том, что достижение реакционноспособного состояния при связывании ингибитора в канале В невозможно.

При альтернативном связывании β-лактаманых соединений в канале С ингибиторы были способны образовать реакционноспособный комплекс с ферментом. Расстояние от S^γ-атома каталитического остатка Cys354 LdtMt2 до карбонильного С-атома β-лактаманного кольца составляло 3.5–4 Å, и во всех фермент-ингибиторных комплексах карбонильный кислород β-лактаманного кольца находился в оксианионном центре, сформированном атомами азота основной цепи остатков Cys354, Gly353 и His352. Таким об-

разом, проведенное моделирование взаимодействия фермента с β-лактаманными соединениями подтвердило, что реакционноспособные комплексы с ингибитором, как и с субстратом, образуются лишь при их связывании в канале С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цель данной работы состояла в изучении особенностей связывания природного субстрата – пептидогликана клеточной стенки в активном центре LdtMt2 и в построении полноатомной модели фермент-субстратного комплекса, которая позволила бы вести поиск и оптимизацию структуры субстратоподобных необратимых ингибиторов. Проведенное молекулярное моделирование показало, что связывание N- и С-концевых фрагментов растущей цепи пептидогликана в разных каналах обеспечивает протекание различных стадий формирования клеточной стенки с образованием поперечных 3-3 связей. Для адекватного моделирования взаимодействия LdtMt2 с ингибиторами семейства β-лактаманых соединений, способных инактивировать фермент в результате образования стабильного ацилфермента, необходимо рассматривать связывание ингибиторов в канале С.

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 15-14-00069).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO. Global Tuberculosis Report; Geneva, 2016.
2. Fisher J.F., Meroueh S.O., Mobashery S. // Chem. Rev. 2005. V. 105. № 2. P. 395–424.
3. Gupta R., Lavollay M., Mainardi J., Arthur M., Bishai W., Lamichhane G. // Nat. Med. 2010. V. 16. № 4. P. 466–469.
4. Jankute M., Cox J.A., Harrison J., Besra G.S. // Ann. Rev. Microbiol. 2015. V. 69. P. 405–423.
5. Erdemli S., Gupta R., Bishai W.R., Lamichhane G., Amzel M., Bianchet M. // Structure. 2012. V. 20. № 12. P. 2103–2115.
6. Böth D., Steiner E.M., Stadler D., Lindqvist Y., Schnell R., Schneider G. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 3. P. 432–441.
7. Kim H.S., Kim J., Im H.N., Yoon J.Y., An D.R., Yoon H.J., Kim J.Y., Min H.K., Kim S.J., Lee J.Y., et al. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. № 3. P. 420–431.
8. Correale S., Ruggiero A., Capparelli R., Pedone E., Berisio R. // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2013. V. 69. P. 1697–1706.
9. Silva J.R.A., Roitberg A.E., Alves C.N. // J. Chem. Inf. Model. 2014. V. 54. № 9. P. 2402–2410.
10. Li H., Robertson A.D., Jensen J.H. // Proteins. 2005. V. 61. № 4. P. 704–721.
11. Case D.A., Berryman J.T., Betz R.M., Cerutti D.S., Cheatham T.E., III, Darden T.A., Duke R.E., Giese T.J., Gohlke H., Goetz A.W., et al. // AMBER 2015, University of California, San Francisco, 2015.
12. Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // J. Comput. Chem. 2009. V. 30. № 16. P. 2785–2791.
13. Granovsky A.A. Firefly version 8. <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>
14. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graphics. 1996. V. 14. P. 33–38.
15. The PyMOL Molecular Graphics System. Version 1.8 Schrödinger, LLC.
16. Воеводин В., Жуматий С., Соболев С., Антонов А., Брызгалов П., Никитенко Д., Стефанов К., Воеводин В. // Открытые системы. 2012. № 7. С. 36–39.
17. Maier J.A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K.E., Simmerling C. // J. Chem. Theory Comput. 2015. V. 11. № 8. P. 3696–3713.

УДК 612.014

Пептид пролил-глицил-пролин (PGR) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении

Н. С. Бондаренко^{1*}, А. Н. Шнейдерман², А. А. Гусева³, Б. А. Умарова³¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина, 115478, Москва, Каширское ш., 24³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: n.s.bondarenko@gmail.com

Поступила в редакцию 25.01.2016

Принята к печати 28.11.2016

РЕФЕРАТ Изучено влияние трипептида пролил-глицил-пролина (PGR) на проницаемость кровеносных сосудов крыс в условиях воспаления. Установлено, что пептид уменьшает отек лапы крыс, вызванный подкожным введением гистамина, в той же степени, что и классический противовоспалительный препарат диклофенак. Однако определение относительного уровня экспрессии гена *cox-2* в очаге воспаления с помощью ПЦР в реальном времени показало, что, в отличие от диклофенака, PGR не влиял на экспрессию гена *cox-2*. Это свидетельствует о различии механизмов их действия. На экспериментальной модели острого перитонита, вызванного внутрибрюшинной инъекцией тиогликолата, показано, что воспалительная реакция сопровождается повышением проницаемости сосудов в тканях желудка и тонкого кишечника. Предварительное (за 30 мин до индукции воспаления) введение PGR предотвращало это повышение, вследствие чего проницаемость сосудов, объем экссудата в перитонеальной полости и количество красителя Evans Blue в нем оставались на уровне контрольных значений. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют, что в основе противовоспалительного действия PGR лежит его способность предотвращать повышение проницаемости кровеносных сосудов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пролил-глицил-пролин (PGR), воспаление, проницаемость сосудов, противовоспалительное действие.

ВВЕДЕНИЕ

Большинство патологических процессов, происходящих в организме, сопровождается развитием воспалительной реакции. Для восстановления нарушенных функций организма важно понять роль эндогенных регуляторных систем в этом процессе. Большой интерес вызывают регуляторные пептиды, которые образуются в очаге воспаления в результате деградации белков межклеточного матрикса. К таким пептидам относится трипептид пролил-глицил-пролин (PGR) – типичный представитель семейства глипролинов [1]. К настоящему времени выявлен широкий спектр свойств этого пептида, свидетельствующих о его защитном действии при сопряженных с воспалением нарушениях различных систем организма. В частности, PGR и его метаболиты оказывали протективное и терапевтическое действие на слизистую оболочку желудка

при ulcerогенезе различной этиологии [2], уменьшали количество нейтрофилов в очаге воспаления при перитоните, вызванного внутрибрюшинным введением крысам 1% раствора уксусной кислоты [3]. На модели острого экспериментального перитонита (внутрибрюшинное введение 40% раствора тиогликолата) нами было показано, что пептид обладает выраженным противовоспалительным действием, опосредованным в определенной степени стабилизацией тучных клеток [4, 5]. Тучные клетки – источник многих вазоактивных медиаторов, вызывающих повышение проницаемости эндотелия кровеносных сосудов [6], одного из первых признаков воспалительного ответа [7]. На основании этого мы предположили, что PGR может влиять на проницаемость кровеносных сосудов и, как следствие, на формирование отека при воспалительном ответе. Выяснению этого и посвящена наша работа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пептид PGP был синтезирован в Институте молекулярной генетики РАН, Москва.

В работе использовали самцов белых беспородных крыс весом 180–220 г. Эксперименты выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

Отек лапы у крыс вызвали подкожным введением 0.2 мг гистамина (Sigma, США) в 0.1 мл физиологического раствора. Толщину и окружность лапы измеряли каждый час в течение 4 ч.

Через 2 ч после индукции воспаления гистамином у животных под эфирным наркозом непосредственно из зоны воспаления вырезали образец ткани, который сразу же помещали в раствор RNAlater (Ambion).

РНК из образцов тканей выделяли с использованием TriReagent (Sigma, США) согласно протоколу производителя.

Для получения одноцепочечных кДНК к 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Fermentas, США) (1 ед. фермента на 1 мкг РНК), добавляли 80 пмоль произвольно выбранных 9-членных праймеров и инкубировали в течение 5 мин при 70°C. Затем в смесь на льду вносили 25 мкл RT-MIX (RT-Buf 10× (Fermentas, США)), 40 мМ dNTP, 10 ед. RNAsin (Promega, США) и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. После этого вносили 200 ед. обратной транскриптазы M-MuLV (Fermentas, США) и проводили реакцию при 42°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали прогреванием смеси при 70°C в течение 10 мин. Объем пробы доводили до 200 мкл деионизированной водой. Пробу хранили при –20°C.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием амплификатора iCycler iQ5 (BioRad Laboratories GmbH, Германия). Матрицей для ПЦР служила кДНК. Реакционная смесь включала: 10 пмоль 5'- и 3'-праймеров, 1.6 мМ MgCl₂, 0.25 мкМ dNTP, амплификационный буфер 10× с интеркалирующим флуоресцентным красителем Eva Green («Синтол», Россия), 1 ед. Taq-ДНК-полимеразы («Синтол», Россия). Реакционную смесь предварительно прогревали в течение 10 мин при 95°C и проводили 40 циклов денатурации (95°C), отжига (60°C) и полимеризации (72°C) с определением количества накопленного продукта по спектру флуоресценции в конце стадии элонгации. Каждую реакцию проводили в трех повторах. В работе использовали следующие праймеры:

cox-2 F–5'–CCATGTCAAAACCGTGGTGAATG–3',
cox-2 R–5'–ATGGGAGTTGGGAGTCATCAG–3',
gapdh RN F–5'–CTGACATGCCGCCTGGAGAAA–3',

gapdh RN R–5'–TGGAAGAATGGGAGTTGCTGT–TGA–3'.

Ген домашнего хозяйства *gapdh* использовали в качестве референсного для выравнивания внесенного в реакцию количества транскриптов. Праймеры подбирали с помощью программы VectorNTI. Температуру отжига праймеров и количество циклов для амплификации каждого из фрагментов подбирали экспериментально. Обработку результатов эксперимента и расчет относительного уровня экспрессии проводили с помощью программ Bio-Rad iQ5 2.0 Standard Edition Optical System Software и REST 2005. Коэффициент эффективности реакции рассчитывали с использованием программы LinRegPCR.

Острый экспериментальный перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 40% раствора тиогликолата (Fluka, Швейцария) в дозе 4 г/кг, и определяли проницаемость кровеносных сосудов желудка и тонкого кишечника. Для этого краситель Evans blue (Sigma, США) вводили шприцем (50 мг/кг) в яремную вену. Через 15 мин животных наркотизировали, вскрывали и отбирали образцы экссудата. Затем животных транскардиально перфузировали в течение 2–3 мин физиологическим раствором, содержащим 20 ед./мл гепарина. Выделяли желудок и тонкий кишечник, измельчали и взвешивали. Для экстракции красителя ткани заливали формидом (Scharlau Chemie S.A.) и инкубировали в течение 48 ч при 37°C. Затем пробы центрифугировали в течение 15 мин при 2000 об/мин. Количество красителя определяли на спектрофотометре Multiscan EX (Thermo Scientific) при λ = 620 нм и выражали в мкг/г ткани и в мкг/мл экссудата.

Результаты обрабатывали статистически с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни в компьютерной программе STATISTICA 6. Критической величиной значимости считали 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов для формирования отека животным подкожно вводили в лапу 0.2 мг гистамина в объеме 100 мкл. За 30 мин до индукции воспаления в ту же лапу внутримышечно вводили PGP в дозе 3.7 мкмоль/кг. Другой группе опытных животных вводили диклофенак 1 мг/кг (Nemopharm, Сербия). Контрольным животным вместо пептида вводили физиологический раствор. Измеряли толщину и окружность лапы и выражали в процентах от исходных значений (до введения препарата). Результаты представлены на рис. 1.

Толщина и окружность лапы через 30 мин после введения гистамина увеличивались в среднем на 20.5%. После предварительного введения пептида отек лапы был значительно меньше, уже через 1 ч

окружность лапы уменьшилась на 29.5% по сравнению с контролем, а через 2 и 3 ч – на 38 и 47% соответственно. Через 2 ч после индукции воспаления толщина лапы была на 38% меньше, чем в контроле, а через 3 ч на 35%.

Таким образом, предварительное введение PGP приводило к уменьшению отека. Это подтверждает выявленное ранее противовоспалительное действие пептида. Сравнение эффектов PGP и нестероидного противовоспалительного препарата диклофенак (рис. 1) показало, что пептид и диклофенак действовали одинаково – уменьшали отек, вызванный гистамином. Это наводит на мысль о возможном сходстве механизмов их действия. Известно, что диклофенак подавляет циклооксигеназу-2 (COX-2) – один из основных ферментов в цепи синтеза простагландинов из арахидоновой кислоты. Поэтому в следующей серии экспериментов мы исследовали влияние PGP на экспрессию гена *cox-2* при воспалении, вызванном подкожным введением гистамина в лапу. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Подкожное введение гистамина практически в 5 раз увеличивало экспрессию гена *cox-2* через 2 ч после начала воспаления. Предварительное введение диклофенака приводило к снижению уровня экспрессии исследуемого гена на 31%. Однако при введении пептида уровень экспрессии гена не изменялся и оставался таким же, как при воспалении. Это свидетельствует о различиях в механизмах противовоспалительного действия PGP и диклофенака.

Поскольку формирование отека обусловлено повышением проницаемости эндотелия сосудов, мы оценили влияние PGP на изменение проницаемости кровеносных сосудов в желудке и тонком кишечнике при остром перитоните у крыс.

Животным опытной группы за 15 мин до внутрибрюшинного введения тиогликолата внутримышечно вводили PGP в дозе 3.7 мкмоль/кг. Животные другой группы вместо PGP получали физиологический раствор. Третьей группе животных вводили физиологический раствор без последующей индукции воспаления. Об уровне проницаемости судили по количеству красителя Evans blue в экссудате и образцах тканей желудка и кишечника.

Полученные результаты представлены на рис. 3. Видно, что проницаемость в контроле (5.9 мкг краски на 1 г ткани в желудке и 3.7 мкг/г в тканях тонкого кишечника (рис. 3А)) существенно отличается от проницаемости при воспалении. Проницаемость кровеносных сосудов в желудке увеличивалась в среднем на 66%, а в кишечнике – в 2.4 раза. Предварительное введение пептида не приводило к повышению проницаемости в желудке и кишечнике. Повышенный уровень проницаемости после

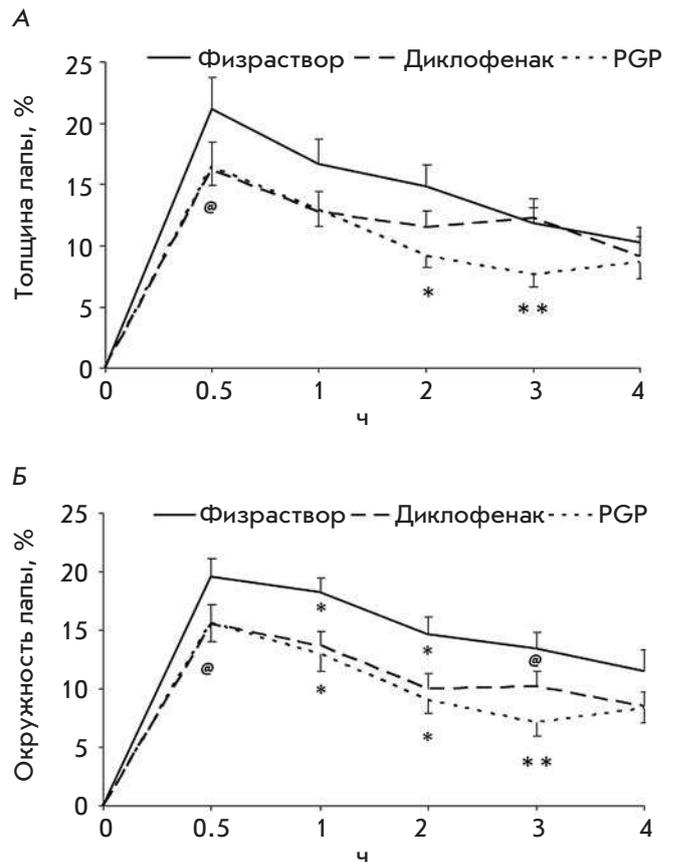


Рис. 1. Влияние PGP и диклофенака на изменение толщины (А) и окружности (Б) лапы при воспалении, вызванном гистамином.

* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, @ – $p < 0.1$

введения тиогликолата, как и эффект от введения пептида, сохранялся в течение 2 ч.

Кроме того, о снижении проницаемости сосудов свидетельствует уменьшение количества экссудата в перитонеальной полости на 14% и количества красителя в экссудате (мкг/мл) практически в 2 раза (рис. 3Б,В).

Таким образом, предварительное введение PGP предотвращает повышение проницаемости сосудов в желудке и тонком кишечнике. Объем экссудата и количество красителя в нем также остаются на уровне контрольных значений.

Способность PGP препятствовать увеличению проницаемости сосудистого эндотелия может быть связана как с прямым действием пептида на сосуды [8], так и с его стабилизирующим действием на тучные клетки [9], медиаторы которых, как известно, вносят большой вклад в инициацию и регуляцию

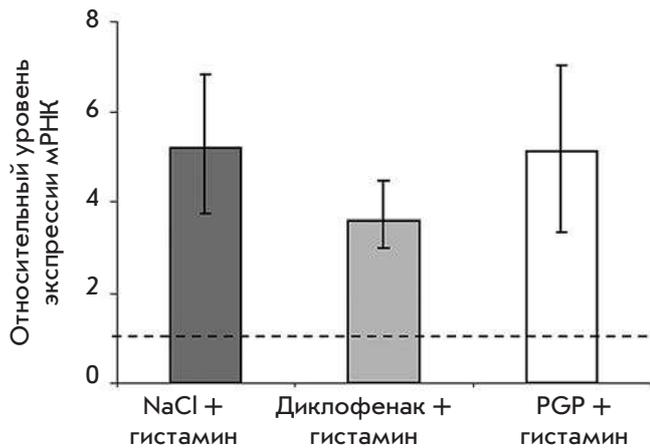


Рис. 2. Уровень экспрессии мРНК циклооксигеназы-2. Пунктирной линией обозначен уровень экспрессии в норме

проницаемости сосудов. В ходе наших экспериментов установлено, что пептид нельзя рассматривать как классический противовоспалительный препарат, такой, как диклофенак, поскольку, несмотря на внешнее сходство наблюдаемых эффектов, механизмы их действия различаются.

Сведения об участии PGP в регуляции воспалительного процесса противоречивы. С одной стороны, достоверно установлено защитное действие глипролинов при различных нарушениях, сопряженных с воспалением. Так, они не только оказывают протекторное действие на слизистую оболочку желудка при образовании язвы, но и защищают клетки от окислительного стресса и участвуют в регуляции иммунного статуса организма [10].

С другой стороны, PGP и его ацетилированная по N-концу форма (N-АсPGP) являются хемоаттрактантами для нейтрофилов [11]. Реализация этой активности опосредована взаимодействием с рецепторами CXCR2 нейтрофилов. Эти пептиды привлекают нейтрофилы в очаг воспаления и тем самым пролонгируют процесс. Вместе с тем, рецепторы CXCR2 обладают селективностью по отношению к лигандам, что может приводить к запуску сигнальных каскадов, направленных как на усиление, так и на ограничение воспаления [12]. Кроме того, в последнее время появились данные о том, что связывание N-АсPGP с рецепторами CXCR2 нейтрофилов, моноцитов и макрофагов способствует проявлению терапевтического эффекта данного пептида при сепсисе. Установлено, что введение мышам N-АсPGP приводило к увеличению продукции интерферона- γ и интерлейкина (IL)-12, а также к ингибированию

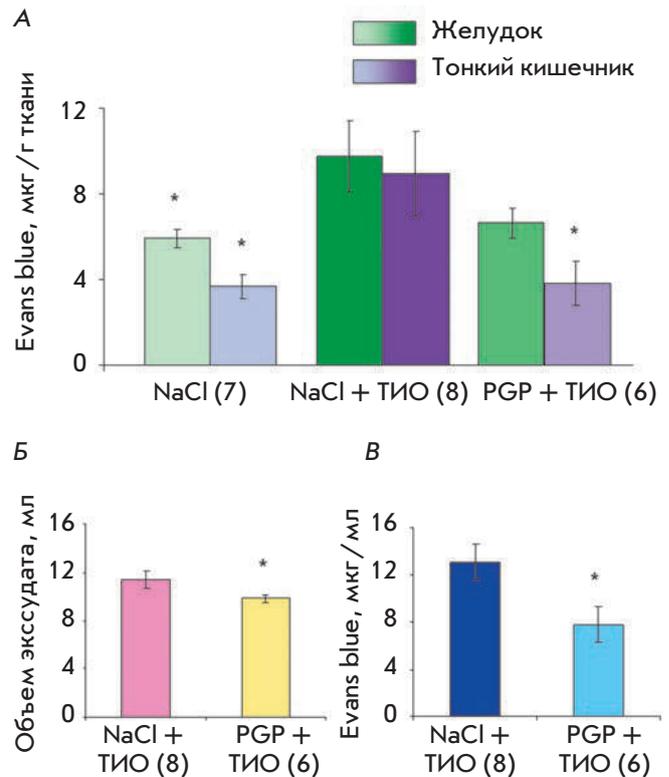


Рис. 3. Изменение проницаемости сосудов желудка и тонкого кишечника (А), объема перитонеального экссудата (Б) и количества красителя в экссудате (В) при экспериментальном остром перитоните у крыс через 30 мин после введения тиогликолата. * – $p < 0.05$. ТИО – тиогликолат. Цифрами в скобках указано количество животных в каждой группе

продукции провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β и IL-6) в перитонеальной жидкости. *In vitro* N-АсPGP непосредственно увеличивал продукцию интерферона- γ и снижал стимулированную липополисахаридами продукцию TNF- α макрофагами селезенки мыши и лейкоцитами человека [12]. Эти данные свидетельствуют о том, что наличие у пептидов хемоаттрактантной активности не отрицает их способности в определенных условиях проявлять противовоспалительные свойства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность полученных нами данных позволяет считать, что в основе противовоспалительного действия пептида наряду со стабилизацией тучных клеток лежит его способность предотвращать повышение проницаемости кровеносных сосудов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е. // Биохимия. 1998. Т. 63. № 2. С. 149–155.
2. Ашмарин И.П., Самонина Г.Е., Бадмаева К.Е., Бакаева З.В., Васьяковский Б.В., Золотарев Ю.А. // Успехи физиол. наук. 2006. Т. 37. № 2. С. 11–18.
3. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е. // Цитокины и воспаление. 2008. Т. 7. № 2. С. 28–32.
4. Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Бакаева З.В., Гончарова Е.Л., Бондаренко Н.С. // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8. № 3. С. 44–47.
5. Умарова Б.А., Бондаренко Н.С., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е. // Биол. мембраны. 2011. Т. 28. № 4. С. 262–266.
6. Kumar P., Shen Q., Pivetti C.D., Lee E.S., Wu M.H., Yuan S.Y. // Expert Rev. Mol. Med. 2009. V. 11. P. e19.
7. Kunder C.A., St John A.L., Abraham S.N. // Blood. 2011. V. 118. № 20. P. 5383–5393.
8. Бакаева З.В., Бадмаева К.Е., Сергеев И.Ю., Самонина Г.Е. // Бюл. эксп. биол. мед. 2003. Т. 135. № 4. С. 390–393.
9. Bondarenko N.S., Yusipovich A.I., Kovalenko S.S., Kopylova G.N., Umarova B.A., Graevskaya E.E., Maksimov G.V. // Biologicheskie Membrany. 2013. V. 30. № 3. P. 199–205.
10. Andreeva L.A., Mezentseva M.V., Nagaev I.Y., Shapoval I.M., Shcherbenko V.E., Potapova L.A., Russu L.I., Narovlyansky A.N., Ershov F.I., Myasoedov N.F. // Dokl. Bio. Sci. 2010. V. 434. P. 300–303.
11. Haddox J.L. Pfister R.R., Sommers C.I., Blalock J.E., Villain M. // Investigative Ophthalmol. Visual Sci. 1999. V. 40. № 10. P. 2427–2429.
12. Kim S.D., Lee H.Y., Shim J.W., Kim H.J., Yoo Y.H., Park J.S., Bae Y.-S. // Am. J. Respiratory Crit. Care Med. 2011. V. 184. № 2. P. 243–251.

УДК 618.19-006.6-091.8-033.2-08:615.28

Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии

Т. С. Геращенко^{1,2}, М. В. Завьялова^{1,2,3}, Е. В. Денисов^{1,2}, Н. В. Крахмаль^{1,3}, Д. Н. Паутова², Н. В. Литвяков^{1,2}, С. В. Вторушин^{1,3}, Н. В. Чердынцева^{1,2}, В. М. Перельмутер^{1,3}

¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634050, Томск, пер. Кооперативный, 5

²Томский государственный университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 36

³Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2

*E-mail: d_evgeniy@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 13.03.2016

Принята к печати 11.11.2016

РЕФЕРАТ Рак молочной железы (РМЖ) характеризуется значительной внутриопухолевой морфологической гетерогенностью. Изучена взаимосвязь между различными морфологическими структурами, частотой метастазирования и эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) в группах больных РМЖ, получавших ($n = 434$) и не получавших ($n = 249$) НАХТ. Изучена также вовлеченность эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ. Показана значительная ассоциация внутриопухолевой морфологической гетерогенности с риском метастазирования РМЖ и ответом на НАХТ, в большинстве случаев коррелирующая с вкладом альвеолярных и трабекулярных структур. В частности, повышенная частота лимфогенного метастазирования обнаружена в опухолях, содержащих альвеолярные или трабекулярные структуры, по сравнению с опухолями без данных структур. Наличие альвеолярных или трабекулярных структур связано с повышенной частотой гематогенного метастазирования и низкой безметастатической выживаемостью больных, получавших НАХТ. Более того, альвеолярные или трабекулярные структуры были ассоциированы с отсутствием ответа на НАХТ. Интересно, что корреляция между альвеолярными структурами и высокой вероятностью гематогенного метастазирования опухоли выявлена только у пациенток, устойчивых к НАХТ, тогда как ассоциация трабекулярных структур была справедлива только в случае РМЖ, чувствительного к химиотерапии. Альвеолярные структуры были ассоциированы с химиорезистентностью только в группе с лимфогенными метастазами, в то время как трабекулярные структуры, напротив – только в группе без лимфогенных метастазов. В целом, увеличение морфологического разнообразия опухоли коррелировало с повышением лекарственной устойчивости и частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования РМЖ. Показана переменная экспрессия эпителиальных (*EPSCAM* и *CDH1*) и мезенхимальных (*ITGA5*, *ITGB5*, *CDH2*, *CDH11*, *TGF β 2*, *ZEB1*, *MMP2*, *DCN*, *MST1R*) маркеров и, тем самым, разная выраженность ЭМП в различных морфологических структурах. Таким образом, внутриопухолевую морфологическую гетерогенность РМЖ можно рассматривать как фактор, отражающий метастатический потенциал и чувствительность опухоли к химиотерапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внутриопухолевая гетерогенность, инвазия, метастазирование, рак молочной железы, химиотерапия, эпителиально-мезенхимальный переход.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ НАХТ – неoadъювантная химиотерапия; РМЖ – рак молочной железы; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из основных характеристик злокачественности опухоли – неоднородность ее клеточного состава, или внутриопухолевая гетерогенность. Впервые неоднородность клеток по форме и морфологии в пределах одной опухоли была описана еще Рудольфом Вирховым в 19 веке [1]. Со времен Вирхова представления о феномене внутриопухолевой гетерогенности значительно расширились. В настоящее время известно, что различные популяции клеток могут сосуществовать в опухоли и оказывать специфическое влияние на ее биологическое поведение [2]. Высокая степень внутриопухолевой гетерогенности ассоциирована с плохим клиническим прогнозом, а наличие определенных популяций клеток связывают с метастазированием и формированием лекарственной устойчивости опухоли [3]. Изучение различных форм внутриопухолевой гетерогенности и особенностей ее влияния на клиническое течение злокачественных новообразований является важнейшей проблемой современной онкологии.

Опухоли молочной железы характеризуются значительной вариабельностью клеточного состава, а также гистологической, экспрессионной, генотипической гетерогенностью [4]. Описана внутриопухолевая морфологическая гетерогенность инвазивной карциномы молочной железы неспецифического типа, наиболее распространенной гистологической формы РМЖ (частота встречаемости до 80%). Согласно классификации ВОЗ, клетки РМЖ могут быть организованы в корды (от англ. cords), кластеры и трабекулы, в некоторых опухолях преобладает солидный или синцитиальный клеточный компонент [5]. Кроме того, в пределах опухолей молочной железы могут встречаться тубулярные, альвеолярные, железисто-сосочковые и солидные формирования опухолевых клеток, а также участки наподобие карцинома либо представляющие собой фокусы скirrра [6]. В наших предыдущих исследованиях сделан акцент на изучение тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных структур и дискретных групп опухолевых клеток, их генетическом и экспрессионном портрете и их ассоциации с частотой лимфогенного метастазирования и эффективностью неoadъювантной химиотерапии РМЖ [7–12].

Ранее мы предположили, что различные типы структур могут быть морфологическим проявлением инвазивного роста опухоли молочной железы [8, 13]. Так, принято выделять индивидуальную и коллективную формы инвазии, представленные различными вариантами, которые отличаются друг от друга по форме и механизмам клеточной миграции. Индивидуальная миграция может проходить как амебоидным путем за счет регулируемых акто-

миозином сокращений цитолеммы, так и мезенхимальным (фибробластоподобным) с приобретением клетками вытянутой формы, усилением адгезии к внеклеточному матриксу и протеолитической активности. Коллективная инвазия осуществляется посредством мезенхимальной миграции групп опухолевых клеток (кластеров, солидных структур и др.) [13, 14]. Ключевым механизмом клеточной миграции является трансформация эпителиальных клеток в мезенхимальные в ходе ЭМП и приобретение ими локомоторного фенотипа [15]. Эпителиальные клетки в ходе ЭМП теряют межклеточные взаимодействия и апикально-базальную полярность, приобретают вытянутую форму и подвижность, что помогает им отделяться от основного опухолевого пласта. Описанные изменения регулируются факторами транскрипции Snail, Twist, Slug, ZEB1, ZEB2 и сопровождаются утратой молекул межклеточной адгезии (E-кадгерин, EpcAM и др.) и приобретением мезенхимальных характеристик – экспрессии N-кадгерина, виментина и т.д. [14, 16–19]. Известно, что инвазивный рост тесно связан с процессом метастазирования и влияет непосредственно на формирование лекарственной устойчивости [15].

В настоящей работе рассмотрена связь частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования и эффективности назначаемой терапии с наличием в первичной опухоли молочной железы различных морфологических структур. С целью понимания вовлеченности процесса инвазии в формирование внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ проанализирован паттерн экспрессии генов, связанных с ЭМП, в различных морфологических структурах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Морфологический анализ и ассоциативные исследования

В работе проанализированы две группы больных РМЖ, проходивших лечение в отделении общей онкологии Томского НИИ онкологии. Первая группа включала 427 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа $T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$ в возрасте от 28 до 90 лет (средний возраст 49.9 ± 9.44 лет), получавших 2–4 курса НАХТ по схемам: CMX/CMF, CAH, FAC, таксаны. Во вторую группу вошли 249 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа $T_{1-4}N_{0-3}M_{0-1}$ в возрасте от 21 до 85 (средний возраст 56.02 ± 11.16 лет), не получавших НАХТ. Характеристика пациенток приведена в *табл. 1* и *2*.

В образцах биопсий и операционного материала, полученных от больных обеих групп, оценивали при-

Таблица 1. Клинико-патологическая характеристика пациенток, получавших НАХТ

Клинико-патологический параметр	Показатель	Число случаев, %
Возраст	≤ 50 лет	230 (53.8)
	> 50 лет	197 (46.2)
Состояние менструальной функции	Сохраненная менструальная функция	224 (52.4)
	Менопауза	203 (47.6)
Размер опухоли	T ₁	101 (23.7)
	T ₂	266 (62.3)
	T ₃	48 (11.2)
	T ₄	12 (2.8)
Лимфогенные метастазы	N ₀	213 (49.9)
	N ₁	138 (32.3)
	N ₂	64 (15.0)
	N ₃	12 (2.8)
Гематогенные метастазы	M ₀	220 (51.5)
	M ₁	127 (29.7)
	Нет данных	80 (18.8)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	Есть	167 (39.1)
	Нет	158 (37.0)
	Нет данных	102 (23.8)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	Есть	154 (36.1)
	Нет	173 (40.5)
	Нет данных	100 (23.4)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (HER2)	-	160 (37.5)
	+	76 (17.9)
	++	26 (6.0)
	+++	8 (1.8)
	Нет данных	157 (36.8)
Молекулярный подтип	Люминальный	153 (35.8)
	Трижды негативный	96 (22.5)
	HER2-позитивный	26 (6.1)
	Нет данных	152 (35.6)
Схема НАХТ	CMX/CMF	165 (38.7)
	CAH	56 (13.1)
	Таксаны	31 (7.2)
	FAС	110 (25.8)
	Нет данных	65 (15.2)
Эффект НАХТ	Полная регрессия	27 (6.3)
	Частичная регрессия	183 (42.9)
	Стабилизация	133 (31.2)
	Прогрессия	21 (4.9)
	Нет данных	63 (14.7)

Примечания: CMX – циклофосфан, метотрексат, кселода; CMF – циклофосфан, метотрексат, 5-фторурацил; FAС – 5-фторурацил, адрибластин, циклофосфан; CAH – циклофосфан, адрибластин, кселода; таксаны – доцетаксел, паклитаксел.

Таблица 2. Клинико-патологическая характеристика пациенток, не получавших НАХТ

Параметр	Показатель	Число случаев, %
Возраст	≤50 лет	77 (31.0)
	>50 лет	172 (69.0)
Состояние менструальной функции	Сохраненная менструальная функция	169 (67.9)
	Менопауза	80 (32.1)
Размер опухоли	T ₁	145 (58.2)
	T ₂	95 (38.2)
	T ₃	8 (3.2)
	T ₄	1 (0.4)
Лимфогенные метастазы	N ₀	146 (58.6)
	N ₁	65 (26.1)
	N ₂	26 (10.5)
	N ₃	12 (4.8)
Гематогенные метастазы	M ₀	222 (89.2)
	M ₁	27 (10.8)
Экспрессия рецепторов к эстрогенам	Есть	184 (74.0)
	Нет	65 (26.0)
Экспрессия рецепторов к прогестерону	Есть	159 (63.9)
	Нет	90 (36.1)
Экспрессия рецепторов эпидермального фактора роста (HER2)	Есть	48 (19.3)
	Нет	201 (80.7)
Молекулярный подтип	Люминальный	195 (78.3)
	Трижды негативный	36 (14.5)
	HER2-позитивный	17 (6.8)
	Нет данных	1 (0.4)

сутствие морфологических структур. Биопсийный и операционный материалы, представленные двумя–шестью образцами опухоли молочной железы, использовали для подготовки двух срезов (5–6 мкм). Срезы окрашивались гематоксилином и эозином и просматривались двумя–тремя врачами-патологами на предмет представленности различных морфологических структур (тубулярных, альвеолярных, солидных, трабекулярных и дискретных групп опухолевых клеток) в соответствии с [10].

Эффективность НАХТ оценивали по результатам инструментального исследования (УЗИ и маммография) по шкале RECIST [20]. Под клинически объективным ответом на НАХТ подразумевалась полная или частичная регрессия опухоли, под отсутствием ответа – стабилизация или прогрессирование.

Проведены ассоциативные исследования связи клинических параметров заболевания у пациенток обеих групп и эффективности химиотерапии в груп-

пе, получавшей НАХТ, с наличием в опухолях различных морфологических структур. Полученные данные обрабатывали с помощью стандартных непараметрических методов (критерий χ^2 и критерий Фишера) с использованием программного пакета Statistica 8.0 for Windows. Показатели выживаемости оценивали по методу Каплан–Майера. Обсуждали результаты с достоверностью различий при $p < 0.05$.

Экспрессионный анализ

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в ЭМП: *ERCAM, ITGA5, ITGB5, CDH1, CDH2, CDH11, TGFb2, ZEB1, MMP2, DCN, MST1R*, проведен в различных морфологических структурах опухолей молочной железы с помощью количественной ПЦР в режиме реального времени. Использовали замороженные образцы опухолевой ткани, полученные в ходе оперативного вмешательства от семи пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифиче-

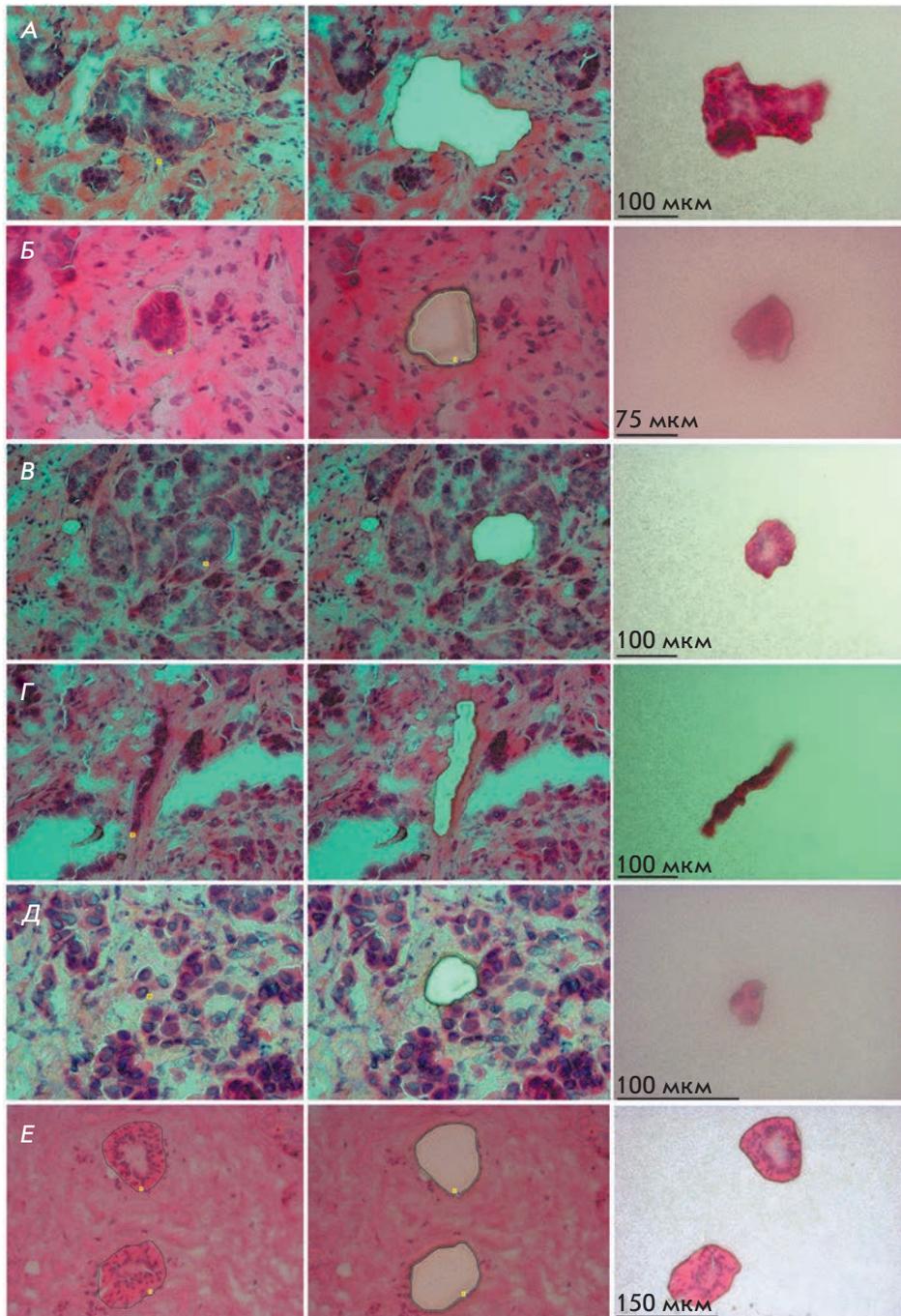


Рис. 1. Лазерная микродиссекция различных морфологических структур и морфологически неизменных протоков из опухолевой и нормальной тканей молочной железы соответственно. Представлены срезы до и после микродиссекции, а также полученные структуры: А – солидная, Б – альвеолярная, В – тубулярная, Г – трабекулярная, Д – дискретная группа опухолевых клеток, Е – морфологически неизменные протоки молочных желез. Окраска гематоксилином и эозином

ского типа люминального В молекулярного подтипа ($T_{1-2}N_{0-3}M_0$, возраст от 42 до 65 лет, средний возраст 56.42 ± 8.75 лет), не получавших НАХТ. Из окрашенных гематоксилином и эозином срезов свежемороженых образцов опухолевой ткани молочной железы с помощью технологии лазерной микродиссекции PALM (Carl Zeiss, Германия) согласно ранее опубликованной методике (рис. 1) получили пять типов морфологических структур [8, 21]. В частности, получены тубулярные, альвеолярные и трабекулярные

структуры (90–120 образцов, ~900–1200 клеток), солидные структуры (50–60 образцов, до 5000 клеток) и дискретные группы опухолевых клеток (300–350 образцов, ~400–600 клеток). Для предотвращения попадания компонентов стромы в образцы лазерную микродиссекцию проводили по краю наружного эпителиального слоя морфологических структур. Из полученных в результате микродиссекции образцов выделяли суммарную РНК (RNeasy Micro Plus Kit, Qiagen, США) и оценивали ее целостность

(RIN) с помощью системы автоматического электрофореза (2200 TapeStation, Agilent, США). РНК подвергали обратной транскрипции (кДНК), лигированию и полнотранскриптомной амплификации (QuantiTect Whole Transcriptome, Qiagen, США). Амплифицированную кДНК использовали для проведения ПЦР согласно [8]. Результаты экспрессионного анализа нормализовали относительно экспрессии в морфологически неизменных протоках молочной железы, также полученных в ходе лазерной микродиссекции образцов прилегающей к опухоли нормальной ткани. Уровень экспрессии оценивали относительно экспрессии референсного гена *ACTB* с использованием метода Pfaffl [22].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Хорошо известно, что химиотерапия влияет на популяционный состав опухоли. Изменения, возникающие в опухолевых клетках под действием химиотерапии, в значительной степени определяют дальнейшее течение заболевания: лекарственную устойчивость, метастазирование и рецидивирование [23–25]. В связи с этим нами проанализированы две независимые выборки больных РМЖ, получавших и не получавших НАХТ.

Выраженность лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных РМЖ, не получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

Наличие либо альвеолярных, либо трабекулярных структур в опухоли пациенток, не получавших НАХТ, ассоциировано с большей частотой лимфогенного метастазирования РМЖ по сравнению с опухолями без данных структур (47.8 против 23.2%, $p = 0.0004$; 43.0 против 30.0%, $p = 0.0012$ соответственно, *рис. 2А*). Отсутствие в опухоли дискретных групп клеток связано с увеличением частоты гематогенного метастазирования по сравнению с опухолями, содержащими данные структуры (16.9 против 8.2%, $p = 0.043$, *рис. 2В*). Выявленные закономерности согласуются с полученными ранее на меньшей выборке больных данными о сопряженности альвеолярных структур с частотой лимфогенного метастазирования [7, 10, 11] и трабекулярных структур с вероятностью возникновения лимфогенного метастазирования на уровне тенденции [12].

Выраженность лимфогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

У пациенток, получавших НАХТ, частота лимфогенного метастазирования опухолей, содержащих аль-

веолярные или трабекулярные структуры, или дискретные группы клеток, была выше, чем опухолей без этих структур (64.2 против 33.0%, $p < 0.0001$; 57.7 против 36.8%, $p < 0.0001$; 59.3 против 41.4%, $p = 0.0002$ соответственно, *рис. 2Б*). Ранее мы уже описали связь между присутствием альвеолярных структур в опухолях больных, получавших НАХТ, и повышением вероятности лимфогенного метастазирования. Однако исследуемая группа была меньшего размера, а закономерность прослеживалась только у пациенток в состоянии менопаузы [26]. У пациенток с альвеолярными или трабекулярными структурами частота лимфогенного метастазирования была выше, независимо от эффекта химиотерапии ($p = 0.0032$ и $p < 0.0001$; $p = 0.0004$ и $p = 0.0152$, *рис. 3А*). Напротив, в группе с клинически объективным ответом на химиотерапию частота лимфогенного метастазирования у пациенток с дискретными группами клеток в опухоли была выше, чем у больных, опухоли которых не имели этих структур (53.8 против 34.0%, $p = 0.0041$ соответственно, *рис. 3А*).

Выраженность гематогенного метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от внутриопухолевой морфологической гетерогенности

У пациенток с альвеолярными или трабекулярными структурами в опухолях частота гематогенного метастазирования была выше, чем у женщин с опухолями без таких структур (42.8 против 27.3%, $p = 0.0036$; 41.9 против 20.7%, $p = 0.0005$, *рис. 2Г*). Более того, больные с альвеолярными или трабекулярными структурами имели низкие показатели безметастатической выживаемости в сравнении с пациентками без данных структур ($p = 0.0087$; $p = 0.0073$ соответственно, *рис. 4А,Б*). Связь альвеолярных структур с гематогенным метастазированием выявлена только у пациенток, опухоли которых были устойчивы к химиотерапии (58.5 против 31.0%, $p = 0.0030$, *рис. 3Б*), тогда как в случае трабекулярных структур такая связь наблюдалась только у пациенток, чувствительных к химиотерапии (34.3 против 9.3%, $p = 0.0011$, *рис. 3Б*). Кроме того, связь морфологических структур с гематогенным метастазированием зависела от состояния менструальной функции. Так, альвеолярные и солидные структуры были ассоциированы с высокой частотой гематогенного метастазирования только у больных с сохраненной менструальной функцией (48.0 против 26.5%, $p = 0.0059$; 50.0 против 33.0%, $p = 0.028$ соответственно, *рис. 3Д*), тогда как трабекулярные структуры оказались связанными с высокой вероятностью развития отдаленных метастазов только в подгруппе пациенток, находящихся в менопаузе (41.4 против 9.7%, $p = 0.0002$, *рис. 3Д*).

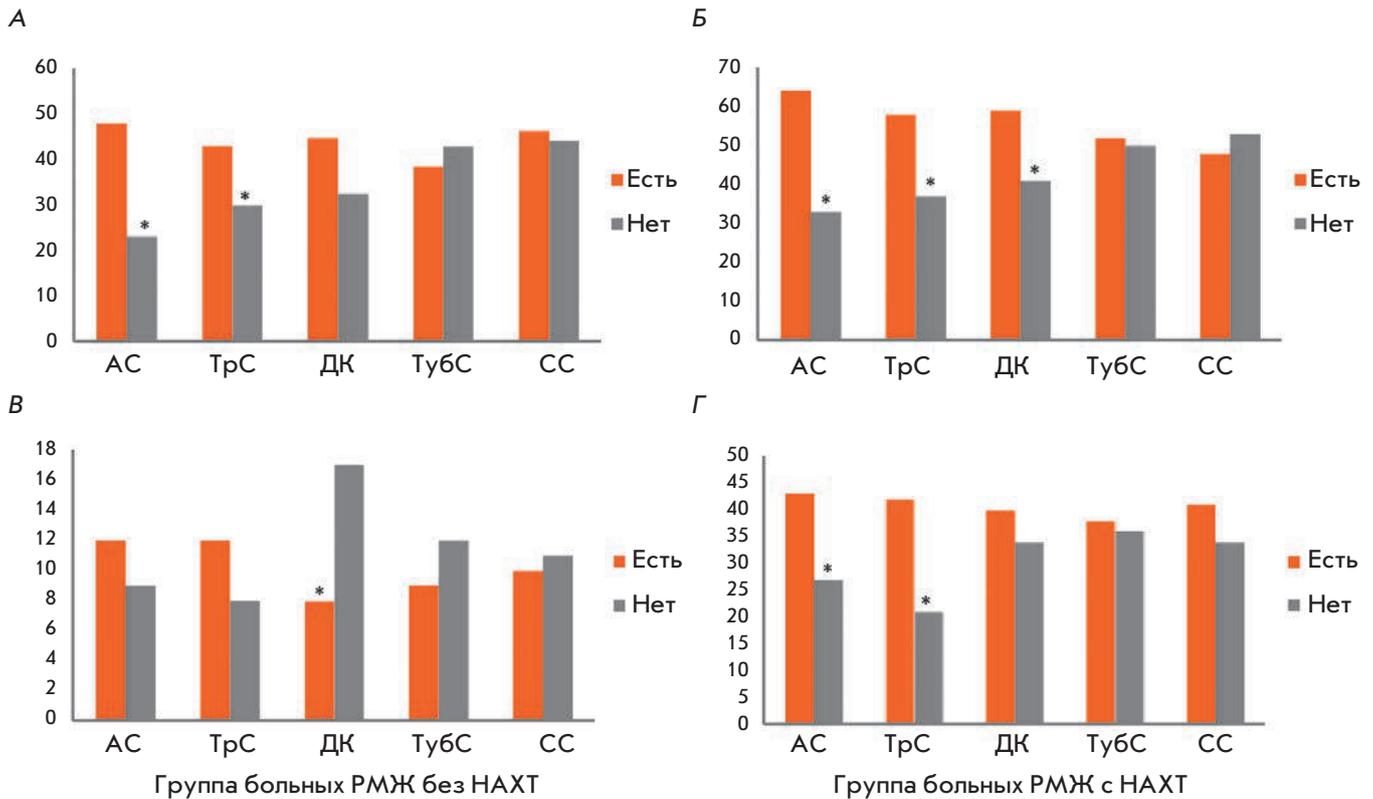


Рис. 2. Частота лимфогенного (А, Б) и гематогенного (В, Г) метастазирования у больных РМЖ в зависимости от наличия в опухоли различных типов морфологических структур. А – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных, не получавших НАХТ. Б – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных, получавших НАХТ. В – частота (%) гематогенного метастазирования у больных, не получавших НАХТ. Г – частота (%) гематогенного метастазирования у больных, получавших НАХТ. АС – альвеолярные структуры; ТрС – трабекулярные структуры; ДК – дискретные группы опухолевых клеток; ТубС – тубулярные структуры; СС – солидные структуры. * – статистически значимые различия ($p < 0.05$)

Зависимость эффективности НАХТ от внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ

Наличие альвеолярных или трабекулярных структур в опухолях молочной железы чаще сочеталось с отсутствием ответа на НАХТ по сравнению с опухолями без данных структур (50.3 против 35.8%, $p = 0.0056$; 50.7 против 31.6%, $p = 0.0004$ соответственно, *рис. 3В*). Ранее на меньшей выборке больных мы описали сопряженность альвеолярных и трабекулярных структур с химиорезистентностью РМЖ и рассмотрели возможные механизмы такой взаимосвязи [8, 9]. Интересно, что связь альвеолярных структур с химиорезистентностью наблюдалась только в группе с лимфогенными метастазами: 57.1 (наличие структур) против 36.2% (больные без структур; $p = 0.0089$ соответственно, *рис. 3Г*). В то же время связь трабекулярных структур с химиорезистентностью обнаружена только у пациенток без лимфогенных метастазов (45.8 против 28.0%, $p = 0.0117$ соответ-

ственно, *рис. 3Г*). Связь структур с эффективностью НАХТ также зависела от менопаузы больных РМЖ. Присутствие альвеолярных, либо трабекулярных структур, либо дискретных групп клеток было связано с отсутствием ответа на химиотерапию только в подгруппе больных, находящихся в репродуктивном периоде (51.0 против 33.3%, $p = 0.0133$; 56.2 против 24.7%, $p = 0.0000$; 50.0 против 35.0%, $p = 0.0365$ соответственно, *рис. 3Е*). Наличие солидных структур оказалось связанным с клинически объективным ответом на химиотерапию только у пациенток с сохраненной менструальной функцией (67.0 против 48.4%, $p = 0.0094$, *рис. 3Е*).

Следует отметить, что лекарственная устойчивость, высокая частота лимфогенного и гематогенного метастазирования в целом чаще наблюдались в опухолях с тремя–пятью типами структур по сравнению с опухолями с одним–двумя вариантами структур ($p = 0.0082$; $p < 0.0001$; $p = 0.0005$ соответственно, *рис. 5*).

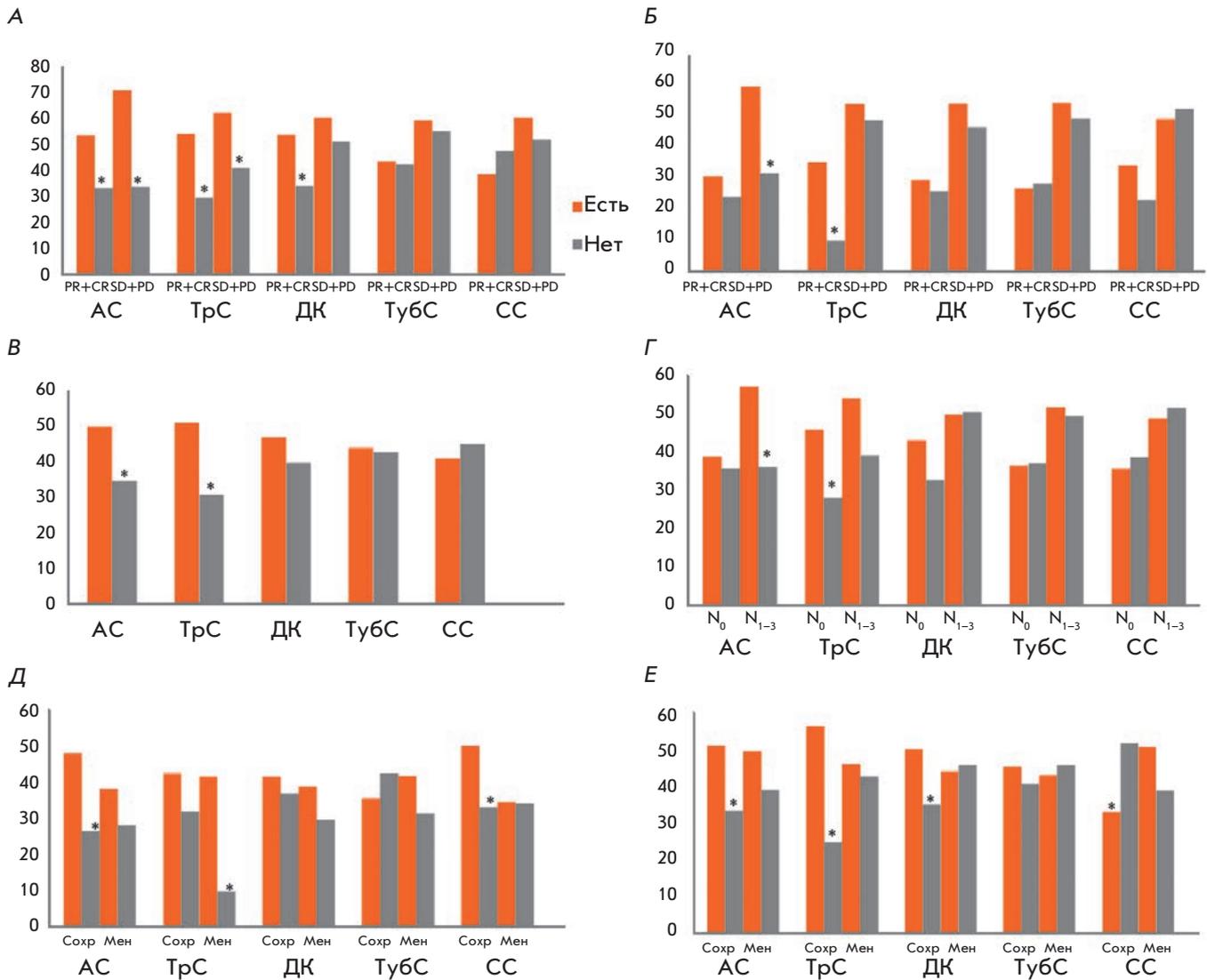


Рис. 3. Эффект химиотерапии и частота метастазирования у больных РМЖ, получавших НАХТ, в зависимости от присутствия в опухоли различных типов морфологических структур. А, Б – частота (%) лимфогенного и гематогенного метастазирования у больных с отсутствием и наличием ответа на химиотерапию. В – частота (%) отсутствия ответа на неоадьювантную химиотерапию. Г – частота (%) отсутствия ответа на неоадьювантную химиотерапию в группах больных с/без лимфогенных метастазов. Д, Е – частота (%) гематогенного метастазирования и отсутствия ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных, находящихся в репродуктивном периоде и в менопаузе. АС – альвеолярные структуры; ТрС – трабекулярные структуры; ДК – дискретные группы опухолевых клеток; ТубС – тубулярные структуры; СС – солидные структуры; Сохр – сохраненная менструальная функция; Мен – менопауза; N₀ – отсутствие лимфогенных метастазов; N₁₋₃ – наличие лимфогенных метастазов; PR + CR (от англ. partial response + complete response) – частичная и полная регрессия (клинически объективный ответ на НАХТ); SD + PD (от англ. stable disease + progressive disease) – стабилизация и прогрессирование заболевания (отсутствие ответа на НАХТ). * – статистически значимые различия (p < 0.05)

Анализ ассоциации внутриопухолевой морфологической гетерогенности с частотой метастазирования и эффективностью НАХТ в зависимости от схемы химиотерапии, молекулярного подтипа РМЖ и размера опухоли не проводили, ввиду непропорционального соотношения числа случаев в подгруппах.

Экспрессия генов ЭМП в различных морфологических структурах опухолей молочной железы

Анализ экспрессии генов, вовлеченных в ЭМП, показал, что для каждой из структур характерен специфический набор маркеров (рис. 6). Экспрессия ге-

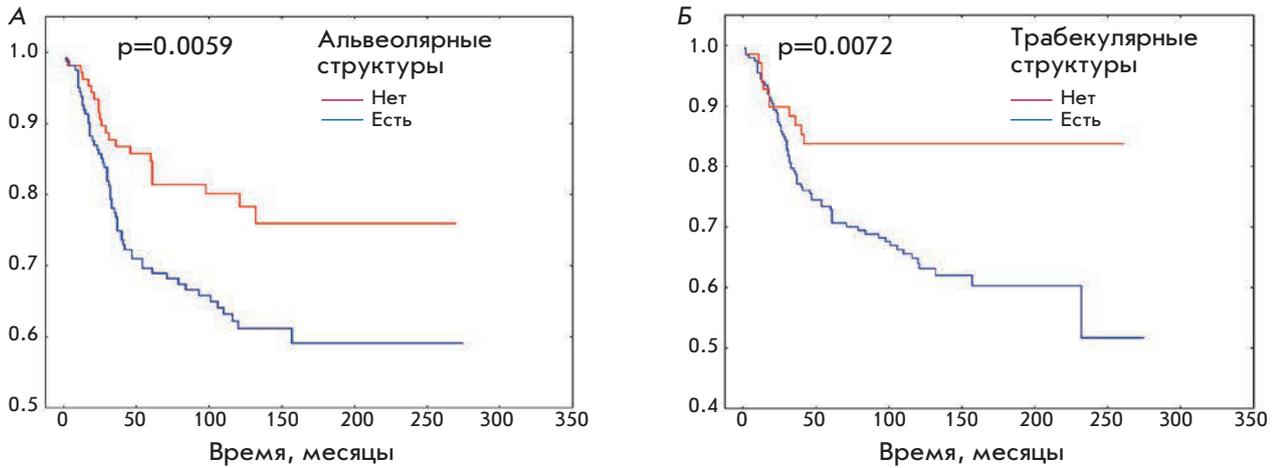


Рис. 4. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ с наличием в опухоли альвеолярных (А) или трабекулярных структур (Б)

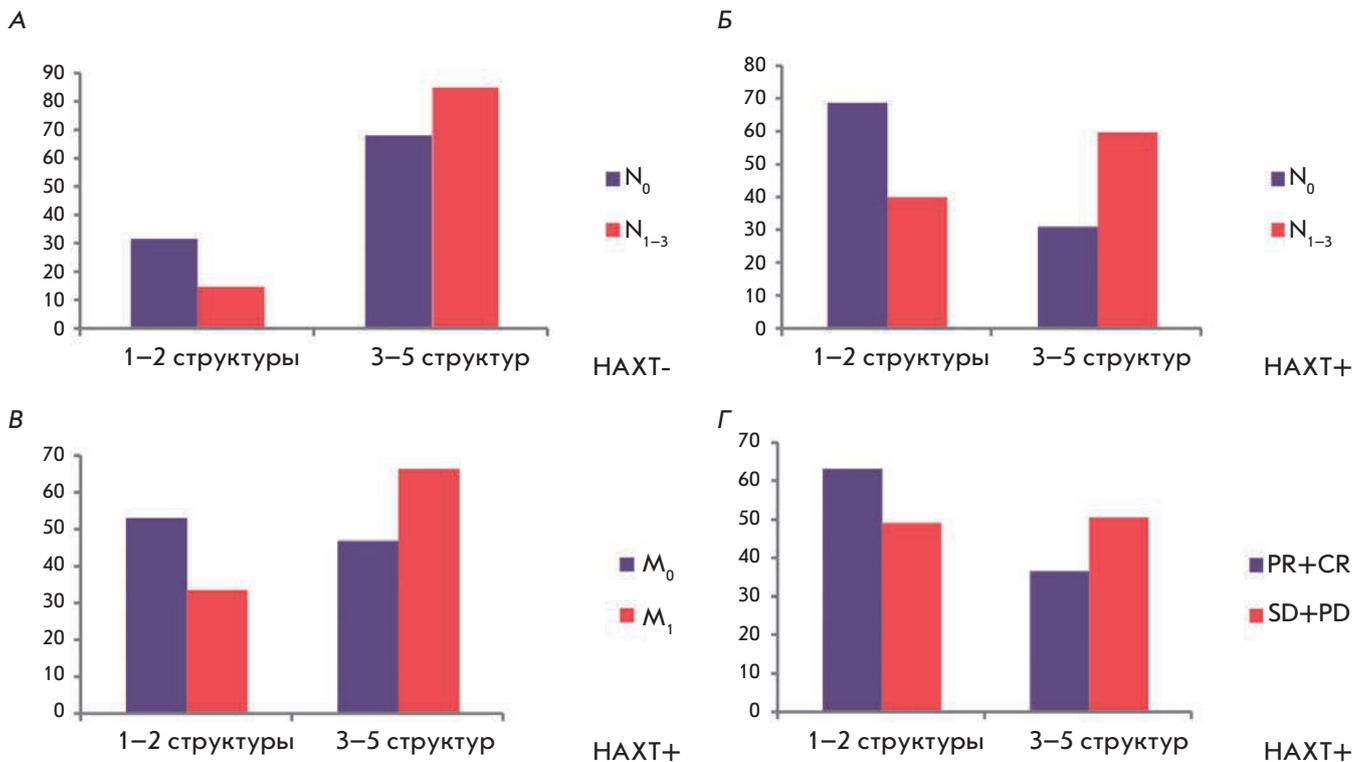


Рис. 5. Эффект химиотерапии и частота метастазирования в зависимости от количества различных типов морфологических структур в опухолях больных РМЖ. А – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей, не получавших НАХТ. Б – частота (%) лимфогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей, получавших НАХТ. В – частота (%) гематогенного метастазирования у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей. Г – частота (%) отсутствия ответа на неоадьювантную химиотерапию у больных с низким (1–2 структуры) и высоким (3–5 структур) морфологическим разнообразием опухолей. НАХТ- – больные без неоадьювантной химиотерапии; НАХТ+ – больные с неоадьювантной химиотерапией. На рисунке представлены статистически значимые различия ($p < 0.05$)

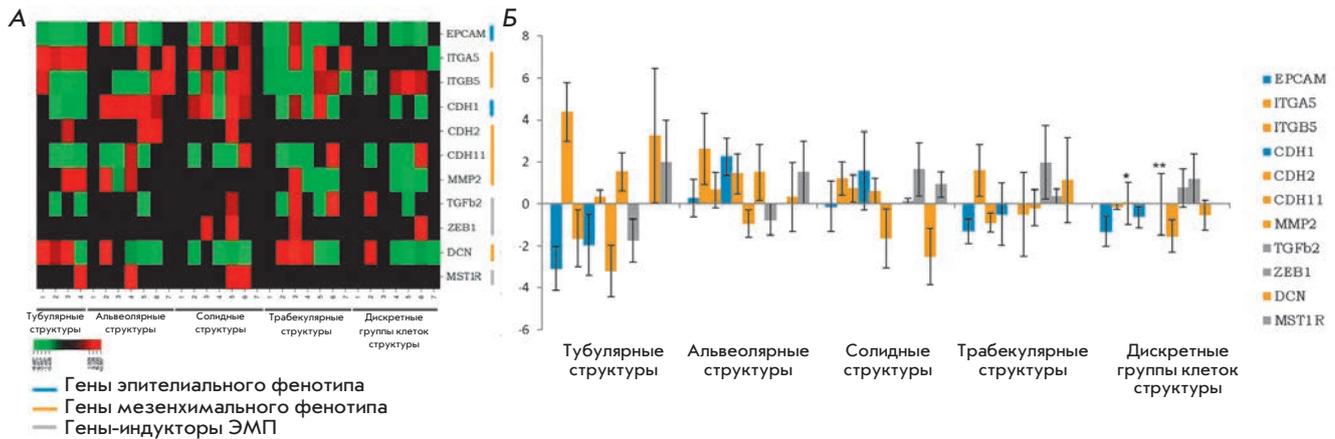


Рис. 6. Экспрессия генов ЭМП в различных морфологических структурах опухолей молочной железы. **А** – тепловая карта уровня экспрессии. **Б** – логарифмированное среднее значение уровня экспрессии. * – уровень экспрессии равен 0.029. ** – уровень экспрессии равен 0.016. Большая величина стандартной ошибки среднего обусловлена малым количеством пациенток в изучаемой группе, значительным варьированием уровня экспрессии между пациентками и отсутствием экспрессии в некоторых образцах морфологических структур

нов эпителиального фенотипа *EPCAM* и *CDH1* была свойственна всем структурам (рис. 6Б). Однако тубулярные, трабекулярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток имели низкий уровень экспрессии (рис. 6Б). Экспрессия генов-индукторов ЭМП – *TGFb2*, *ZEB1* и *MST1R* была гетерогенной как в различных опухолях молочной железы, так и в структурах (рис. 6А). *ZEB1* и *MST1R* чаще экспрессировались в солидных структурах, тогда как *TGFb2* – в трабекулярных структурах. Экспрессия генов мезенхимального фенотипа (*CDH2*, *CDH11*, *ITGA5*, *ITGB5*, *MMP2* и *DCN*) проявлялась в разной степени. *CDH2*, кодирующий классический мезенхимальный маркер – N кадгерин, в большинстве структур не экспрессировался. Экспрессия гена интегрина (*ITGA5*) практически полностью отсутствовала в дискретных группах опухолевых клеток и была более выраженной в тубулярных и трабекулярных структурах. Напротив, экспрессия гена *ITGB5*, как и гена протеогликана декорина (*DCN*), равномерно встречалась в различных структурах. Интересно, что экспрессия гена матриксной металлопротеиназы 2 (*MMP2*) отсутствовала только в солидных структурах (рис. 6А).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты говорят о дифференциальном вкладе различных морфологических структур в химиорезистентность и прогрессию РМЖ. С диссеминацией опухолевых клеток как лимфогенной, так и гематогенной, в наибольшей степени связаны альвеолярные и трабекулярные структуры. Интересно, что вклад альвеолярных и трабеку-

лярных структур в гематогенное метастазирование, а также влияние дискретных групп клеток на частоту лимфогенного метастазирования наблюдали только в группе больных, получавших химиотерапию. Очевидно, что химиотерапия является фактором, модулирующим опухолевую прогрессию РМЖ. Любопытно, что в группе больных с НАХТ присутствие в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур было одновременно связано как с частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования, так и с химиорезистентностью, что говорит о взаимосвязи данных процессов. Связь между альвеолярными и трабекулярными структурами и частотой лимфогенного метастазирования не зависела от эффекта химиотерапии. Ассоциацию альвеолярных структур с частотой гематогенного метастазирования наблюдали только в группе пациенток, устойчивых к НАХТ, трабекулярных – у больных с клинически объективным ответом. Вероятно, зависимость высокой частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования и лекарственной устойчивости от морфологического разнообразия опухоли в целом объясняется также увеличением доли альвеолярных и трабекулярных структур в общем объеме морфологических компонентов. Показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность значительно влияет на клинический исход РМЖ. Об этом говорят показатели безметастатической выживаемости: у больных с альвеолярными или трабекулярными структурами в опухоли выживаемость оказалась значимо ниже, чем у пациенток без данных структур.

Ранее мы предположили, что морфологические структуры различного типа можно отнести к вари-

антам инвазивного роста: дискретные группы клеток представляют индивидуальную миграцию, солидные, альвеолярные, трабекулярные и тубулярные структуры – различные виды коллективной миграции [8, 13]. В ходе инвазивного роста опухолевые клетки мигрируют из первичного очага посредством интравазации в лимфатические и/или кровеносные сосуды с последующей диссеминацией в другие органы. Неопластические клетки не обладают запрограммированной способностью к миграции, они приобретают эту способность путем запуска сигнальных каскадов *de novo*, ответа на цитокиновую стимуляцию или под влиянием противоопухолевой терапии. ЭМП как центральная молекулярная программа, индуцируемая в ходе клеточной миграции мезенхимального типа, создает предпосылки для формирования как минимум трех фенотипических состояний опухолевых клеток: эпителиального, мезенхимального и переходного эпителиально-мезенхимального [27, 28]. Наиболее агрессивным считается переходное состояние, при котором клетка обладает гибридным фенотипом, приобретая мезенхимальные характеристики и частично оставляя сохранными эпителиальные черты [27–29]. Кроме того, как показано в условиях *in vitro*, гибридное состояние ЭМП связано с повышенным образованием сфероидов – кластеров опухолевых клеток (2–50 клеток), обладающих способностью к интравазации в кровеносные сосуды и связанных с более выраженным метастазированием [27, 28]. Интересно, что альвеолярные структуры по форме и количеству клеток подобны сфероидам, циркулирующим в крови онкологических больных, а по результатам настоящего исследования присутствие альвеолярных структур в опухоли связано с повышением частоты лимфогенного и гематогенного метастазирования. По всей видимости, альвеолярные структуры, наряду с трабекулярными, представляют собой варианты коллективной миграции с гибридным эпителиально-мезенхимальным фенотипом, что наделяет их агрессивными характеристиками и, как следствие, высокой метастатической активностью. Действительно, по результатам оценки экспрессии генов эпителиального и мезенхимального состояний альвеолярные и трабекулярные структуры характеризовались переходным состоянием, сохраняя эпителиальные (*EPCAM*, *CDH1*) и мезенхимальные черты (*CDH11*, *ITGB5*, *MMP2*, *DCN* и др.). Солидные структуры можно также отнести к переходному состоянию ЭМП, но с преобладанием эпителиальных характеристик (*EPCAM*, *CDH1*). Так, солидные структуры во многом могут быть вариантом коллективной миграции с парциальным (частичным) ЭМП в зоне инвазивного фронта [13, 14]. Связь альвеолярных структур с повышенным отдаленным мета-

стазированием может также объясняться участием данных морфологических вариантов в формировании преметастатических ниш путем высокой продукции цитокинов и факторов роста [30].

Интересно, что тубулярные структуры характеризовались низкой экспрессией эпителиальных маркеров *EPCAM* и *CDH1* наряду с повышенной экспрессией генов мезенхимального фенотипа – *DCN*, *ITGA5*, *MMP2*. Морфология тубулярных структур, по форме напоминающая нормальные протоки молочных желез, скорее говорит об эпителиальности этих морфологических объединений. Кроме того, наличие тубулярных структур в опухоли стандартно используется как благоприятный прогностический признак при определении степени злокачественности: чем больше тубулярных структур в опухоли, тем ниже степень злокачественности, и наоборот [31]. Подтверждают положительное прогностическое значение тубулярных структур и наши предыдущие данные: повышение соотношения трабекулярных и тубулярных структур (Тр/Туб) в опухоли связано с высокой частотой гематогенного метастазирования. Так, при коэффициенте Тр/Туб, равном 2, риск гематогенного метастазирования в 5 раз выше, чем при Тр/Туб, равном 1 [32]. Вероятно, экспрессию мезенхимальных маркеров в тубулярных структурах можно объяснить тем, что часть структур претерпевает начальные этапы ЭМП. Кроме того, существуют данные, согласно которым эпителиальные клетки в пределах гетерогенной опухоли могут способствовать поддержанию переходного состояния других опухолевых клеток, претерпевающих ЭМП, за счет секреции стимулирующих факторов [19].

Дискретные группы опухолевых клеток как варианты индивидуальной миграции являются наиболее гетерогенными по составу морфологическими компонентами опухоли, они могут содержать одиночные клетки или группы клеток, вероятно, способные передвигаться как мезенхимальным, так и амeboидным путями. Фенотип дискретных групп опухолевых клеток характеризуется переменным экспрессионным портретом с низкой представленностью эпителиальных маркеров на фоне незначительного повышения мезенхимальных черт. Последнее было несколько неожиданным, поскольку образование одиночных опухолевых клеток или небольших их скоплений скорее происходит в результате ЭМП, когда клетки утрачивают эпителиальные черты и способность формировать многоклеточные кластеры. В то же время акцент делается на то, что использования известных маркеров мезенхимального фенотипа, часть из которых мы использовали в нашей работе, недостаточно для суждения о наличии или отсутствии мезенхимальности у опухолевых клеток [33].

Опубликовано немало сведений о том, что назначаемая в предоперационном периоде химиотерапия способна модифицировать геном опухолевых клеток и влиять на популяционный состав опухоли [23–25]. Показано, что молекулярный профиль образцов первичной опухоли трижды негативного РМЖ после НАХТ отличается от профиля биопсийных образцов тех же опухолей до проведения химиотерапии [34]. Установлено, что химиотерапевтическое воздействие способно инициировать образование и/или экспансию клеточных популяций, устойчивых к терапии [24]. Под воздействием НАХТ морфологические структуры опухолей молочной железы могли приобрести дополнительные признаки, усиливающие опухолевую диссеминацию и способствующие последующему формированию химиорезистентности. Более того, лекарственная устойчивость и инвазия являются тесно взаимосвязанными процессами, поддерживаемыми друг друга в процессе злокачественного роста [15, 35, 36]. Подобная взаимосвязь хорошо прослеживается на примере альвеолярных и трабекулярных структур, связанных одновременно и с высокой частотой лимфогенного и гематогенного метастазирования новообразования, и с устойчивостью к проводимой терапии. Все дело в том, что в мигрирующих клетках активируются общие для инвазии и химиорезистентности сигнальные пути. Каскад, запускаемый через интегрины, кадгеринины, малые GTP-азы Ras и Rho, пересекается с молекулярными путями PI3K, mTOR, Src и MAP-киназ [15, 35]. Состояние ЭМП, которое претерпевают мигрирующие клетки, уменьшает чувствительность клеток к противоопухолевой терапии [18, 24]. Опухолевые клетки, находящиеся в процессе ЭМП, проявляют высокую устойчивость к радиотерапии и ряду химиотерапевтических агентов [24]. Кроме того, ЭМП индуцирует работу АВС-транспортеров и активацию альтернативных онкогенных сигнальных путей EGFR, RAF, MEK, что способствует формированию

устойчивости к лекарственной и в том числе к таргетной терапии [37, 38].

Таким образом, биологическое поведение опухоли во многом зависит от особенностей ее инвазивного роста [14, 15]. Нами показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ, вероятно, представленная вариантами инвазивного роста на различных стадиях ЭМП, может быть фактором, определяющим метастатический потенциал опухоли, способность клеток отвечать на проводимую терапию и влиять на клинический исход заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основной преградой на пути к успешной диагностике и лечению онкологических заболеваний является внутриопухолевая гетерогенность. Ввиду значительного внутриопухолевого разнообразия современные биопсийные методы диагностики не дают развернутого представления о дальнейшем характере клинической манифестации опухоли. Нами показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность РМЖ, представленная вариантами инвазивного опухолевого роста, ассоциирована с частотой лимфогенного, гематогенного метастазирования и эффективностью предоперационной терапии. Возможно, именно морфологическое разнообразие опухоли может лечь в основу создания эффективной модели для разработки прогностических и предиктивных критериев рака молочной железы, а альвеолярные и трабекулярные структуры как ключевые индикаторы агрессивного опухолевого роста – стать мишенями при разработке таргетной терапии.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00318). Е.В. Денисов поддержан программой повышения конкурентоспособности ТГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Virchow R. Cellular Pathology as Based upon Physiological and Pathological Histology. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1863.
- Fisher R., Pusztai L., Swanton C. // Br. J. Cancer. 2013. V. 108. № 3. P. 479–485.
- Almendo V., Marusyk A., Polyak K. // Annu. Rev. Pathol. 2013. V. 8. P. 277–302.
- Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S. // Expert. Rev. Anticancer Ther. 2012. V. 12. № 8. P. 1021–1032.
- Lakhani S.R., Ellis I.O., Schnitt S.J., Tan P.H., van de Vijver M.J. World Health Organization (WHO) classification of tumours of the breast. Lyon, France: IARC Press, 2012.
- Давыдов М.И., Летагин В.П. Рак молочной железы (Атлас). М.: АБВ-пресс, 2006.
- Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глущенко С.А. // Сиб. онкол. журн. 2006. Т. 1. С. 32–35.
- Denisov E.V., Gerashchenko T.S., Zavyalova M.V., Litviakov N.V., Tsyganov M.M., Kaigorodova E.V., Slonimskaya E.M., Kzhyshkowska J., Cherdyntseva N.V., Perelmutter V.M. // Neoplasma. 2015. V. 62. № 3. P. 405–411.
- Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmutter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // Sci. Rep. 2014. V. 4. P. 4709.
- Zavyalova M.V., Perelmutter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. // Diagn. Cytopathol. 2013. V. 41. № 3. P. 279–282.
- Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko

- T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., et al. // *BioRes. Open Access*. 2013. V. 2. № 2. P. 148–154.
12. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Стахеева М.Н., Савенкова О.В., Крицкая Н.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. // *Сиб. онкол. журн.* 2008. Т. 6. С. 30–34.
13. Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М. // *Acta Naturae*. 2015. Т. 7. № 2. С. 18–31.
14. Friedl P., Alexander S. // *Cell*. 2011. V. 147. № 5. P. 992–1009.
15. Alexander S., Friedl P. // *Trends Mol. Med.* 2012. V. 18. № 1. P. 13–26.
16. De Craene B., Berx G. // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 2. P. 97–110.
17. Александрова А.Ю. // *Биохимия*. 2014. V. 79. № 9. P. 1169–1187.
18. Nieto M.A. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011. V. 27. P. 347–376.
19. Neelakantan D., Drasin D.J., Ford H.L. // *Cell Adh. Migr.* 2015. V. 9. № 4. P. 265–276.
20. Hayward J.L., Carbone P.P., Heuson J.C., Kumaoka S., Segaloff A., Rubens R.D. // *Cancer*. 1977. V. 39. № 3. P. 1289–1294.
21. Denisov E.V., Skryabin N.A., Vasilyev S.A., Gerashchenko T.S., Lebedev I.N., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V., Perelmuter V.M. // *J. Clin. Pathol.* 2015. V. 68. № 9. P. 758–762.
22. Pfaffl M.W. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 9. P. e45.
23. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 5. P. 323–334.
24. Saunders N.A., Simpson F., Thompson E.W., Hill M.M., Endo-Munoz L., Leggatt G., Minchin R.F., Guminski A. // *EMBO Mol. Med.* 2012. V. 4. № 8. P. 675–684.
25. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Slonimskaya E.M., Ibragimova M.K., Kazantseva P.V., Kzhyshkowska J., Choinzonov E.L. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 7. P. 7829–7841.
26. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Крицкая Н.В., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А. и др. // *Успехи геронтологии*. 2008. Т. 21. № 4. С. 643–653.
27. Grosse-Wilde A., Fouquier d'Herouel A., McIntosh E., Ertaylan G., Skupin A., Kuestner R.E., del Sol A., Walters K.A., Huang S. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 5. P. e0126522.
28. Huang R.Y., Wong M.K., Tan T.Z., Kuay K.T., Ng A.H., Chung V.Y., Chu Y.S., Matsumura N., Lai H.C., Lee Y.F., et al. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. P. e915.
29. Bulfoni M., Gerratana L., Del Ben F., Marzinotto S., Sorrentino M., Turetta M., Scoles G., Toffoletto B., Isola M., Beltrami C.A., et al. // *Breast Cancer Res.* 2016. V. 18. № 1. P. 30.
30. Таширева Л.А., Денисов Е.В., Савельева О.Е., Геращенко Т.С., Завьялова М.В., Перельмутер В.М. // *Biopolymers Cell*. 2015. Т. 31. № 6. С. 429–435.
31. Bloom H.J., Richardson W.W. // *Br. J. Cancer*. 1957. V. 11. № 3. P. 359–377.
32. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю. // *Сиб. онкол. журн.* 2006. Т. 3. С. 29–33.
33. Westcott J.M., Prechtl A.M., Maine E.A., Dang T.T., Esparza M.A., Sun H., Zhou Y., Xie Y., Pearson G.W. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 5. P. 1927–1943.
34. Balko J.M., Giltane J.M., Wang K., Schwarz L.J., Young C.D., Cook R.S., Owens P., Sanders M.E., Kuba M.G., Sanchez V., et al. // *Cancer Discov.* 2014. V. 4. № 2. P. 232–245.
35. Häger A., Alexander S., Friedl P. // *Eur. J. Cancer Suppl.* 2013. V. 11. № 2. P. 291–293.
36. Alexander S., Weigelin B., Winkler F., Friedl P. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2013. V. 25. № 5. P. 659–671.
37. Mallini P., Lennard T., Kirby J., Meeson A. // *Cancer Treat. Rev.* 2014. V. 40. № 3. P. 341–348.
38. Holohan C., van Schaeybroeck S., Longley D.B., Johnston P.G. // *Nat. Rev. Cancer*. 2013. V. 13. № 10. P. 714–726.

УДК 577.21

Дифференцировка плюрипотентных клеток человека в мезодермальные и эктодермальные производные не зависит от типа репрограммированных изогенных соматических клеток

Е. С. Филоненко^{1*}, М. В. Шутова^{1*}, Е. А. Хомякова^{1,2}, Е. М. Васина¹, О. С. Лебедева², С. Л. Киселев^{1,2,3}, М. А. Лагарькова^{1,2,3*}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1А

³Казанский федеральный университет, 420000, Казань, ул. Кремлевская, 18

* Эти авторы внесли равный вклад в работу.

*E-mail: lagar@vigg.ru

Поступила в редакцию 22.04.2016

Принята к печати 01.06.2016

РЕФЕРАТ Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке во все типы соматических клеток. Это делает их универсальным источником клеток для исследований и клинического применения. Однако процесс репрограммирования клеток того или иного типа, отбор клонов, проведение генетических манипуляций могут влиять на свойства как иПСК, так и получаемых из них дифференцированных производных. Для оценки этого влияния использована изогенная система линий иПСК, полученных методом репрограммирования из трех типов соматических клеток, дифференцированных из эмбриональных стволовых клеток человека. Показано, что технологические манипуляции *in vitro*, такие, как сортировка клеток и отбор клонов, не приводят к эффекту «бутылочного горлышка», а изогенные иПСК, полученные из различных соматических клеток, не отличаются по способности к дифференцировке в гемопоэтическое и нейральное направления. Таким образом, для использования иПСК в научных или практических целях не принципиально, из клеток какого типа получены полностью репрограммированные клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гемопоэз, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, метилирование, нейроны, транскрипция, эмбриональные стволовые клетки человека.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ иПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК — плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

ВВЕДЕНИЕ

Изменение эпигенетического состояния клетки с помощью тех или иных внешних условий кардинальным образом влияет на программу специализированной соматической клетки [1, 2]. При этом наиболее часто используемые интеграционные вирусные или неинтеграционные способы репрограммирования до плюрипотентного состояния не влияют существенно на геном соматических клеток, подвергающихся репрограммированию [3]. Практическое

использование индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в медицинских или исследовательских целях подразумевает применение дифференцированных производных плюрипотентных клеток. Протоколы направленной дифференцировки основаны, главным образом, на изменении эпигенетического состояния плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) при воздействии на них условий, которые имитируют процессы, происходящие во время индивидуального развития организма.

Таким образом, изначальное эпигенетическое состояние и варибельность отдельных линий iPSC, даже полученных из одного источника, могут оказывать значительное влияние на конечный результат дифференцировки. Например, для выбора линии iPSC, наиболее подходящей для трансплантации полученного из нее пигментного эпителия сетчатки глаза, проанализировано 25 линий клеток [4], что требует очень много времени и материалов. С целью изучения вклада процесса репрограммирования и эпигенома соматической клетки в конечное состояние iPSC, а также оптимизации выбора линий репрограммированных клеток нами ранее была разработана система изогенных линий плюрипотентных и соматических клеток. Изогенная система клеточных линий позволила показать, что при полном функциональном репрограммировании в клонах iPSC не остается следов их тканеспецифического происхождения. Однако в репрограммированных клетках присутствовали индивидуальные, специфичные для каждого клона iPSC «эпигенетические следы», говорящие о том, что приобретение клетками плюрипотентности произошло не обычным путем, а через прохождение клеткой состояния, отличного от зародышевого пути [5]. Появление этих индивидуальных, не связанных с репрограммированием особенностей может быть вызвано технологическими манипуляциями *in vitro*, такими, как клонирование, сортировка клеток и др. Несомненно, направленное влияние таких манипуляций на геном может отрицательно сказаться на дальнейшем применении iPSC. Так, широко обсуждается возможность создания банков репрограммированных линий клеток – как персональных, так и универсальных линий iPSC, которые будут совместимы с большим количеством реципиентов [6]. При этом открытым остается вопрос, донорские клетки какого типа (фибробласты кожи, клетки крови, волосяной луковицы и т.д.) необходимо применять для репрограммирования. По результатам наших и других исследований можно сделать вывод о функциональной идентичности изогенных iPSC, полученных из соматических клеток различного типа [5, 7]. Однако, учитывая, что в дальнейшем их придется дифференцировать в специализированные типы клеток *in vitro*, необходимо знать, насколько будет различаться их способность к дифференцировке.

В представленной работе изучали влияние генетических манипуляций, отбора клонов и разделения клеток *in vitro* на молекулярно-генетические свойства iPSC. С этой целью использовали линии изогенных соматических клеток, полученных из эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК), и их репрограммированные в iPSC производные. Сравнивали способность к дифференцировке изо-

генных линий iPSC, репрограммированных из соматических клеток трех типов, в нейрональном и гемопоэтическом направлениях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

В работе использовали линии клеток hESM01, hESM01n5 (далее n5), фибробласты, нейроны, клетки пигментного эпителия сетчатки, дифференцированные из hESM01n5 (F,N,R соответственно), и линии iPSC iF, iN, iR, полученные путем генетического репрограммирования линий F, N, R соответственно [5].

В экспериментах по гемопоэтической дифференцировке использовали линии ЭСК HUES 9 [8], H9 [9], линии iPSC endo-iPS12 [10] и IPSRG2L [11]. Линии endo-iPSS5 и endo-iPSS9 получены репрограммированием клеток HUVEC с помощью вируса Сендай. Линии iPSC культивировали согласно [5].

Среды для гемопоэтической дифференцировки

Среда 1 для эмбрионидных телец (ЭТ1): Stemline II (Sigma), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», 5000 Ед/мл пенициллина и 5000 Ед/мл стрептомицина), VEGF (Prepro Tech) 100 нг/мл, BMP-4 (Prepro Tech) 50 нг/мл, FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл.

Среда 2 для эмбрионидных телец (ЭТ2): Stemline II (Sigma), пенициллин-стрептомицин («ПанЭко», 5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина), VEGF (Prepro Tech) 100 нг/мл, BMP-4 (Prepro Tech) 50 нг/мл, FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл, цитокиновый коктейль CC110 (Stemcell Technologies) 100-кратный или SCF (Prepro Tech) 20 нг/мл. Гемангиобласты культивировали в полужидкой среде (СГБ): Methocult 4436 (Stemcell Technologies), FGF (Prepro Tech) 20 нг/мл, VEGF (Prepro Tech) 50 нг/мл, SCF (Prepro Tech) 20 нг/мл, FLT3-L (Prepro Tech) 20 нг/мл, TPO (Prepro Tech) 20 нг/мл, рекомбинантный НохВ4 2 мкг/мл.

Гемопоэтическая дифференцировка ПСК

ПСК культивировали на 35-мм чашке Петри (Corning), покрытой Matrigel matrix (BD), и выращивали до 70% монослоя и обрабатывали 0.05% раствором Trypsin-EDTA до одноклеточного состояния. Трипсин инактивировали, добавляя среду DMEM («ПанЭко») с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco). Эмбрионидные тельца формировали в Aggrewell (Stemcell Technologies) в течение 24 ч в среде mTeSR1 (Stemcell Technologies) с добавлением 10 мкМ Y-27632 (Stemgent). Переносили эмбрионидные тельца в 24-луночный планшет с низкой адгезией (Costar) в объеме 1 мл на лунку в среде ЭТ1 и инкубировали в течение 48 ч. Из лунки отби-

рали 500 мкл, добавляли 500 мкл среды ЭТ2 и инкубировали в течение 48 ч. Эмбрионидные тельца обрабатывали 0.05% Trypsin-EDTA в течение 4–6 мин. Затем трипсин инактивировали, добавляя среду DMEM с 10% FBS. Клетки центрифугировали в течение 5 мин при 200 g. Клетки (200–500 тыс. в объеме не более 100 мкл среды IMDM («ПанЭко»)) вносили в лунки 6-луночного планшета с низкой адгезией (Costar) со средой СГБ, используя шприцы (Stemcell Technologies) с тупой иглой для метилцеллюлозы. Инкубировали в течение 6–8 дней. Добавляли еще 2 мл СГБ и инкубировали 2–4 дня. Для сравнения эффективности дифференцировки подсчитывали количество колоний гемангиобластов на 10 день после внесения в СГБ.

Способность гемангиобластов дифференцироваться в клетки крови проверяли путем внесения гемангиобластов в метилцеллюлозную среду Methocult 4436 (Stemcell Technologies). Результат оценивали по истечении 3 недель.

Нейрональная дифференцировка

Нейрональную дифференцировку в нейральные предшественники и нейроны проводили согласно [11]. FACS-анализ нейральных предшественников проводили с использованием антител к CD56 PE Abcam cat # 2412540 (Sony Biotechnology) (в разведении 1 : 25) и изотипического контроля Mouse IgG1PE Abcam cat # 2600560 (1 : 166). Для флуоресцентного анализа использовали антитела к βIII-тубулину в разведении 1 : 1000 (Abcam), вторичные антитела Invitrogen Goat anti Rabbit IgG Alexa Fluor 488 в разведении 1 : 1000.

Выделение суммарной РНК из клеточных культур, ПЦР в реальном времени проводили согласно [5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Отбор и селекция иПСК не вносят системных изменений в метилирование и транскрипцию генов

Работа с культурами ПСК человека и особенно генетические манипуляции с этими клетками сопряжены с селекцией и/или клонированием клеток. Ранее мы получили и описали изогенную клеточную систему, которая позволяет изучать молекулярные механизмы процессов репрограммирования и дифференцировки [5]. В процессе создания изогенной системы несколько раз проводили последовательный отбор клонов и сортировку клеток (рис. 1). В связи с этим возник вопрос, насколько манипуляции клонирования ПСК человека в культуре могут оказывать системное влияние на полногеномном уровне на экспрессию генов и метилирование ДНК, приводя к тому, что экспрессия некоторых генов и паттерны метилирования CpG изменялись просто из-за про-

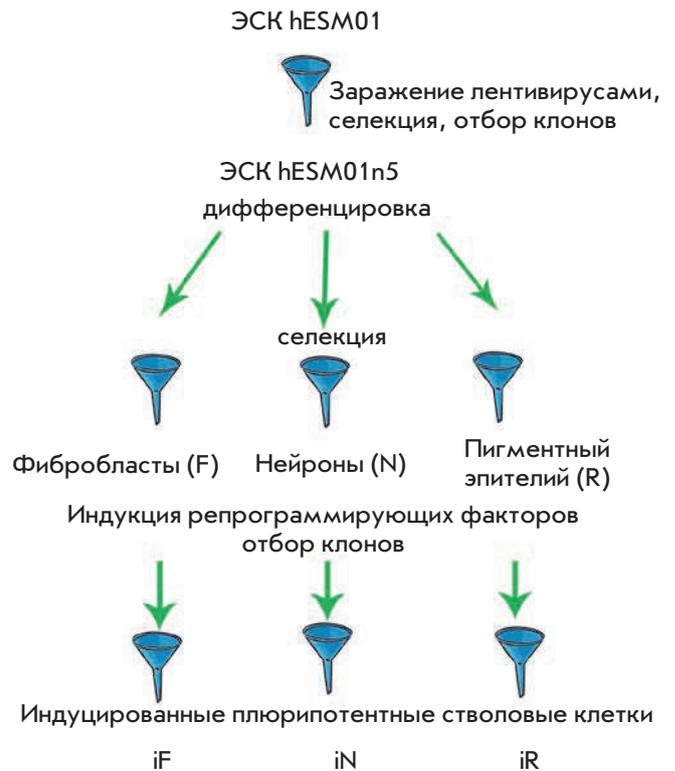


Рис. 1. Общая схема создания изогенной системы ПСК человека с изображением критических этапов прохождения клеточных популяций через «бутылочное горлышко» селекции и клонирования

хождения через «бутылочное горлышко» отбора. Селективное давление может приводить к повышенной экспрессии генов, связанных с выживанием клеток, и давать им преимущество в росте без изменения других свойств [12]. В разработанной нами системе (рис. 1) в линию ЭСК человека hESM01 были введены гены факторов репрограммирования под контролем индуцибельного промотора и выбран клон hESM01n5 (далее n5), который имел наименьший уровень «подтекания» трансгенов и сохранил свойство плюрипотентности [5]. На следующем раунде отбора использовали магнитную сортировку дифференцированных производных n5 с помощью антител к специфическим маркерам трех типов соматических клеток человека. Последний раунд прохождения через «бутылочное горлышко» произошел после индукции трансгенов и отбора клонов иПСК (рис. 1). Нами был проведен анализ профиля экспрессии генов и уровня метилирования ДНК (база данных GSE70739) в каждой линии клеток, полученных на каждом этапе разработки системы. Мы предположили, что селективное давление может приводить к последовательному изменению экспрессии и/или метилирования

Таблица 1. Гены, экспрессия которых последовательно возрастает или снижается в процессе дифференцировки ЭСК и последующего репрограммирования

иПСК	Увеличение экспрессии	Уменьшение экспрессии
iF	<i>CTGF, TAGLN</i>	<i>SOX15</i>
iN	<i>ACSL4, DDIT4, TIMP1, LOC730278</i>	<i>LFNG</i>
iR	<i>MT1A</i>	

генов, обеспечивать им преимущество в выживании и пролиферации. Для того чтобы идентифицировать гены и CpG, уровень экспрессии и метилирования которых постепенно повышался или понижался в ходе процедур отбора клеток, сравнивали уровни экспрессии/метилирования в иПСК, в родительских линиях соматических клеток и в изогенной линии ЭСК n5. Значимым считали поэтапное увеличение/уменьшение со значением 0.2 для метилирования CpG и изменение в 1.5 раза в случае экспрессии генов. Анализировали данные для 11 клеточных линий (две линии ЭСК, три линии соматических клеток и шесть линий иПСК), клетки которых прошли по три раунда «бутылочного горлышка». Было обнаружено, что транскрипция очень небольшого количества генов постепенно уменьшалась или увеличивалась во время манипуляций с клетками, но уровень транскрип-

ции ни одного гена не изменился во всех клеточных линиях синхронно (табл. 1). Это свидетельствует в пользу того, что использованный подход, идентичный для всех линий иПСК, не внес системных изменений в экспрессионный профиль клеток, а наблюдаемые отклонения в экспрессии были случайными. Однако анализ профиля метилирования изогенных линий ПСК и соматических клеток выявил постепенное увеличение уровня метилирования гена *Rex1* (также известного как *ZFP42*) (табл. 2). В настоящее время не существует однозначной информации о функции этого гена в раннем эмбриональном развитии. По мнению одних исследователей этот ген считается маркером плюрипотентности [13], однако, даже в его отсутствие ЭСК мыши способны к самообновлению и остаются плюрипотентными [14]. Как показано ранее, в ЭСК человека *Rex1* экспрессируется даже при 50% метилировании промотора [15]. С использованием ПЦР в реальном времени мы проанализировали уровень экспрессии *Rex1* и сопоставили его с метилированием промоторного участка (рис. 2). Уровень экспрессии *Rex1*, так же как и степень метилирования его промотора, существенно варьировали в проанализированных линиях плюрипотентных клеток. Однако мы не обнаружили корреляции между уровнем метилирования *Rex1* и его экспрессией. Например, в двух клонах iN (иПСК, полученные из нейронов) и одном клоне iR (иПСК, полученные

Таблица 2. Гены, уровень метилирования CpG которых последовательно возрастает или снижается в процессе дифференцировки ЭСК и последующего репрограммирования

Повышение уровня метилирования			Снижение уровня метилирования		
iF	iN	iR	iF	iN	iR
<i>IRX1</i>	<i>ZFP42</i>	<i>AJAP1</i>	<i>AJAP1</i>	<i>MSL3</i>	<i>LOC284661</i>
<i>AJAP1</i>	<i>BANK1</i>	<i>PAX8</i>	<i>CHL1</i>		<i>CD1C</i>
<i>REC8</i>	<i>ZNF454</i>	<i>ZFP42</i>	<i>MARCKS</i>		<i>RTKN</i>
<i>C19orf41</i>	<i>HIST1H1A</i>	<i>SIM1</i>	<i>ZNF311</i>		<i>RAET1L</i>
<i>CBLN4</i>	<i>LOC390595</i>	<i>DPP6</i>	<i>GCM2</i>		<i>GPNUMB</i>
<i>ZNF542</i>	<i>ZNF829</i>	<i>GNA14</i>	<i>DPP6</i>		<i>CSMD1</i>
<i>ZFP28</i>	<i>ZNF626</i>	<i>ARHGAP22</i>	<i>TCERG1L</i>		<i>MGMT</i>
<i>LOC390595</i>	<i>ZNF568</i>	<i>FIGNL2</i>	<i>MGMT</i>		<i>TCERG1L</i>
<i>TMEM132C</i>	<i>ZFP28</i>	<i>TBX5</i>	<i>GALNT9</i>		<i>DNAH9</i>
<i>EBF3</i>		<i>A2BP1</i>	<i>TMEM121</i>		<i>BAHCC1</i>
<i>PTPRN2</i>		<i>CCDC102A</i>	<i>BAHCC1</i>		
<i>ZFP42</i>		<i>HS3ST4</i>	<i>SHISA6</i>		
		<i>ARHGAP23</i>	<i>C22orf34</i>		
		<i>SHISA6</i>			
		<i>TMEM200C</i>			
		<i>MYH14</i>			
		<i>AFF2</i>			

из пигментного эпителия сетчатки) уровень экспрессии *Rex1* был более чем в 3 раза выше, чем во всех остальных линиях ПСК (рис. 2). Таким образом, культивирование, репрограммирование и отбор, которые привели к гиперметилированию промоторной области *Rex1*, не влияли на экспрессию гена в линиях иПСК. Это наблюдение дополнительно подтверждает предположение о вспомогательной роли *Rex1* в поддержании клетками плюрипотентности, а также указывает на то, что экспрессия *Rex1* не зависит от статуса метилирования и крайне неоднородна в разных линиях иПСК, как отмечали ранее [12, 15]. В целом, полученные результаты говорят о том, что процедуры генетических модификаций, селекция клонов и сортировка клеток не оказывают системного влияния на полногеномном уровне на экспрессию генов и метилирование ДНК в ПСК человека. Этот вывод имеет большое практическое значение в связи с возможным применением технологий с использованием ПСК человека в регенеративной медицине.

Сравнение способности изогенных ПСК к дифференцировке в гемопоэтическом направлении

Разработанная изогенная система анализа репрограммирования и дифференцировки ПСК человека позволила доказать, что для репрограммирования можно использовать соматические клетки любого типа, так как в установление и поддержание состояния плюрипотентности тип использованных клеток ощутимого вклада не вносит [5]. Однако, учитывая, что в дальнейшем будут использоваться дифференцированные производные ПСК, остается открытым вопрос, насколько тип соматических клеток, из которых получены иПСК, будет влиять на эффективность дифференцировки. Для оценки такого влияния было решено изучить эффективность дифференцировки изогенных иПСК человека, полученных из фибробластов (iF), нейронов (iN) и пигментного эпителия сетчатки (iR), в гемопоэтические клетки и нейроны. Для оценки эффективности гемопоэтической дифференцировки ПСК через стадию эмбрионидных телец были дифференцированы в ранние мезодермальные производные (рис. 3А). Полученные ранние мезодермальные производные обладали свойствами гемангиобласта, так как могли дифференцироваться в клетки крови (рис. 3В) и эндотелий (данные не приведены). При внесении гемангиобластов в полужидкую метилцеллюлозную среду, содержащую гемопоэтические цитокины и факторы роста, гемангиобласты образовывали разные типы гемопоэтических колоний – эритроидные (КОЕ-Э), макрофагальные (КОЕ-М), гранулоцитарные (КОЕ-Г), смешанные гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-

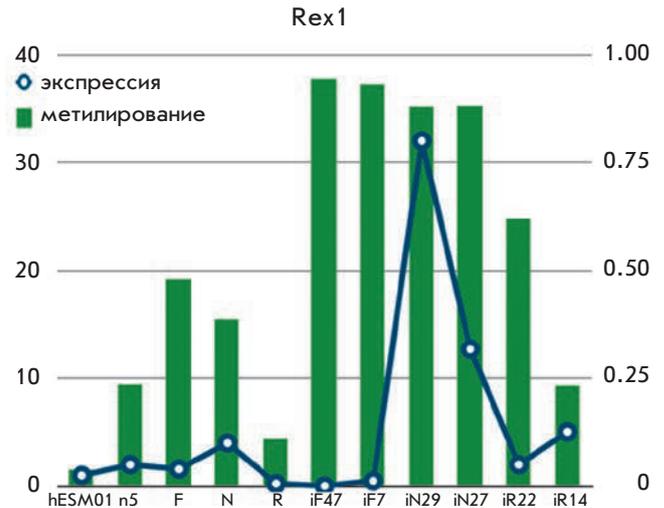


Рис. 2. Постепенное повышение (более чем на 0.2) уровня метилирования *Rex1* не коррелирует с его уровнем экспрессии. Бета-значения, основанные на данных Illumina 450K, использованы для оценки уровня метилирования ($P < 0.01$, $fdr < 0.05$), ПЦР в реальном времени использовали для анализа экспрессии гена (уровень экспрессии *GAPDH* использован в качестве референсного значения, линия hESM01 – для оценки базального уровня)

ГМ), а также колонии смешанного типа КОЕ-микс, что говорит о том, что гемангиобласты принадлежат к клеткам кроветворного ряда. Примеры подобных колоний приведены на рис. 3Б. Способность различных линий иПСК дифференцироваться оценивали по количеству образующихся на 10 день в СГБ колоний гемангиобластов. Проведенный подсчет показал, что способность ПСК к дифференцировке в гемопоэтическом направлении сильно варьирует между линиями, но не зависит от их происхождения. Например, самой низкой эффективностью гемопоэтической дифференцировки обладала линия hESM01 (рис. 3В), а линия n5, полученная на ее основе, характеризовалась значительно большей эффективностью гемопоэтической дифференцировки. Между собой изогенные линии иПСК практически не отличались по способности дифференцироваться, несмотря на то, что были получены из производных разных зародышевых листков. Фибробласты и клетки крови принадлежат к одному зародышевому листку, однако эффективность дифференцировки iF была сравнимой с изогенными иПСК других типов соматических клеток, полученных одновременно с ними. Остальные линии, использованные в качестве линий сравнения, проявляли различную эффективность дифференцировки. Следует отметить, что, в отличие

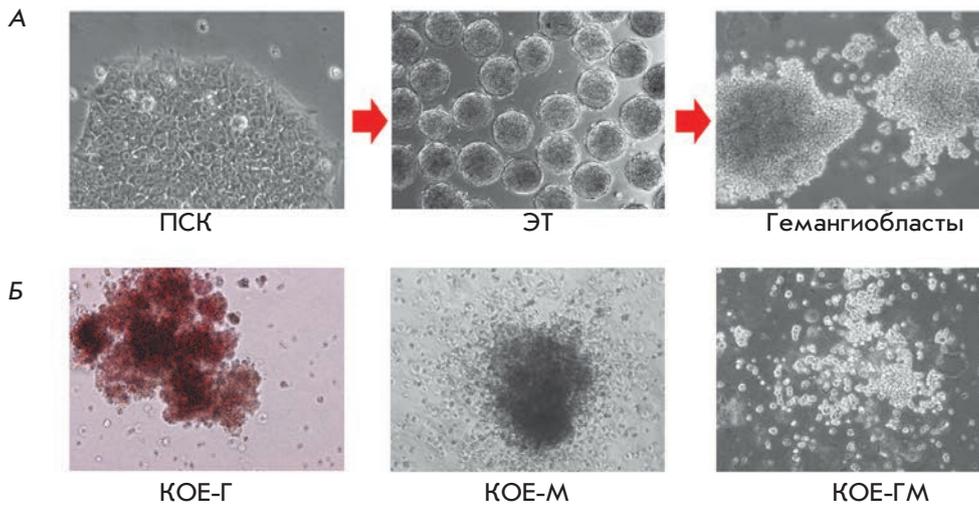
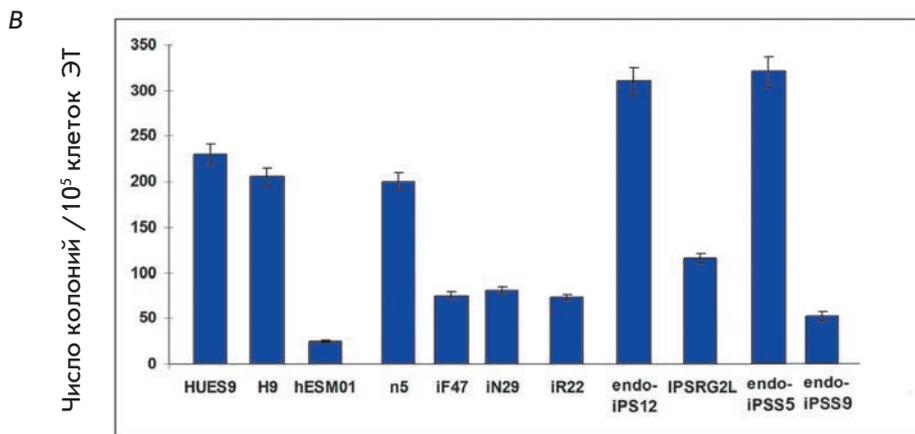


Рис. 3. Гемопоэтическая дифференцировка и ПСК. А – ПСК, эмбрионидные тельца и гемангиобласты, полученные из ПСК. Показана линия n5. Б – примеры гемопоэтических колоний, образованных в метилцеллюлозе. В – сравнение числа гемопоэтических колоний, образованных в метилцеллюлозе на 10-й день из разных линий ПСК



от ранее опубликованных данных, мы не наблюдали сниженной эффективности дифференцировки линий iPSC человека в гемопоэтическом направлении по сравнению с ЭСК [16]. Эти результаты указывают на то, что способность к гемопоэтической дифференцировке является внутренним свойством каждой конкретной линии ПСК и оптимальное направление дифференцировки можно выбрать, используя, например, gene cards [17]. Изогенные линии iPSC имели практически одинаковую способность к дифференцировке в гемопоэтическом направлении, так как, по-видимому, одинаковый способ и одновременность репрограммирования, а также культивирования и прочие внешние условия внесли большой вклад в сходство линий, чем было заложено различий в их тканевом происхождении.

Сравнение способности изогенных ПСК к дифференцировке в нейрональном направлении

Одно из наиболее востребованных направлений использования дифференцированных производных

ПСК – изучение функционирования нервной системы и терапия нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим актуальным становится сравнительный анализ эффективности дифференцировки изогенных ПСК в нейрональном направлении. Для этого исходную линию ЭСК и изогенные ей iPSC iN, iF, iR дифференцировали по нейрональному пути (рис. 4А). Эффективность дифференцировки оценивали по иммуноцитохимической окраске клеток и с помощью проточной цитофлуориметрии на стадии нейрональных предшественников, несущих поверхностный антиген CD56 (NCAM). Разработанный протокол позволял с высокой эффективностью получать нейрональные предшественники, более 90% клеток были положительными по NCAM (рис. 4Б). Мы не обнаружили различий в эффективности дифференцировки до стадии нейрональных предшественников между линиями ПСК различного происхождения. В ходе последующей дифференцировки были получены постмитотические нейроны (рис. 4В), которые проанализировали им-

муногистохимически на наличие βIII-тубулина. Мы также не обнаружили статистически значимых различий между линиями ПСК в эффективности дифференцировки в постмитотические нейроны (данные не приведены). Таким образом, как и в случае с гемопоэтической дифференцировкой, тип соматических клеток, использованных для репрограммирования, не играет роли в эффективной дифференцировке ПСК по нейрональному пути. Из полученных результатов следует несколько важных практических выводов. Во-первых, при создании банка аллогенных иПСК с целью их дальнейшего применения в виде дифференцированных производных не важен тип соматических клеток, использованных для репрограммирования. От одного донора можно брать клетки кожи или крови, а от другого – нервную ткань (если она доступна). При этом полностью репрограммированные иПСК могут быть идентичными по своему потенциалу дифференцировки. Кроме того, нами показано, что ни генетические манипуляции, ни селекция клонов ПСК не оказали системного влияния на их свойства. Несомненно, экспрессия генов скорее связана с изменениями в хроматине, чем с мутациями, влияющими на работу гена. Это дополнительно подтверждают недавно опубликованные данные о высокой генетической стабильности ПСК [18]. Хотя ранее были обнаружены значительные вариации в эпигенетических маркерах ПСК человека [19, 20], данные последних исследований свидетельствуют о том, что современные методы культивирования ПСК человека позволяют сохранять эпигенетический профиль на протяжении длительного срока. Таким образом, линии ПСК и их производные уже сегодня могут представлять собой хорошо стандар-

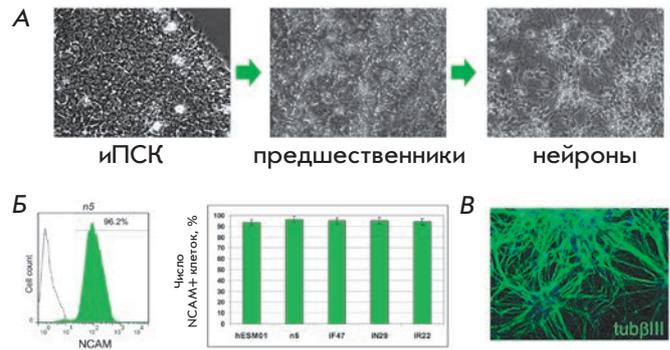


Рис. 4. Эффективность дифференцировки в нейральном направлении не зависит от тканевого происхождения изогенных иПСК. А – схема дифференцировки ПСК в нейроны. иПСК дифференцируются до стадии нейральных предшественников, далее, в присутствии нейротрофических факторов – в нейроны. Б – результаты проточной цитометрии NCAM+ нейральных предшественников, полученных из изогенных ЭСК и иПСК. Слева – результаты проточной цитометрии нейральных предшественников, полученных из линии n5 (зеленый), изотип – контроль не закрашен. Справа – обобщенные результаты проточной цитометрии пяти линий в виде диаграммы. В – иммуногистохимический анализ нейронов, дифференцированных из иПСК. Зеленый – антитела к βIII-тубулину, ядра окрашены DAPI (синий)

тизованные культуры, что открывает возможность их практического использования.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 15-04-05675 и гранта Российского научного фонда № 14-15-00930.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
2. Pang Z.P., Yang N., Vierbuchen T., Ostermeier A., Fuentes D.R., Yang T.Q., Citri A., Sebastiano V., Marro S., Südhof T.C., et al. // Nature. 2011. V. 476. № 7359. P. 220–223.
3. Bhutani K., Nazor K.L., Williams R., Tran H., Dai H., Džakula Ž., Cho E.H., Pang A.W., Rao M., Cao H., et al. // Nat. Commun. 2016. V. 7. № 10536. doi: 10.1038/ncomms10536.
4. Kamao H., Mandai M., Okamoto S., Sakai N., Suga A., Sugita S., Kiryu J., Takahashi M. // Stem Cell Repts. 2014. V. 2. № 2. P. 205–218.
5. Shutova M.V., Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // Cell Cycle. 2016. V. 15. № 7. P. 986–997.
6. Andrews P.W., Cavagnaro J., Deans R., Feigal E., Horowitz E., Keating A., Rao M., Turner M., Wilmut I., Yamanaka S. // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. № 8. P. 724–726.
7. Kyttilä A., Moraghebi R., Valensisi C., Kettunen J., Andrus C., Pasumarthy K.K., Nakanishi M., Nishimura K., Ohtaka M., Weltner J., et al. // Stem Cell Repts. 2016. V. 6. № 2. P. 200–212.

8. Cowan C.A., Klimanskaya I., McMahon J., Atienza J., Witmyer J., Zucker J.P., Wang S., Morton C.C., McMahon A.P., Powers D., et al. // N. Engl. J. Med. 2004. V. 350. № 13. P. 1353–1356.
9. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
10. Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkov I.V., Kiselev S.L. // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 5. P. 937–946.
11. 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., Sulдина L.A., et al. // Mol. Neurodegener. 2016. V. 11. № 27.
12. International Stem Cell Initiative, Amps K., Andrews P.W., Anyfantis G., Armstrong L., Avery S., Baharvand H., Baker J., Baker D., Munoz M.B., et al. // Nat. Biotechnol. 2011. V. 29. № 12. P. 1132–1144.
13. Altarescu G., Renbaum P., Eldar-Geva T., Brooks B., Vars-haver I., Avitzour M., Margalioth E.J., Levy-Lahad E., Elstein D., Epsztejn-Litman S., et al. // Prenat. Diagn. 2011. V. 31. № 9. P. 853–860.

14. Masui S., Ohtsuka S., Yagi R., Takahashi K., Ko M.S., Niwa H. // *BMC Dev. Biol.* 2008. V. 8. № 45.
15. Bhatia S., Pilquill C., Roth-Albin I., Draper J.S. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. e57276.
16. Feng Q., Lu S.J., Klimanskaya I., Gomes I., Kim D., Chung Y., Honig G.R., Kim K.S., Lanza R. // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 704–712.
17. Bock C., Kiskinis E., Verstappen G., Gu, H., Boulting G., Smith Z.D., Ziller M., Croft G.F., Amoroso M.W., Oakley D.H., et al. // *Cell*. 2011. V. 144. P. 439–452.
18. Rouhani F.J., Nik-Zainal S., Wuster A., Li Y., Conte N., Koike-Yusa H., Kumasaka N., Vallier L., Yusa K., Bradley A. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12. № 4. e1005932.
19. Lagarkova M.A., Volchkov P.Y., Lyakisheva A.V., Philonenko E.S., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2006. V. 5. № 4. P. 416–420.
20. Allegrucci C., Wu Y.Z., Thurston A., Denning C.N., Priddle H., Mummery C.L., Ward-van Oostwaard D., Andrews P.W., Stojkovic M., Smith N., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. № 10. P. 1253–1268.

УДК 577.352.53, 57.085.23

Особенности ответов TRPV1-рецепторов при их активации протонами, капсаицином и их смесью при разных мембранных потенциалах

Е. А. Цветков^{1,2}, Н. Н. Потапова¹, К. В. Большаков^{1,2*}¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7-9

*E-mail: k.bolshakov@biotechnologies.ru

Поступила в редакцию 31.05.2016

Принята к печати 21.11.2016

РЕФЕРАТ На культуре клеток СНО, трансфицированных плазмидами, кодирующими TRPV1-рецепторы, изучены ответы, вызываемые капсаицином и протонами в отдельности и при их совместной аппликации при разных значениях мембранного потенциала. Методом фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» показано, что вызванные капсаицином и протонами токи суммируются арифметически при потенциалах от 20 до -40 мВ. При потенциалах фиксации ниже -40 мВ наблюдается неаддитивность эффектов агонистов: суммарный ток, регистрируемый при совместной аппликации агонистов, существенно превышает сумму токов, возникающих при аппликации каждого из агонистов в отдельности. Такая потенциал-зависимая потенциация токов через TRPV1-каналы, по всей видимости, лежит в основе сенсibilизации TRPV1-рецепторов при воспалении и боли, когда растут концентрации провоспалительных медиаторов, являющихся агонистами данных рецепторов. Однако деполяризация мембраны, возникающая при активации TRPV1-рецепторов, ограничивает их последующий ответ, что может служить защитным механизмом, ограничивающим их активацию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА TRPV1, капсаицин, рН, агонисты TRPV1-рецепторов, взаимодействие агонистов TRPV1-рецепторов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СНО – Chinese Hamster Ovary (клетки соединительной ткани яичника китайского хомячка); TRPV1 – Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1 (ванилоидный рецептор, тип 1); GFP – Green Fluorescent Protein (зеленый флуоресцентный белок); МП – мембранный потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Капсаициновые рецепторы (TRPV1) представляют собой сложноорганизованные полимодальные сенсорные системы, которые реагируют на разнообразные стимулы как химической, так и физической природы [1–12]. В большинстве случаев эти воздействия вызывают открытие поры канально-рецепторного комплекса и возникновение трансмембранного ионного тока.

Полимодальность TRPV-рецепторов приводит к тому, что они способны реагировать не только на аппликацию отдельных агонистов, но и на их комбинации. Последнее, как правило, вызывает взаимную потенциацию ответов, что ранее было описано для разных сочетаний агонистических воздействий,

в том числе капсаицина, производных арахидоновой кислоты, рН, а также таких физических стимулов, как изменение температуры, мембранного потенциала или давления [1–13]. В частности, имеются данные о том, что закисление среды повышает чувствительность TRPV1-рецепторов к капсаицину [4, 14, 15], а повышение температуры смещает зависимость их активации потенциалом в сторону деполяризации [16].

Поскольку закисление среды является важным признаком развивающейся воспалительной реакции [17], то потенциацию TRPV1-рецепторов, наблюдаемую при сочетании этих факторов с другими агонистическими воздействиями (например, с капсаицином), можно рассматривать как часть сигнального механизма, запускаемого в клетке в ответ на воспа-

ление. Описание феноменологии такой потенциации и ее механизма представляет практический интерес как для понимания самого воспалительного процесса, так и для изучения путей его коррекции.

Тем не менее анализ опубликованных данных свидетельствует о том, что описание потенциации TRPV1-рецепторов, наблюдаемой при их одновременной активации двумя агонистами, не является полным. В частности, отсутствуют данные о том, как такое взаимодействие может зависеть от мембранного потенциала – важного параметра клетки, влияющего как на сигнальные каскады, так и на сами рецепторы, в том числе и капсаициновые.

Задачей настоящей работы было изучение взаимодействия агонистов капсаицина и протонов при разных значениях потенциала фиксации.

Показано, что нелинейная суммация ответов рецепторов TRPV1 на совместную аппликацию протонов и капсаицина наблюдается лишь при потенциалах, близких к потенциалу покоя. При деполяризации мембраны при развитии воспаления и различных патологий суммация становится линейной. По всей видимости, данное свойство TRPV1-рецепторов является защитным, ограничивающим их гиперактивацию в патологических состояниях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнена на рекомбинантных рецепторах TRPV1, конститутивно или транзистентно экспрессирующихся в клетках СНО. Клетки СНО культивировали в стандартных условиях в среде DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium, «Биолот») с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (fetal bovine serum, Hyclone) и 1% гентамицином в инкубаторе с влажной атмосферой, 5% содержанием CO₂ при температуре 37°C. Трансфекцию проводили с помощью липофектамина-2000 (Invitrogen, США) согласно рекомендациям производителя. Для трансфекции на 35-мм чашку Петри с культурой СНО наносили 0.5 мкг плазмиды, кодирующей ген *TRPV1*, и 0.5 мкг плазмиды, кодирующей ген *eGFP*, которые были предоставлены Dr. Staruschenko и Dr. Medina соответственно. Эксперименты проводили со 2 по 5 день после трансфекции. Эффективность трансфекции определяли по интенсивности флуоресценции GFP, оцениваемой на микроскопе MF-51 (M-shot). Часть работы выполнена на конститутивно трансфицированных клетках СНО, любезно предоставленных лабораторией Е.В. Гришина. Различия между двумя видами трансфекции отсутствовали, поэтому данные были объединены.

Регистрацию токов осуществляли в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации мембран-

ного потенциала. В работе использовали усилитель EPC10 (HEKA Elektronik, США) и пакет программ PatchMaster v8.2 (HEKA Elektronik). Тестовые растворы апплицировали с помощью системы смены растворов NANION (Nanion, Германия) через микро-манифолд с внутренним диаметром 250 мкм, время замены раствора составляло около 100 мс. Для снижения десенситизации рецепторов в результате многократной аппликации растворов частота их предъявления не превышала 1 раза в 45 с. Регистрирующие пипетки изготавливали на микрокузнице P-87 (Sutter Instruments Co., США) из боросиликатных заготовок с филаментом (Sutter Instruments Co.). Наружный и внутренний диаметры заготовок – 1.5 и 0.86 мм соответственно. Соппротивление заполненных пипеток составляло 3–6 МОм. Для электрофизиологических тестов клетки переносили в раствор следующего состава (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgSO₄, 2.5 CaCl₂; 10 глюкоза; 10 HEPES, pH 7.4. Состав пипеточного раствора (мМ): 100 CsF, 40 CsCl, 5 NaCl, 0.5 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2. Для приготовления растворов использовали реактивы фирмы Sigma (США). Капсаицин разводили согласно рекомендациям фирмы (Sigma), в 96% этаноле до концентрации 10 мМ и добавляли необходимое количество для получения указанных конечных концентраций.

Статистическую обработку осуществляли с помощью программы EXCEL. Сравнение средних значений и оценку их принадлежности к одной/разным выборкам проводили с помощью парного t-теста Стьюдента, поскольку выборки средних были получены на одной клетке. Поскольку разные клетки имели разные амплитуды ответов на капсаицин и протоны (ввиду разной плотности рецепторов и различий размеров клеток), то при измерении потенцирующего действия мы нормировали амплитуды тока каждой клетки на амплитуду капсаицинового ответа этой клетки. Величину EC₅₀ и коэффициента Хилла оценивали с помощью пакета ORIGIN при аппроксимации экспериментальных данных теоретической кривой уравнения Хилла: $I = I_{\max} / (1 + (EC_{50}/[C])^s)$, где I_{\max} – амплитуда тока при насыщающих концентрациях лигандов, капсаицина или pH; I – амплитуда тока при текущей концентрации лиганда $[C]$; EC₅₀ – концентрация половинного максимального эффекта; s – коэффициент Хилла. EC₅₀ для концентрации протонов обозначен в тексте в единицах кислотности – pH₅₀.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования совместного действия используемых агонистов TRPV1-рецепторов сначала оценивали диапазон рабочих концентраций при их аппликации по отдельности. С этой целью строили

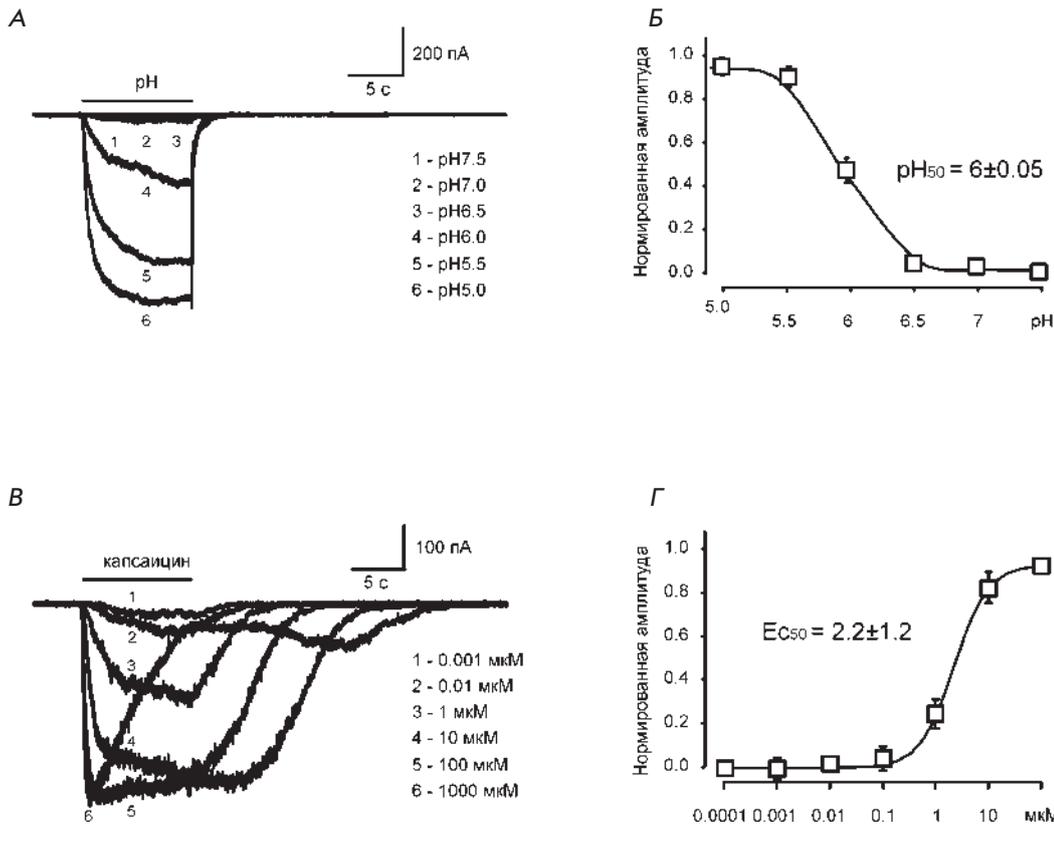


Рис. 1. Чувствительность TRPV1-рецепторов к протонам и капсаицину. **А** – осциллограммы ответов репрезентативной клетки, возникающих при аппликации раствора с различным уровнем рН. **Б** – кривая доза-эффект, нормированная по амплитуде тока, регистрируемого при подаче раствора с рН 5.0. $pH_{50} = 6.0 \pm 0.05$; $n = 10$. **В** – осциллограммы ответов репрезентативной клетки, возникающих при унифицированной аппликации капсаицина разных концентраций. **Г** – кривая доза-эффект, нормированная по амплитуде тока, регистрируемого при подаче насыщающей концентрации капсаицина. $EC_{50} = 2.2 \pm 1.2$ мкМ; $n = 10$

графики дозовой зависимости действия капсаицина и протонов при мембранном потенциале -80 мВ. Полученные результаты представлены на *рис. 1*. Видно, что ответы на закисление среды возникают при рН 6.5, далее их амплитуда растет с повышением кислотности и достигает насыщения при рН 5.5 и выше. Ответы на капсаицин появлялись при концентрации 0.01 мкМ, достигали насыщения при значениях, близких к 100 мкМ. Однако с ростом концентрации капсаицина амплитуда ответов снижалась. Вероятно, падение амплитуды ответов при высоких концентрациях капсаицина связано с его неспецифическим действием на мембрану клеток. Поэтому концентрации капсаицина выше 100 мкМ в дальнейшем не использовали. EC_{50} для капсаицина составила 2.2 ± 1.2 мкМ ($n = 10$), а pH_{50} для рецепторов TRPV1 составил 6.0 ± 0.05 ($n = 10$), что хорошо согласуется с данными [4]. Следует отметить, что ни капсаицин, ни рН в исследованных концентрациях не вызывали тока у нетрансфицированных клеток СНО. Ответы на капсаицин и рН у трансфицированных клеток блокировались 10 мкМ рутениевого красного. Это свидетельствует о том, что регистрируемые в этих условиях токи опосредованы рецепторами TRPV1.

Для изучения взаимодействия эффектов протонов и капсаицина при разных потенциалах использовали следующий протокол. Сначала регистрировали ответ

на аппликацию раствора с определенным значением рН, далее подавали раствор с капсаицином, после чего апплицировали раствор с заданным рН и капсаицином совместно и в тех же концентрациях. В отдельной серии экспериментов мы показали, что изменение порядка (последовательности) аппликации агонистов не влияло на амплитуды ответов. В ходе анализа данных амплитуду ответа на совместную аппликацию капсаицина и протонов ($I_{(pH+Kан)}$) сопоставляли с суммой амплитуд ответов ($I_{pH} + I_{Kан}$), полученных при аппликациях капсаицина ($I_{Kан}$) и протонов (I_{pH}) по отдельности. Полученные данные иллюстрирует *рис. 2*, где в качестве тестовых концентраций капсаицина и протонов взяты 0.1 мкМ и рН 5.0 соответственно. Из *рис. 2* видно, что амплитуда ответов на совместную аппликацию используемых агонистов ($I_{(pH+Kан)}$) может существенно превышать сумму амплитуд ответов ($I_{pH} + I_{Kан}$), полученных при аппликациях капсаицина ($I_{Kан}$) и рН (I_{pH}) по отдельности. Данная потенциация зависит от уровня мембранного потенциала и максимально выражена в условиях гиперполяризации клетки. При потенциале -40 мВ амплитуда тока, вызываемого 0.1 мкМ капсаицином при рН 5.0, достоверно превышала сумму ответов, вызываемых при аппликации 0.1 мкМ капсаицина и при снижении рН до 5.0, при $p < 0.01$; при потенциале -120 мВ это различие было достоверно при $p <$

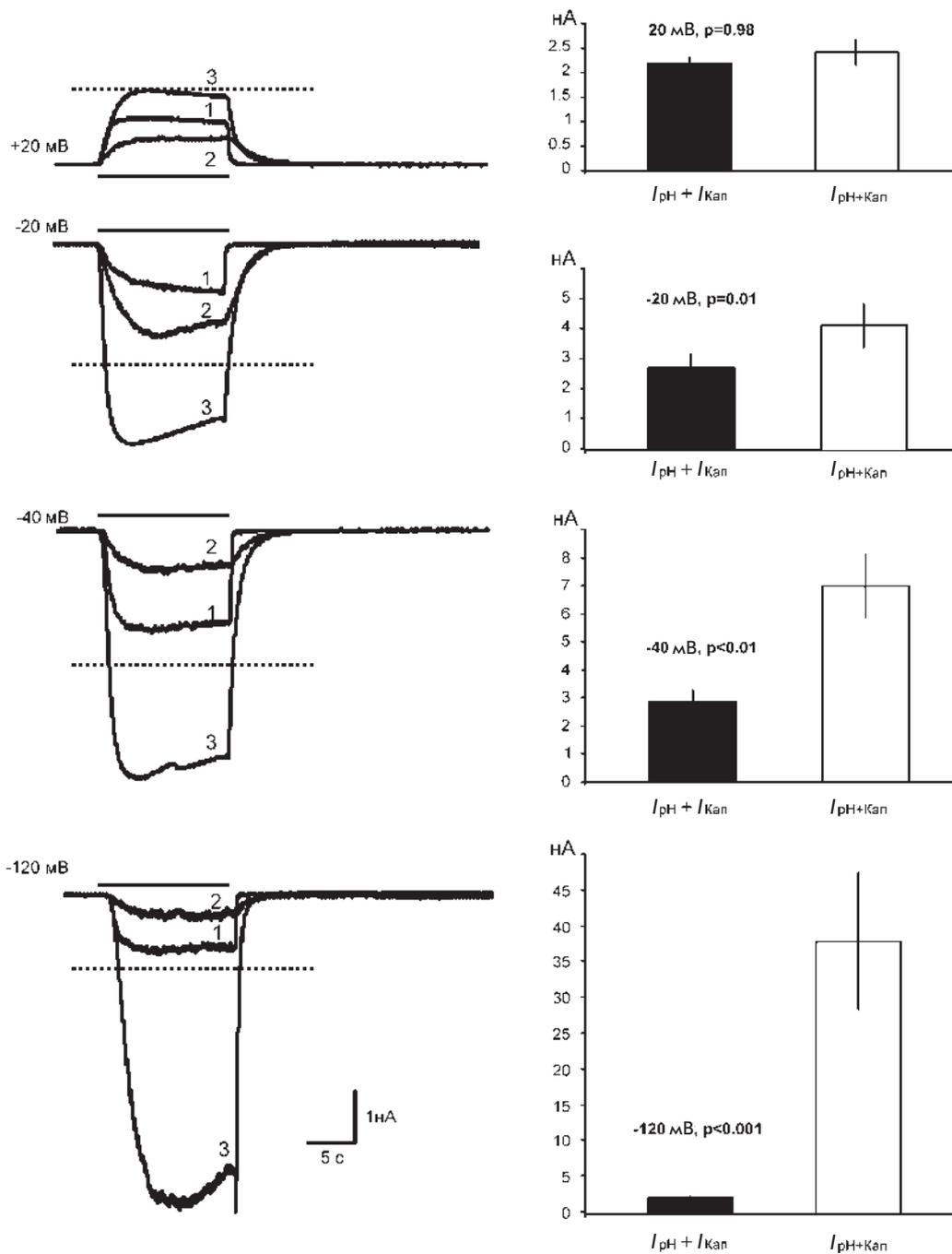


Рис. 2. Взаимодействие эффектов протонов и капсаицина при разных значениях фиксации мембранного потенциала. Левая колонка – токи, возникающие при аппликации раствора с pH 5.0 (1); при аппликации растворов с 0.1 мкМ капсаицина (2) при совместной аппликации раствора с pH 5.0 и раствора с 0.1 мкМ капсаицина (3). Прерывистая линия – теоретическая величина алгебраической суммы амплитуд токов, возникающих при аппликации раствора с pH 5.0 и раствора с 0.1 мкМ капсаицина. Правая колонка – сопоставление амплитуд теоретической (черный столбик) и экспериментальной (белый столбец) сумм токов, возникающих при совместной аппликации капсаицина и протонов. Уровень достоверности отличий средних теоретической и экспериментальной сумм токов приведен над столбцами

0.001. Смещение МП в сторону деполяризации снижает уровень потенциации и приближает амплитуду ответа на совместную аппликацию капсаицина и протонов к сумме ответов при их независимой аппликации. При 20 и -20 мВ различия амплитуд совместного ответа и суммы амплитуд отдельных ответов на агонисты недостоверны.

Для более детальной характеристики феномена потенциации TRPV1-рецепторов аналогичные эксперименты проводили при разных концентрациях агонистов. Концентрацию капсаицина варьировали

в диапазоне от 0.1 до 10 мкМ, а уровни pH – от 5.5 до 7.0. В качестве параметра оценки выявленной потенциации использовали отношение амплитуды тока, полученного при совместной аппликации агонистов ($I_{(pH+Kап)}$), к сумме амплитуд токов, полученных при аппликации этих агонистов по отдельности ($I_{pH} + I_{Kап}$). В графическом виде значения этой величины ($I_{(pH+Kап)}/(I_{pH} + I_{Kап})$) представлены на рис. 3. В столбцах этого рисунка приведены данные, полученные при одних и тех же значениях pH, где варьировали концентрацию капсаицина, а в строках –

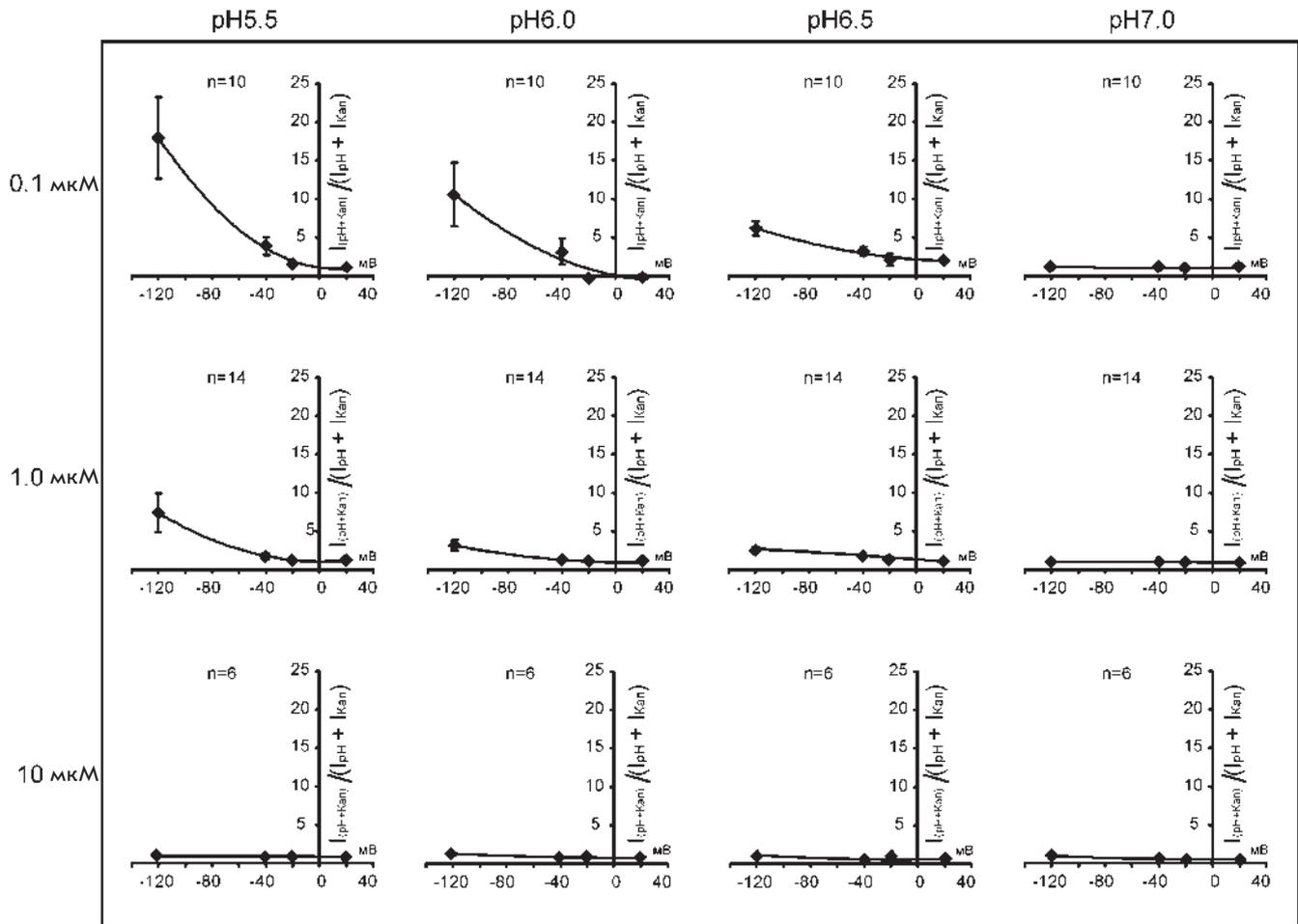


Рис. 3. Зависимость потенции капсаициновых рецепторов от мембранного потенциала при разных значениях pH и концентрации капсаицина. Объяснение схемы аппликации растворов, измерения амплитуд и анализа данных приведено в тексте

при одних и тех же концентрациях капсаицина, где варьировали pH. Следует отметить, что при концентрации капсаицина больше 10 мкМ эффект потенциации не наблюдался, поэтому тесты с более высокой концентрацией агониста не проводили.

Из рис. 3 видно, что эффект потенциации зависит от всех параметров, контролируемых в этих тестах. Наибольший эффект наблюдали в условиях максимальной гиперполяризации клеток при максимальной закисленности среды и наименьших концентрациях капсаицина (см. верхний левый график на рис. 3). Видно, что степень потенциации TRPV1-рецепторов прямо зависит от концентрации протонов и растет по мере закисления при фиксации концентрации капсаицина. При этом потенцирующее действие протонов лучше проявляется при низких концентрациях капсаицина и практически исчезает при повышении концентрации до 10 мкМ. Таким образом, наблюдается обратная зависимость потенци-

ации токов, вызванных протонами, от концентрации капсаицина, т.е. при возрастании концентрации капсаицина происходит уменьшение степени потенциации.

Чувствительность потенциации рецепторов капсаицина к мембранному потенциалу клетки позволяет предположить, что аппликация капсаицина в условиях снижения pH среды будет приводить к изменению вольт-амперных характеристик ответов капсаицинового рецептора на действие агонистов. Для проверки этого предположения мы сопоставили вольт-амперные характеристики каналов, полученные при активации рецепторов капсаицином, протонами и совместной аппликации этих агентов при концентрациях, которые в предыдущих опытах соответствовали максимальной выраженности эффекта потенциации. Результат этих экспериментов показан на рис. 4. Ответы на протоны, капсаицин характеризуются входящим выпрямлением, что хорошо согла-

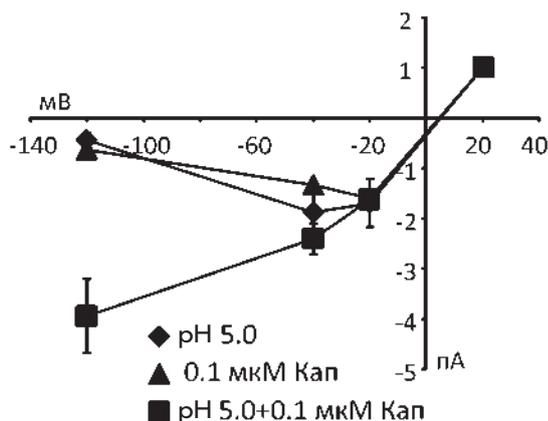


Рис. 4. Вольт-амперные характеристики ответов TRPV1-рецепторов на агонисты. Треугольники – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых аппликацией капсаицина (0.1 мкМ); ромбы – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых аппликацией раствора с pH 5.0; прямоугольники – вольт-амперная характеристика ответов, вызываемых совместной аппликацией закисленного раствора (pH 5.0) и капсаицина (0.1 мкМ)

суется с данными [2, 14]. При совместной аппликации протонов и капсаицина степень выпрямления уменьшается. Ослабление выпрямляющих свойств рецепторов TRPV1 можно рассматривать как элемент механизма, который регулирует сигнальные функции рецепторов при развитии воспалительных реакций, рецепции боли, терморегуляции и прочих функций, в которые вовлечены TRPV1-рецепторы [1–12].

Полученных нами данных недостаточно для формирования окончательного вывода о механизмах потенциации капсаициновых рецепторов при совместной аппликации капсаицина и протонов. Однако, учитывая факт изменения выпрямляющих свойств

канала при совместной подаче агонистов, в качестве механизма этого явления можно рассматривать как потенциал-зависимое увеличение чувствительности этих рецепторов к одному из агонистов в присутствии другого, так и возможность модификации параметров инактивации рецепторов в данных экспериментальных условиях. Для проверки этих предположений и выявления механизмов взаимодействия ответов, вызываемых при активации рецепторов протонами и капсаицином при разных потенциалах, а также физиологического значения такого взаимодействия необходимы дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженная зависимость потенцирующего действия агонистов TRPV1 при их совместной аппликации от мембранного потенциала показывает еще одну особенность рецепторов TRPV1, позволяющую им тонко подстраивать свой ответ к совокупности внешних и внутренних факторов. Так, потенцияция ответов TRPV1 при гиперполяризации позволяет этим рецепторам включаться на ранней стадии воспаления, когда концентрация воспалительных агентов еще не слишком высока. Поскольку срабатывание данных рецепторов может быть связано с запуском апоптоза, то исчезновение потенциации ответов при совместной аппликации агонистов на фоне деполяризации будет служить защитным механизмом. Однако понимание функциональной значимости амплитуды ответов TRPV1, а также характеристика молекулярных механизмов, опосредующих взаимодействие разных агонистов данных рецепторов, требует дальнейших исследований.

Работа поддержана РФФИ (грант № 15-04-03957) и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhu M.X. TRP channels. Boca Raton: Taylor & Francis, 2011.
- Caterina M.J., Schumacher M.A., Tominaga M., Rosen T.A., Levine J.D., Julius D. // Nature. 1997. V. 389. № 6653. P. 816–824.
- Blumberg P.M., Pearce L.V., Lee J. // Curr. Top Med. Chem. 2011. V. 11. № 17. P. 2151–2158.
- Vanilloid Receptor TRPV1 in Drug Discovery: Targeting Pain and Other Pathological Disorders / Eds Gomtsyan A., Faltynek C.R. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
- Venkatachalam K., Montell C. // Annu. Rev. Biochem. 2007. V. 76. P. 387–417.
- Nilius B., Voets T. // Pflügers Arch. 2005. V. 451. № 1. P. 1–10.
- Pedersen S.F., Owsianik G., Nilius B. // Cell Calcium. 2005. V. 38. № 3–4. P. 233–252.
- Voets T., Talavera K., Owsianik G., Nilius B. // Nat. Chem. Biol. 2005. V. 1. № 2. P. 85–92.
- Ramsey I.S., Delling M., Clapham D.E. // Annu. Rev. Physiol. 2006. V. 68. P. 619–647.
- Nilius B. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1772. № 8. P. 805–812.
- Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. // Physiol. Rev. 2007. V. 87. № 1. P. 165–217.
- Nilius B., Mahieu F. // Mol. Cell. 2006. V. 22. № 3. P. 297–307.
- Dhaka A., Uzzell V., Dubin A.E., Mathur J., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 1. P. 153–158.
- Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // Neuron. 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
- Ryu S., Liu B., Qin F. // J. Gen. Physiol. 2003. V. 122. № 1. P. 45–61.
- Voets T., Droogmans G., Wissenbach U., Janssens A., Flokzerki V., Nilius B. // Nature. 2004. V. 430. № 7001. P. 748–754.
- Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. // Cell. 2010. V. 140. № 6. P. 883–899.

УДК 577.151.34

Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ

О. В. Чертков¹, Г. А. Армеев², И. В. Упоров³, С. А. Легоцкий³, Н. Н. Сыкилинда¹,
А. К. Шайтан², Н. Л. Клячко³, К. А. Мирошников^{1*}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 11

*E-mail: kmi@ibch.ru

Поступила в редакцию 01.04.2016

Принята к печати 10.06.2016

РЕФЕРАТ Литические трансгликозилазы – распространенный тип пептидогликанлизирующих ферментов, расщепляющих гетерополимеры клеточных стенок бактерий в процессе клеточного метаболизма или инфекции бактериофагом. Молекулярный механизм действия трансгликозилаз предполагает участие в активном центре фермента лишь одного аминокислотного остатка Glu или Asp. Эндолизин gp144 бактериофага phiKZ *Pseudomonas aeruginosa* принадлежит к группе граммотрицательных трансгликозилаз с модульным строением и С-концевым расположением каталитического домена. Предсказанную роль каталитического аминокислотного остатка в его структуре выполняет Glu115. Однако замена этого остатка не полностью удаляет активность мутантного белка. Направленный мутагенез выявил участие в каталитическом механизме Tyr197, а также второй активный центр с аминокислотными остатками Glu178 и Tyr147. Наличие дублирующего активного центра подтверждено методами компьютерного моделирования, молекулярной динамики конформационных изменений и изменения заряда поверхности и структуры при внесении точечных мутаций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активный центр фермента, бактериофаг phiKZ, молекулярная динамика, направленный мутагенез, трансгликозилаза, эндолизин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ NAM – N-ацетилмурамовая кислота; NAG – N-ацетилглюкозамин.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериофаг phiKZ (vB_PaeM_KZ, GenBank NC_004629) принадлежит к семейству Myoviridae и служит «фагом-основателем» таксономического рода гигантских фагов, инфицирующих граммотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* и некоторые близкородственные бактерии [1]. phiKZ-подобные фаги служат объектом для различных геномных [2], эволюционных [3] и структурных [4–6] исследований.

Лизис бактерии-хозяина на поздних стадиях инфекции фагом phiKZ осуществляется пептидогликанлизирующим ферментом (эндолизином) gp144. Этот белок имеет модульное строение и состоит из двух доменов – N-концевого, отвечающего за первичное связывание с субстратом, и каталитического С-концевого [7]. Пептидогликансвязывающая функ-

ция N-концевой части полипептида (остатки 9–69) экспериментально доказана с помощью белковой химеры с присоединенным зеленым флуоресцентным белком [8, 9]. С-Концевой домен gp144 (остатки 70–260) имеет выраженную гомологию с литическими трансгликозилазами класса 1. Каталитический механизм был подтвержден масс-спектрометрическим анализом продуктов расщепления пептидогликана [10]. Литические трансгликозилазы – ферменты, расщепляющие β-1,4-гликозидную связь между N-ацетилмурамовой кислотой (NAM) и N-ацетилглюкозамином (NAG) с образованием циклического ангидрида N-ацетилмурамовой кислоты (связь между O6 и C1) [11]. Пространственная структура phiKZ gp144 апофермента (ЗВКV) и фермента со связанной молекулой хитотетразы (ЗВКН) получена с помощью рентгеновской кристаллографии

с разрешением 2.6 Å [12]. С-Концевой домен белка в основном состоит из α-спиралей и структурно гомологичен каталитическому домену литических трансгликозилаз класса 1. Согласно общепринятой модели [11] за каталитическое действие в активном центре отвечает единственный аминокислотный остаток – у phiKZ gp144 это Glu115 [12]. Однако мутагенез этого остатка не приводил к полной инактивации фермента, оставляя около 30% активности у мутантного белка [8]. Таким образом, данная работа проведена с целью выявления роли других аминокислотных остатков в катализе phiKZ gp144 и уточнения структурной организации активного центра.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Направленный мутагенез

Основные манипуляции молекулярного клонирования в *Escherichia coli* выполняли в соответствии с [13]. В качестве матрицы для точечного мутагенеза использовали плазмиду pKZ144, содержащую ген 144 бактериофага phiKZ в векторе pQE30 (Qiagen) [7]. Для направленного мутагенеза использовали набор QuickChange Kit (Stratagene). В полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры:

E115A Fw 5'-CATTTGCTTCTATTGCAATCAGCATT-CGATTAC-3',

E115A Re 5'-GTAATCGAATGCTAGTGC AATAGAA-GCAAATG-3',

H200L Fw 5'-GATCTTTAGCTCTCTTCTTTGGCC-TGG-3',

H200L Re 5'-CCAGGCCCAAAGAAGAGAGCTAAA-TAAAGATC-3',

Y197F Fw 5'-ACTGATACTGATCTTTTCTTTAGCTC-ACTTCTTT-3',

Y197F Re 5'-AAAGAAGTGAGCTAAAAAAGATC-AGTATCAGT-3'.

E178A Fw 5'-GCGGAAC TGATTAAGCAAACATGA-ACATTCTG-3',

E178A Re 5'-CAGAATGTTTCATGTTTGCTTAATCA-GTTCCGC-3'.

После проведения ПЦР плазмиду с геном фермента дикого типа разрушали при помощи DpnI-эндонуклеазы, специфичной к метилированной ДНК. Полученный материал использовали для электропорации клеток *E. coli* NovaBlue (Novagen). Клетки высевали на чашки Петри со средой Lb agar, содержащую антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл и культивировали при 37°C в течение 16 ч. Плазмиды pKZ144-E115A, pKZ144-H200L, pKZ144-Y197F, pKZ144-E115A/H200L, pKZ144-E115A/Y197F, pKZ144-H200L/Y197F, pKZ144-E178A, pKZ144-E115A/E178A выделяли из индивидуальных клонов с помощью набора QiaQuick Spin

(Qiagen), присутствие заданной мутации проверяли секвенированием.

Выделение и очистка белков

Клетки *E. coli* штамма AD494(DE3) (Novagen), трансформированные соответствующими плазмидами, растили в среде 2xYT при 37°C до $A_{600} \sim 0.6$ отн. ед., после чего индуцировали экспрессию добавлением изопропилтио-β-D-галактозида до конечной концентрации 0.5 mM. Клетки инкубировали в течение 4 ч при 37°C и умеренной аэрации. Далее клетки *E. coli* из 0.15 л среды осаждали центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин, осадок ресуспендировали в 10 мл буфера А (20 mM Трис-НСl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM о-фенилметансульфонилфторида (PMSF)). Клетки разрушали ультразвуком (Techpan MD20), нерастворимые фрагменты отделяли центрифугированием при 15000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой (Qiagen). Элюцию аффинно связанного белка проводили 200 mM имидазолом в буфере А. Очищенный препарат белка диализовали против 20 mM буфера Трис-НСl pH 8.0, 50 mM NaCl и хранили при -70°C. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 280 нм на спектрофотометре GENESYS 10 (Thermoelektron). Коэффициент экстинкции рассчитывали с помощью программы VectorNTI, основываясь на концентрации ароматических остатков в молекуле белка. Изменения вторичной структуры мутантных белков оценивали спектроскопией кругового дихроизма на спектрополяриметре JASCO J-500 в кювете 0.05 см (Hellma) в Na-фосфатном буфере pH 6.2 при комнатной температуре.

Определение активности

Ферментативную активность белковых препаратов определяли с использованием в качестве субстрата суспензии клеточных стенок *P. aeruginosa* PAO1, полученной обработкой клеток хлороформом для удаления внешней клеточной мембраны. Для приготовления суспензии клеточных стенок клетки PAO1 растили при 37°C в среде 2xTY до $A_{500} \sim 0.6$ отн. ед. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере 50 mM Трис-НСl pH 7.8, насыщенном хлороформом, и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Остатки клеточных стенок осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в 10 mM Na-фосфатном буфере pH 6.2, 120 mM NaCl, довели до поглощения при 500 нм до 0.6–1 отн. ед. Образец фер-

мента объемом 30 мкл добавляли к 270 мкл суспензии клеточных стенок на плашке и измеряли уменьшение оптической плотности на спектрофотометрическом ридере Viktor (Perkin Elmer) при комнатной температуре в течение 1.5 ч с интервалом 1 мин. За 1 ед. пептидогликанлитической активности принимали активность, вызывающую линейное снижение поглощения на 0.001 отн. ед. в 1 мин. Результаты измерений обрабатывали при помощи программы Activity Calculator [14]. Эксперименты проводили в трехкратной повторности, результаты усредняли и сравнивали с соответствующими отрицательными контролями и положительным контролем, содержащим лизоцим куриного яйца.

Моделирование и молекулярная динамика

Молекулу субстрата строили и релаксировали в программе Avogadro [15]. Докинг проводили к отрелаксированной, а затем замороженной нативной структуре с помощью веб-сервиса SwissDock [16] и выбирали вариант, наиболее похожий по ориентации и положению на структуру 3VKV [12]. Распределение зарядов в нативной белковой молекуле рассчитывали с помощью программ PDB2PQR [17, 18] и APBS [19].

Конформационную подвижность белка изучали методом молекулярной динамики. Исходя из кристаллической структуры 3VKH [12], создали гидратированные модели на основе силового поля AMBER [20, 21]. Моделирование проводили в пакете GROMACS [22–25] со следующими параметрами: время симуляции 100 нс, шаг 2 фс, радиус обрезания ван-дер-ваальсовых взаимодействий 1 нм, метод учета электростатических взаимодействий PME, температура 300 К с отдельным термостатированием белка и раствора, использовали периодические граничные условия с кубической ячейкой.

Анализ данных проводили путем сравнения среднеквадратичного отклонения структур точечных мутантов от структуры фермента дикого типа. За референсную структуру принимали конформацию трансгликозилазы, полученную путем молекулярной динамики при 300 К. Сравнение проводили по атомам белкового остова только тех аминокислот, которые находятся вблизи субстрата (аминокислоты: 110–116, 125–150, 168–185, 195–210, 220–230) и могут влиять на его связывание с ферментом. В связи с тем, что при комнатной температуре подвижность молекулы слишком велика, чтобы на доступных временах вычисления сделать статистически достоверные выводы о конформационных отличиях, применяли метод отжига структур к низким температурам. Систему плавно замораживали в течение 1 нс от 300 К до температуры жидкого азота (77 К).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ рентгеноструктурных данных phiKZ gp144 3VKV [12] показал, что пространственное расположение Glu115 в активном центре относительно молекулы субстрата не оптимально, и вероятно наличие «неканонического» аминокислотного остатка, также участвующего в катализе. В качестве таких остатков мы предположили His200, обладающий пониженной электронной плотностью, и высококонсервативный остаток Tyr197, координирующий участок субстрата в положении –1.

Пространственная структура 3VKV phiKZ gp144 показывает высокую степень сходства каталитического домена со структурой аналогичного домена трансгликозилазы Slt70 из *E. coli* [26]. Положение и ориентация каталитического остатка Glu115 в gp144 сходны с положением Glu478 в Slt70. Ранее был предложен механизм катализа трансгликозилазы Slt70, отличающийся от классического механизма наличием дополнительного остатка Tyr597, который находится в каталитическом центре фермента и участвует в катализе. Функция Tyr597 заключается в активации каталитического остатка Glu478 через образование водородной связи с ним, что увеличивает отрицательный заряд на Glu478 и облегчает протонирование O-гликозидной связи [27]. В полипептиде phiKZ gp144 имеется остаток Tyr197, расположение и ориентация которого сходны с Tyr597 в Slt70. Высокая степень пространственной гомологии позволяет предположить, что катализ phiKZ gp144 происходит аналогично механизму Slt70.

Основная гипотеза, объясняющая частичное сохранение активности фермента при замене основного каталитического остатка, предполагает существование двух каталитических участков – главного Glu115/Tyr197 и дублирующего Glu178/Tyr147. Расположение аминокислот предполагаемого второго активного центра относительно цепи пептидогликанового субстрата сходно с расположением аминокислот основного активного центра. Совмещение положения боковых цепей остатков «основного» и «дублирующего» активного центров с помощью вычисления минимального среднеквадратичного отклонения показывает практически одинаковую позицию (рис. 1).

Для экспериментального подтверждения роли остатков, принимающих участие в работе активного центра phiKZ gp144, получен ряд одиночных и двойных мутантов по этим аминокислотам. Введение точечных мутаций не влияло существенно на растворимость или вторичную структуру (по результатам связывания с аффинной колонкой и спектроскопии кругового дихроизма). Мутантные белки очищали с помощью Ni-хелатной хроматографии [7] без су-

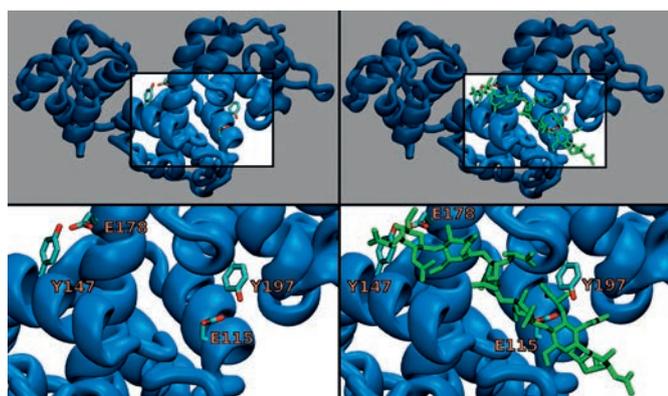


Рис. 1. Боковые цепи аминокислотных остатков, формирующие активные центры ϕ iKZ gp144 и возможное расположение молекулы NAM-NAG. На верхних рисунках изображен общий вид фермента без субстрата (сверху слева) и с субстратом (сверху справа). На нижних рисунках крупным планом изображены сайты связывания фермента без субстрата (снизу слева) и с субстратом (снизу справа)

ществленных изменений. Полученные препараты содержали 3–6 мг мутантного белка с чистотой > 90%.

Одиночные мутанты E115A, E178A и Y197F по каждому из остатков в отдельности имели остаточную активность 54, 63 и 51% соответственно по сравнению с исходным белком ϕ iKZ gp144 (рис. 2, табл. 1). Все мутанты проявляли максимальную активность при том же составе буфера, что и фермент дикого типа (pH 6.2 и $I = 120$ mM NaCl), далее все реакции проводили в этих условиях. Мутация His приводила к снижению активности на 20–30%, что подтверждает предположение об участии остатков гистидина в координации субстрата.

В контексте высказанной гипотезы не совсем логична потеря активности мутантом E115A/Y197F, в котором мутированы оба остатка основного активного центра, а дополнительный не изменен. Для объяснения этого явления необходимо было рассмотреть как детали пространственного взаимодействия белка с субстратом, так и возможные изменения в конформации белка, вызванные мутациями. Поскольку хитотетраоза, которую использовали как эмульгатор суб-

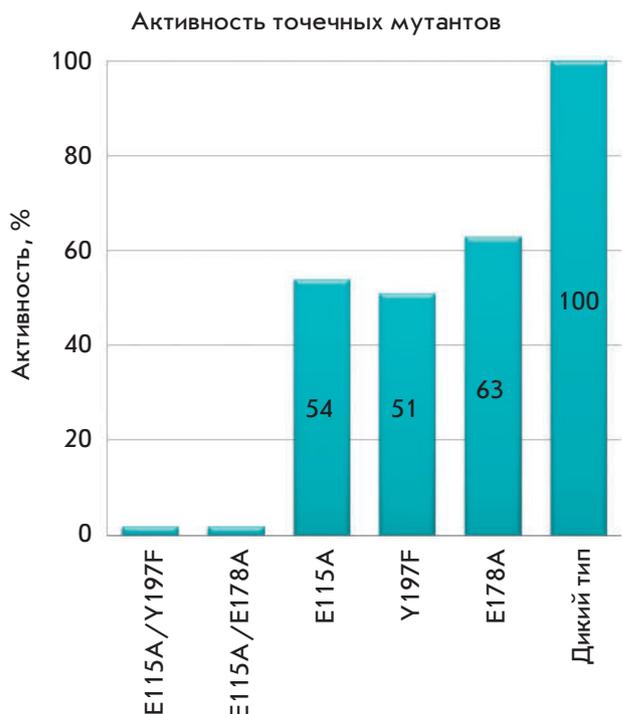


Рис. 2. Диаграмма активностей одиночных и двойных точечных мутантов ϕ iKZ gp144 в сравнении с ферментом дикого типа, принятой за 100%

страта в экспериментах по кристаллизации ϕ iKZ gp144 [12], достаточно сильно отличается по своей конформации от естественного субстрата (NAM-NAG), проводили молекулярный докинг по вычислению возможных конфигураций связывания субстрата с молекулой белка. Наиболее вероятное расположение субстрата в бороздке активного центра показано на рис. 1.

Для дополнительной оценки изменения конформаций белка при различных заменах проведен молекулярно-динамический анализ конфигурации бороздки путем изучения ее внешнего вида (рис. 3А) и расстояний между $\text{C}\alpha$ -атомами аминокислотных остатков 126 и 229 (рис. 3Б, табл. 2). Скорее всего, при некоторых мутациях нарушается сеть взаимодействий между боковыми цепями остатков, формирующих активный центр, вследствие чего область бороздки

Таблица 1. Таблица активностей одиночных и двойных точечных мутантов ϕ iKZ gp144, а также фермента дикого типа

Фермент	Дикий тип	E178A	Y197F	E115A	E115A/ Y197F	E115A /E178A
Активность, У/мг	210000	132000	107000	113000	0	0

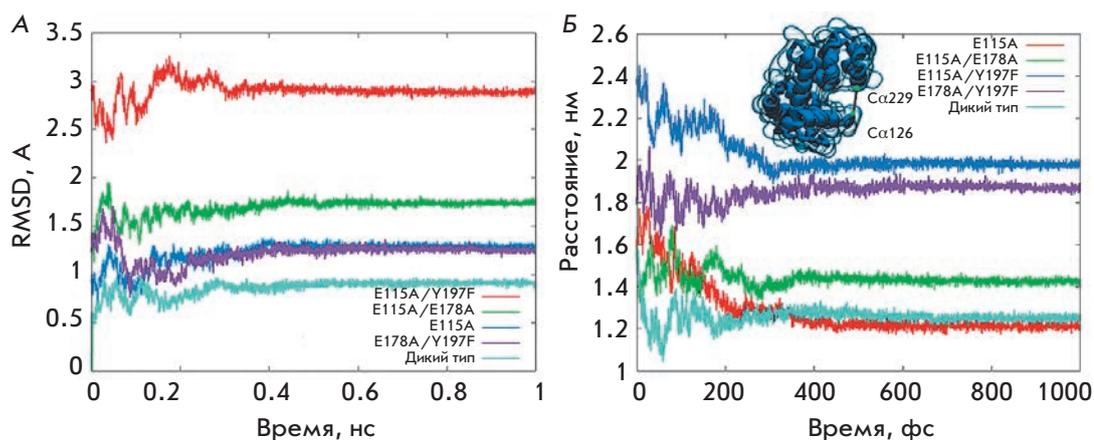


Рис. 3. А – средне-квадратичное отклонение белкового остова трансгликозилаз во время заморозки до 77 К. Отклонение вычисляли только для участка, контактирующего с субстратом. Б – изменение расстояния между α -атомами аминокислот 126 и 229 во время заморозки до 77 К

Таблица 2. Сводная таблица среднеквадратичных отклонений белковой структуры в процессе отжига к температуре жидкого азота

Фермент	Среднее, Å	Станд. ошибка, Å	Мин, Å	Макс, Å
Нативный	0.858	0.081	0.005	0.974
E115A	1.225	0.118	0.692	1.370
E115A /Y197F	2.895	0.104	2.366	3.249
E178A /Y197F	1.219	0.110	0.762	1.693
E115A /E178A	1.693	0.084	1.130	1.944

активного центра ϕ iKZ gp144 довольно сильно изменяет свою конформацию. Например, при мутациях аминокислотных остатков основного активного центра изменяется форма бороздки, в которую укладывается субстрат, что может вызывать снижение аффинности белка к субстрату и, как следствие, реакционной способности. Видно, что двойная мутация по основному активному центру приводит к наиболее сильному «открытию» бороздки (рис. 4).

Вычислено распределение зарядов на доступной растворителю поверхности каждого мутанта. Вычисление поверхностного заряда глобулы белка ϕ iKZ gp144 показывает, что бороздка связывания субстрата имеет преимущественно положительный заряд. Замены аминокислотных остатков в активных центрах также в ряде случаев приводят к сильному изменению распределения зарядов (рис. 5). Мутант E115A/Y197F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался не измененным. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации поверхности, связывающей субстрат (рис. 4), а также к смене заряда в этой области бороздки (рис. 5). Такое изменение свойств поверх-

ности, вероятно, не позволяет этому мутанту ϕ iKZ gp144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Литические трансгликозилазы – класс пептидогликанлизирующих ферментов, которые играют активную роль в жизненных циклах бактерий [28] и бактериофагов [29]. Трансгликозилазы действуют на тот же участок пептидогликана, что и лизоцимы ([КФ 3.2.1.17]; пептидогликан-N-ацетилмурамоилгидролазы, мурамидазы) – β -1,4-гликозидную связь между остатками NAM и NAG. Основным отличием трансгликозилаз от мурамидаз является отсутствие нуклеофильного каталитического остатка. Также различия проявляются в связывании олигосахарида в сайтах связывания +1 и +2. Классический механизм действия трансгликозилаз предполагает наличие одного кислотного каталитического остатка, расположенного в активном центре фермента между субсайтами +1 и –1. На первой стадии реакции каталитический аминокислотный остаток протонирует гликозидный кислород с образованием оксокарбониевого катиона и дальнейшим

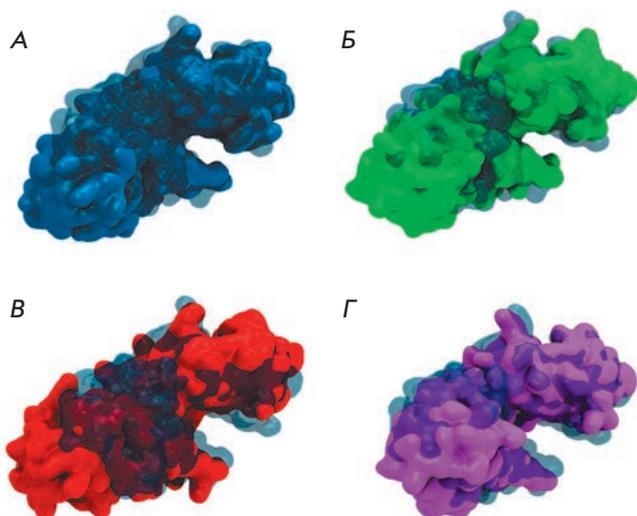


Рис. 4. Моделирование поверхности мутантных форм ϕ iKZ gp144 в сравнении с нативной формой А – E115A, Б – E115A/E178A, В – E115A/Y197F, Г – E178A/Y197F. Полупрозрачная поверхность принадлежит структуре фермента дикого типа. На изображении удален домен, не принимающий участия в связывании с субстратом. Бороздка показана в профиль

разрывом O-гликозидной связи между NAM и NAG. На второй стадии реакции происходит внутримолекулярная нуклеофильная атака C6-гидроксильной группой углерода оксокарбониевого катиона с образованием 1,6-оксазанонового цикла NAM. При этом каталитический остаток Glu активирует C6-гидроксил, оттягивая на себя протон гидроксила [11].

Мы предполагаем, что в полипептидной цепи трансгликозилазы ϕ iKZ gp144 находятся два активных центра: основной, E115/Y197, и дублирующий, E178/Y147. Участок молекулы пептидогликана может связаться с бороздкой на глобуле фермента двумя способами (рис. 6). Предположительно, направление укладки субстрата имеет значение для протекания реакции и определяет, какой из активных центров проведет реакцию деградации субстрата. Таким образом, при инактивации одного из участков активного центра соответствующее направление укладки субстрата не будет сопровождаться ферментативным расщеплением.

Ключевым остатком, осуществляющим атаку на β -1,4-гликозидную связь, является Glu. При его замене происходит полная инактивация одного из активных центров, что приводит к снижению

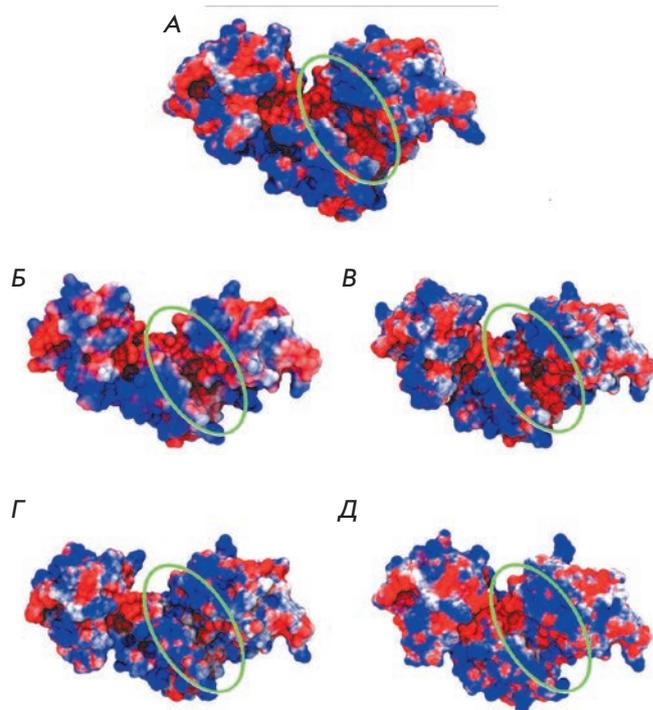


Рис. 5. Распределение зарядов на поверхности мутантных изоформ ϕ iKZ gp144. Выделен участок, связывающий субстрат. А – нативная структура, Б – E115A, В – E178A/Y197F, Г – E115A/E178A, Д – E115A/Y197F

активности фермента в 2 раза. Одиночные мутации по остатку Tyr также снижают активность фермента. В пространственной модели активного центра Glu и Tyr обращены друг к другу и образуют водородную связь. Большую часть времени симуляции методом молекулярной динамики они скоординированы таким же образом. Можно предположить, что Tyr фиксирует Glu в положении, наиболее выгодном с точки зрения протекания реакции. Замена Tyr на Phe приводит к смещению боковой цепи Glu в сторону от выгодного положения и изменению активности мутантного сайта. В эксперименте с двойным мутантом E178A/Y197F не обнаружено инактивации сайта. Несмотря на выключение одного из активных центров, вызванное заменой Glu, второй остается активным без остатка Tyr. Двойной мутант E115A/E178A активности не проявляет, поскольку произведены замены атакующих остатков Glu в обоих реакционных центрах.

Мутант E115A/Y197F не обладает активностью, несмотря на то, что один из реакционных центров остался в нативном состоянии. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей суб-

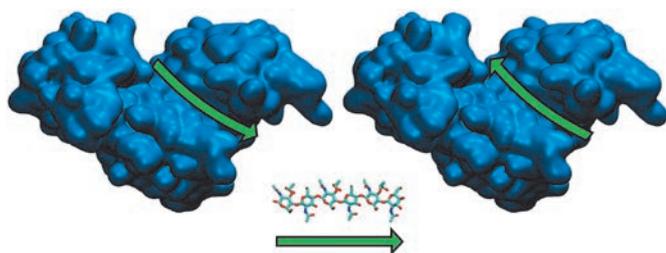


Рис. 6. Схема возможных направлений укладки субстрата в бороздку ϕ KZ gp144. Субстрат (N-ацетилмурамоил-N-ацетилглюкозамин) показан над стрелкой

страт поверхности (рис. 4), а также к смене заряда в этой области бороздки (рис. 5). Такое изменение свойств поверхности, вероятно, не позволяет ϕ KZ gp144 связывать субстрат, и фермент полностью теряет активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами данные подтверждают гипотезу о двух активных центрах у ϕ KZ gp144 и проясняют механизм действия этого фермента. Дополнительный активный центр появился, вероятно, в ходе эволюци-

онного развития, на что указывает высокая гомология структур активных центров.

В настоящее время появляется все больше штаммов патогенных и условно патогенных бактерий, устойчивых к синтетическим антибиотикам. Альтернативой антибиотикам могут быть «энзимотики» – токсичные для бактерий ферменты, в том числе пептидогликангидролазы [29]. Один из наиболее эффективных подходов к конструированию энзимотиков, активных в отношении грамотрицательных патогенов, – комбинирование ферментов с поликатионными пептидами [30] или создание химерных белков с такими пептидами (артилизины) [31, 32]. Поликатионные пептиды способствуют проникновению фермента через внешнюю мембрану бактерии. В этом контексте каталитический домен ϕ KZ gp144 в силу своей высокой активности и специфичности представляет подходящий объект для создания инженерных ферментативных противомикробных препаратов. Детальное понимание механизмов действия пептидогликанлизирующих ферментов позволит создавать на их основе более эффективные средства борьбы с патогенными бактериями.

Работа поддержана РФФ (грант № 16-16-00073).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krylov V.N., Dela Cruz D.M., Hertveldt K., Ackermann H.W. // Arch. Virol. 2007. V. 152. № 10. P. 1955–1959.
- Cornelissen A., Hardies S.C., Shaburova O.V., Krylov V.N., Mattheus W., Kropinski A.M., Lavigne R. // J. Virol. 2012. V. 86. № 3. P. 1844–1852.
- Крылов В.Н., Мирошников К.А., Крылов С.В., Вейко В.П., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Буркальцева М.В. // Генетика. 2010. Т. 46. № 2. С. 159–167.
- Fokine A., Battisti A.J., Bowman V.D., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Chipman P.R., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // Structure. 2007. V. 15. № 9. P. 1099–1104.
- Aksyuk A.A., Kurochkina L.P., Fokine A., Forouhar F., Mesyanzhinov V.V., Tong L., Rossmann M.G. // Structure. 2011. V. 19. № 12. P. 1885–1894.
- Thomas J.A., Weintraub S.T., Wu W., Winkler D.C., Cheng N., Steven A.C., Black L.W. // Mol. Microbiol. 2012. V. 84. № 2. P. 324–339.
- Мирошников К.А., Файзуллина Н.М., Сыкилинда Н.Н., Месянжинов В.В. // Биохимия. 2006. Т. 71. № 3. С. 379–385.
- Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C.W., Hertveldt K., Lavigne R. // Mol. Microbiol. 2007. V. 65. № 5. P. 1334–1344.
- Briers Y., Schmelcher M., Loessner M.J., Hendrix J., Engelborghs Y., Volckaert G., Lavigne R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 383. № 2. P. 187–191.
- Paradis-Bleau C., Cloutier I., Lemieux L., Sanschagrin F., Laroche J., Auger M., Garnier A., Levesque R.C. // FEMS Microbiol. Lett. 2007. V. 266. № 2. P. 201–209.
- Höltje J.V. // EXS. 1996. V. 75. P. 425–429.
- Fokine A., Miroshnikov K.A., Shneider M.M., Mesyanzhinov V.V., Rossmann M.G. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. № 11. P. 7242–7250.
- Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2231 p.
- Briers Y., Lavigne R., Volckaert G., Hertveldt K. // J. Biochem. Biophys. Methods. 2007. V. 70. № 3. P. 531–533.
- Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C., Vandermeersch T., Zurek E., Hutchison G.R. // J. Cheminform. 2012. V. 4. № 8. P. 1–17.
- Grosdidier A., Zoete V., Michielin O. // Nucl. Acids Res. 2011. V. 39. Suppl. 2. P. 270–277.
- Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A. // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № WEB SERVER ISS. P. 665–667. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215472>
- Dolinsky T.J., Czodrowski P., Li H., Nielsen J.E., Jensen J.H., Klebe G., Baker N.A. // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. Suppl. 2. P. 522–525.
- Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., McCammon J.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 18. P. 10037–10041.
- Sorin E.J., Pande V.S. // Biophys. J. 2005. V. 88. № 4. P. 2472–2493.
- DePaul A.J., Thompson E.J., Patel S.S., Haldeman K., Sorin E.J. // Nucl. Acids Res. 2010. V. 38. № 14. P. 4856–4867.
- Berendsen H.J.C., van der Spoel D., van Drunen R. // Comput. Phys. Commun. 1995. V. 91. № 1–3. P. 43–56.
- Lindahl E., Hess B., van der Spoel D. // J. Mol. Model. 2001. V. 7. № 8. P. 306–317.
- Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. № 16. P. 1701–1718.

25. Hess B., Kutzner C., van der Spoel D., Lindahl E. // *J. Chem. Theory Comput.* 2008. V. 4. № 3. P. 435–447.
26. van Asselt E.J., Dijkstra A.J., Kalk K.H., Takacs B., Keck W., Dijkstra B.W. // *Structure.* 1999. V. 7. № 10. P. 1167–1180.
27. Thunnissen A.M.W.H., Isaacs N.W., Dijkstra B.W. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1995. V. 22. № 3. P. 245–258.
28. Scheurwater E., Reid C.W., Clarke A.J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. V. 40. № 4. P. 586–591.
29. Schmelcher M., Donovan D.M., Loessner M.J. // *Future Microbiol.* 2012. V. 7. № 10. P. 1147–1171.
30. Legotsky S.A., Vlasova K.Y., Priyma A.D., Shneider M.M., Pugachev V.G., Totmenina O.D., Kabanov A.V., Miroshnikov K.A., Klyachko N.L. // *Biochimie.* 2014. V. 107. Pt B. P. 293–299.
31. Yang H., Yu J., Wei H. // *Front. Microbiol.* 2014. V. 5. P. 542–548.
32. Briers Y., Lavigne R. // *Future Microbiol.* 2015. V. 10. № 3. P. 377–390.

УДК 577.15: 541.128

Поиск поврежденных участков ДНК метил-CpG-связывающим ферментом MBD4

Д. А. Яковлев¹, А. А. Кузнецова¹, О. С. Федорова^{1,2*}, Н. А. Кузнецов^{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: fedorova@niboch.nsc.ru, nikita.kuznetsov@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 12.05.2016

Принята к печати 04.07.2016

РЕФЕРАТ Метил-CpG-связывающий фермент MBD4 инициирует процесс деметилирования ДНК, удаляя модифицированное азотистое основание и формируя апуриновые/апиримидиновые сайты в ДНК. MBD4 содержит два домена – метилцитозинсвязывающий, обеспечивающий локализацию фермента в CpG-доменах ДНК, и ДНК-гликозилазный, отвечающий за каталитическую активность. Изучены механизмы специфического узнавания сайтов деметилирования и образования каталитически активного комплекса между модельными ДНК-субстратами и каталитическим N-гликозилазным доменом MBD4^{cat}. Методом остановленной струи в режиме реального времени по изменению интенсивности флуоресценции остатков триптофана в MBD4^{cat} и флуорофоров в ДНК зарегистрированы конформационные переходы в белке и ДНК-субстратах в процессе их взаимодействия, установлен кинетический механизм и рассчитаны константы скорости образования и распада интермедиатов реакции. Используя дуплексы разной длины, показали, что образованию каталитически активного комплекса MBD4^{cat} предшествует стадия первичного связывания с ДНК, на которой происходят поиск и узнавание модифицированного основания. Установлена природа взаимных конформационных перестроек в процессе взаимодействия ДНК-гликозилазы MBD4^{cat} с ДНК, содержащей модифицированные нуклеотиды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА MBD4, деметилирование ДНК, конформационная динамика, предстационарная кинетика, репарация ДНК.

СОКРАЩЕНИЯ MBD4^{cat} – каталитический домен MBD4 человека (метилцитозинсвязывающий домен 4); 5-hmU – 5-гидроксиметилурацил; AP – апуриновый/апиримидиновый сайт; F – (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофуран; aPu – 2-аминопури; FAM – 6-карбоксифлуоресцеин; BHQ1 – тушитель флуоресценции black hole quencher; FRET – резонансный перенос энергии флуоресценции; ПААГ – полиакриламидный гель.

ВВЕДЕНИЕ

Процессы метилирования и деметилирования ДНК лежат в основе эпигенетической регуляции экспрессии генов, которая играет большую роль в клеточной дифференцировке, геномном импринтинге, канцерогенезе, а также во многих возрастных изменениях организмов. Известно, что в процессе деметилирования ДНК участвуют различные ферментативные системы: ДНК-метилтрансферазы, диоксигеназы и ДНК-гликозилазы [1, 2]. ДНК-гликозилазы инициируют процесс деметилирования путем удаления метилированного основания ДНК, поэтому для восстановления исходного нуклеотида необходимы

и другие ферменты, такие, как AP-эндонуклеазы (APE1), ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы [3–5].

ДНК-гликозилаза MBD4 [КФ 3.2.2.-] содержит два домена – метилцитозинсвязывающий и ДНК-гликозилазный. Каталитический N-гликозилазный домен MBD4^{cat} состоит из 138 аминокислотных остатков (остатки 437–574), образующих девять α -спиралей, которые формируют глобулярную структуру и карман активного центра [6]. Структура MBD4^{cat} позволяет отнести его к семейству «спираль-шпилька-спираль» (HhH), названному так из-за мотива $\alpha 7$ -петля- $\alpha 8$, характерному для различных белков этого семейства.

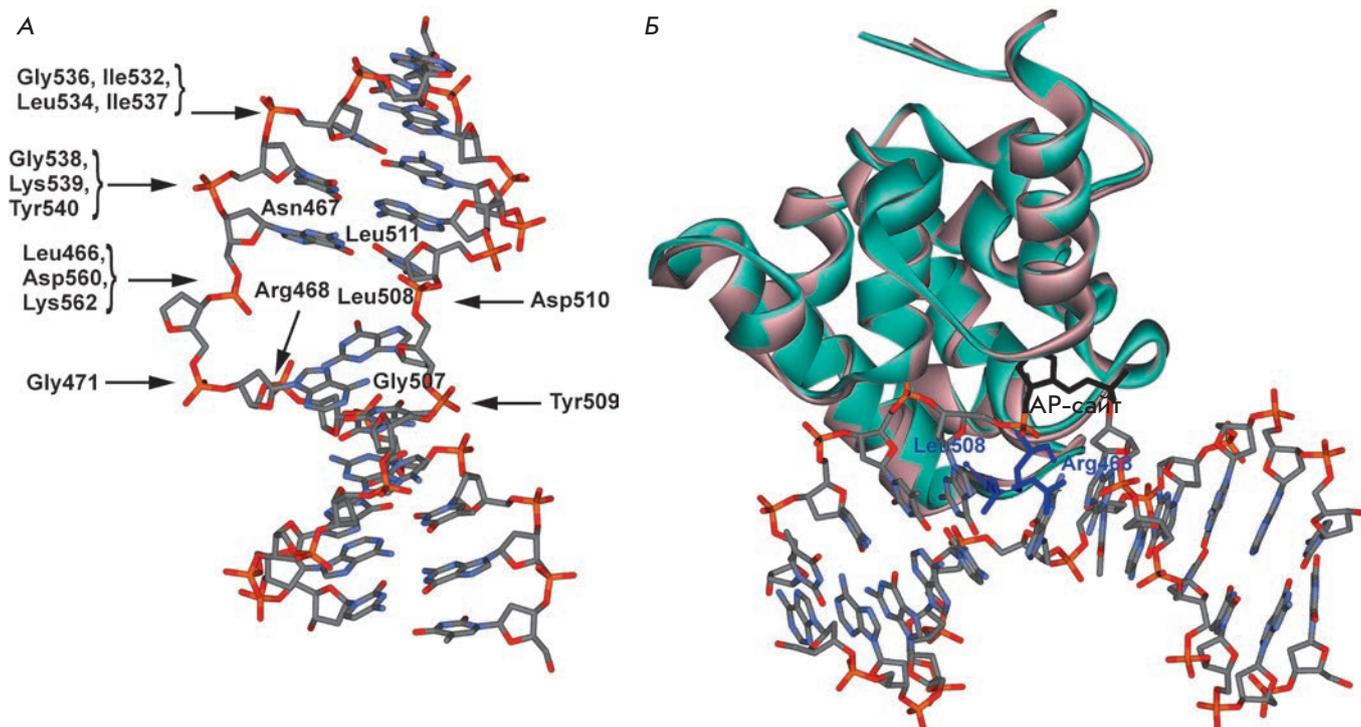


Рис. 1. Схематическое изображение пространственной структуры комплекса MBD4^{cat} с ДНК. А – функционально важные аминокислотные остатки, участвующие в образовании специфических контактов между ферментом и ДНК [12]. Б – сравнение структуры свободного фермента MBD4^{cat} (розовый, PDB ID 4E9E, [11]) и комплекса фермента MBD4^{cat} с ДНК (зеленый, PDB ID 4DK9, [12]). AP-сайт (черный) вывернут из дуплекса и расположен в активном центре фермента, аминокислотные остатки Arg468 и Leu508 (синий) встроены в дуплекс ДНК

Основным субстратом MBD4 является ДНК, содержащая некомплементарные пары G · T либо G · U [2]. MBD4 также активен в отношении 5-гидроксиметилурацила (5-hmU) [7]. Считается, что 5-hmU образуется в качестве интермедиата в многостадийном пути активного деметилирования, в котором 5-meC гидроксилируется ТЕТ-диоксигеназами с образованием 5-гидроксиметилцитозина (5-hmC). Затем 5-hmC дезаминируется дезаминазой AID с образованием 5-hmU и удаляется при участии MBD4 в процессе эксцизионной репарации [8]. MBD4 активен и в отношении некоторых галогенированных субстратов: 5-ClU и 5-BrU, образующихся при воспалительных процессах, и 5-FU, который может возникать при химиотерапии [9]. Более того, фермент активен по отношению к 3,N⁴-этенцитозину (εC), который образуется при перекисном окислении липидов и метаболизме винилхлорида [10].

В настоящее время определены структуры MBD4^{cat} в свободном состоянии и в комплексах с ДНК-дуплексами, содержащими пары 5-hmU/G, T/G и AP/G [11, 12]. Как показано на рис. 1А, в комплексе с продуктом реакции фермент взаимодействует преимущественно с пятью нуклеотидами

поврежденной цепи ДНК. Образование фермент-субстратного комплекса не приводит к значительным конформационным перестройкам по сравнению со свободным белком (рис. 1Б). В то же время ДНК-дуплексы в комплексе с MBD4^{cat} изогнуты в области модифицированного нуклеотида, нуклеотид вывернут из двойной спирали, а азотистое основание находится в активном центре. MBD4^{cat} образует прямые контакты с пятью фосфатными группами, расположенными с 5'- и 3'-стороны от вывернутого нуклеотида [12]. Два аминокислотных остатка, Arg468 и Leu508, встраиваются в ДНК через малую бороздку и заполняют пространство в дуплексе, которое образуется после выворачивания модифицированного нуклеотида. Предполагается, что гидролиз N-гликозидной связи протекает по механизму нуклеофильного замещения [7]. Нуклеофильная атака на С1'-атом осуществляется либо координированной в активном центре фермента молекулой воды, либо карбоксильной группой Asp560 [7, 12].

Ранее в работе [13] была изучена предстационарная кинетика накопления продукта реакции N-гликозилирования G/T-содержащего ДНК-субстрата в ходе катализируемого MBD4 процесса

в условиях одного оборота фермента в течение 15 с – 10 ч. Показано, что кинетика процесса характеризуется двумя фазами: начальной быстрой и следующей за ней медленной фазой, возникающей из-за прочного связывания фермента с продуктом реакции – AP-сайтом.

Цель настоящей работы состояла в изучении механизмов узнавания ферментом специфического сайта в субстрате и формирования каталитически компетентного состояния. Для этого исследовали конформационную динамику MBD4^{cat} и модельных ДНК-субстратов на коротких временах в интервале 2 мс–200 с в условиях, соответствующих или близких «одному обороту фермента». Изменения конформации белка регистрировали по изменению флуоресценции остатков триптофана (Trp), а конформации ДНК – по изменению флуоресценции остатка 2-аминопурина (aPu) или по эффективности резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) пары красителей FAM/BHQ1. В качестве субстратов использовали дуплексы, содержащие пару U : G, а в качестве аналога продукта – дуплексы, содержащие неразрезаемый аналог AP-сайта – остаток (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофурана (F-сайт). Влияние длины дуплекса на связывание фермента с ДНК и поиск повреждения изучали с использованием субстратов разной длины: 12, 17 и 28 п.н. На основании полученных данных определили кинетический механизм взаимных конформационных перестроек в процессе взаимодействия ДНК-гликозилазы MBD4^{cat} с ДНК, содержащей модифицированные нуклеотиды.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

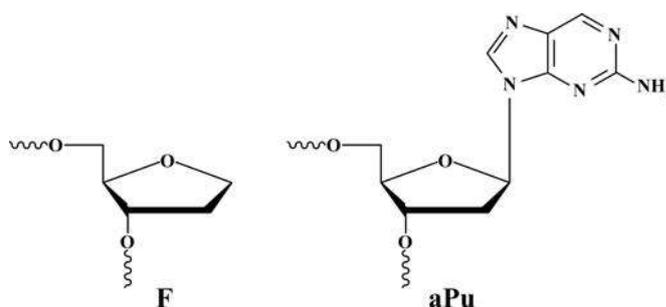
В работе использовали реактивы производства Sigma-Aldrich (США): акриламид, N,N'-метиленисакриламид, дитиотреит, мочевины, EDTA, ацетонитрил, глицерин, трис-(гидроксиметил)-аминометан, а также отечественные реактивы квалификации «ос. ч.». Все растворы готовили на дважды дистиллированной воде.

ДНК-субстраты

Дезоксирибоолигонуклеотиды синтезированы в лаборатории бионанотехнологий ИХБФМ СО РАН на автоматическом ДНК/РНК-синтезаторе ASM-800 («Биоссет», Новосибирск, Россия) с использованием коммерческих амидофосфитов нуклеозидов и CPG-носителей (GlenResearch, США). Нативные и модифицированные дезоксирибоолигонуклеотиды выделяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1200 (США), используя колонку Zorbax SB-C18 (5 мкм) 4.6 × 150 мм, в линейном градиенте ацетонитрила (0 → 50%) в присутствии 20 мМ ацетата три-

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности дезоксирибоолигонуклеотидов и структуры модифицированных нуклеотидов

Сокращенное название	Последовательность
U ₁₂ -субстрат	CTCTC (U) CCTTCC GAGAG G GGAAGG
F ₁₂ -лиганд	CTCTC (F) CCTTCC GAGAG G GGAAGG
FaPu ₁₂ -лиганд	CTCTC (F) (aPu) CTCTC GAGAG G C GAAGG
U ₁₇ -субстрат	GCTCA (U) GTACAGAGCTG CGAGT G CATGTCTCGAC
UaPu ₁₇ -субстрат	GCTCA (U) (aPu) TACAGAGCTG CGAGT G C ATGTCTCGAC
FAM-U-BHQ1-субстрат	FAM-GCTCA (U) GTACAGAGCTG CGAGT G CATGTCTCGAC-BHQ1
U ₂₈ -субстрат	GTGTCACCACTGCTCA (U) GTACAGAGCTG CACAGTGGTGACGAGT G CATGTCTCGAC



этиламмония, pH 7, в течение 30 мин при скорости элюции 2 мл/мин. Фракции, содержащие дезоксирибоолигонуклеотиды, высушивали под вакуумом, растворяли в воде и осаждали 2% LiClO₄ в ацетоне. После промывки чистым ацетоном и высушивания осадки дезоксирибоолигонуклеотидов растворяли в воде и хранили при –20°C до использования. Гомогенность очищенных дезоксирибоолигонуклеотидов подтверждали с помощью гель-электрофореза в денатурирующих условиях (20% полиакриламидный гель, 8 М мочевины, 0.1 М трис-боратный буфер, pH 8.3). Дезоксирибоолигонуклеотиды визуализировали с помощью красителя Stains-All (Sigma, США). Субстраты и лиганды фермента представляли собой 12-, 17- и 28-звенные дезоксирибоолигонуклеотидные дуплексы, представленные в табл. 1.

Фермент MBD4^{cat}

Каталитический домен ДНК-гликозилазы человека MBD4^{cat} (аминокислотные остатки 426–580) был вы-

делен из клеток *Escherichia coli* Rosetta 2, трансформированных плазмидой pET29b-MBD4^{cat} как описано ранее [11, 14]. Плазмида pET29b-MBD4^{cat}, содержащая ген MBD4^{cat}, была любезно предоставлена М.К. Сапарбаевым (Groupe Réparation de l'ADN, Université Paris-Sud XI, Institut Gustave Roussy, Франция). Культуру клеток *E. coli* Rosetta 2 выращивали в среде LB (1 л), содержащей 50 мкг/мл канамицина, при температуре 37°C до оптической плотности 0.6–0.7 на длине волны 600 нм. После этого температуру понижали до 20°C и индуцировали транскрипцию, добавляя изопропил-β-D-тиогалактопиранозид до 0.2 мМ. После индукции клетки инкубировали в течение 16 ч, затем осаждали центрифугированием (10 мин при 12000 об/мин) и готовили суспензию клеток в 30 мл буферного раствора I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащего 50 мМ KCl. Клетки лизировали под давлением при помощи Френч-пресса SIM AMINCO. Все последующие процедуры проводили при 4°C. Клеточный лизат центрифугировали (40 мин при 30000 об/мин), супернатант наносили на колонку I (Q-Sepharose Fast Flow, Amersham Biosciences, Швеция) и промывали буферным раствором I (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащим 50 мМ KCl. Фракции, содержащие белок, собирали и наносили на колонку II (HiTrap-HelatingTM, Amersham Biosciences, Швеция) в буферном растворе II (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.8), содержащем 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазол. Хроматографию проводили в буферном растворе II и линейном градиенте 20 → 500 мМ имидазола. Оптическую плотность раствора регистрировали на длине волны 280 нм. Чистоту белка определяли с помощью гель-электрофореза. Фракции, содержащие белок MBD4^{cat}, диализовали в буфере (20 мМ HEPES-NaOH, pH 7.5, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 250 мМ NaCl, 50% глицерин) и хранили при -20°C. Концентрацию фермента рассчитывали из значения оптической плотности раствора белка на длине волны 280 нм и коэффициента молярной экстинкции 54493 М⁻¹см⁻¹ [15].

Все эксперименты по исследованию ферментативной реакции проводили в буферном растворе: 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5, 50 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 9% глицерин при 25°C.

Электрофорез в ПААГ

Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с использованием меченных ³²P по 5'-концу олигонуклеотидов, содержащих модифицированное основание. Мечение олигонуклеотидов по 5'-концу проводили согласно [16]. Зависимости степени превращения субстрата от времени определяли следующим об-

разом. К 10 мкл буферного раствора, содержащего ³²P-меченый олигонуклеотид и эквимольное количество комплементарного олигонуклеотида, добавляли 10 мкл 2.0–4.0 мкМ фермента в том же буферном растворе. Реакционную смесь быстро перемешивали и через определенные промежутки времени отбирали аликвоты объемом 2 мкл, которые переносили в предварительно подготовленные пробирки, содержащие 2 мкл раствора 7 М мочевины, 0.1% бромфенолового синего и 0.1% ксиленцианола. Затем добавляли 1 мкл 1 М NaOH и инкубировали при 56°C в течение 15 мин для гидролиза фосфодиэфирных связей в AP-сайтах. Раствор нейтрализовали эквивалентным количеством соляной кислоты, наносили на ПААГ и проводили электрофорез при напряженности 50 В/см. Количество образующегося продукта определяли путем сканирования радиоавтографа на приборе Molecular Imager FX phosphorimager (Bio-Rad, США) и обработки данных в программном пакете Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, США). Степень накопления продуктов рассчитывали как отношение площадей пиков продуктов к сумме площадей пиков продуктов и пика исходного олигонуклеотида. Ошибка определения, как правило, не превышала 20%.

Изучение кинетики процесса методом остановленной струи

Кинетические кривые флуоресценции регистрировали методом остановленной струи на спектрометре SX.18MV (Applied Photophysics, Великобритания). Белок MBD4^{cat} содержит восемь остатков Trp и семь остатков Tyr. Возбуждение флуоресценции MBD4^{cat} проводили на длине волны 290 нм, регистрацию флуоресценции – на длинах волн более 320 нм (фильтр WG-320, Schott, Германия). В этих условиях основной вклад в флуоресценцию белка обеспечивают остатки Trp (> 90%). При использовании субстратов, содержащих остатки aPu, флуоресценцию возбуждали на длине волны 310 нм, а регистрацию проводили на длинах волн более 370 нм (фильтр LG-370, Corion, США). Для анализа эффективности переноса энергии FRET пары FAM/BHQ1 флуоресценцию красителя FAM возбуждали на длине волны 494 нм. Флуоресценцию красителя FAM регистрировали на длинах волн более 515 нм при использовании светофильтра OG-515 (Schott, Германия). «Мертвое» время прибора составляло 1.4 мс. Каждую кинетическую кривую получали, усредняя, как минимум, три экспериментальные кривые.

Анализ кинетических данных

Для получения минимальной кинетической схемы, описывающей взаимодействие фермента с субстра-

тами, и расчета констант скорости конформационных переходов в ходе всех элементарных стадий получали набор кинетических кривых для разных концентраций фермента или субстрата. Количественную обработку результатов проводили с помощью программы DynaFit (BioKin, США) [17] путем оптимизации значений параметров, входящих в кинетические схемы, как описано ранее [18–20].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Взаимодействие MBD4^{cat} с 28-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 2А представлены кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с 28-звенным субстратом U₂₈. Поскольку MBD4^{cat} образует контакты лишь с пятью нуклеотидами ДНК, использование в качестве субстрата 28-звенного ДНК-дуплекса приводит к значительному вкладу в суммарную скорость процесса стадии поиска остатка урацила в ДНК. Действительно, из полученных кинетических кривых (рис. 2А) видно, что интенсивность флуоресценции Trp уменьшается в широком временном диапазоне – 2 мс–10 с. Затем следует фаза роста интенсивности флуоресценции Trp (10–100 с).

Анализ накопления продуктов реакции с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 2Б) показал, что процесс характеризуется двумя фазами: быстрой (до ~200 с) и медленной (до 1600 с и выше). На начальном участке кинетических кривых (до 200 с) наблюдается «скачок», за которым следует медленный рост. Такой вид кривых свидетельствует о существовании скоростьлимитирующей стадии после каталитической реакции. Увеличение концентрации U₂₈ с 0.25 до 1.0 мкМ приводит к увеличению количества расщепляемого субстрата на стадии «скачка» до 0.7 мкМ. Однако при дальнейшем увеличении концентрации U₂₈-субстрата до 2.0 мкМ это значение незначительно увеличивается до 0.9 мкМ, что свидетельствует о насыщении активной формы фермента ДНК-субстратом. Таким образом, данные о накоплении продуктов реакции показывают, что концентрация активной формы фермента равна примерно 1.0 мкМ. Достаточно низкое значение активной формы каталитического домена MBD4^{cat} (~ 25%), по-видимому, связано с особенностями сборки полипептида в функциональный белок в клетках *E. coli*, что согласуется с данными [13].

Таким образом, можно предположить, что падение интенсивности флуоресценции Trp в области 2 мс–~10 с характеризует образование первичного комплекса и поиск модифицированного основания,

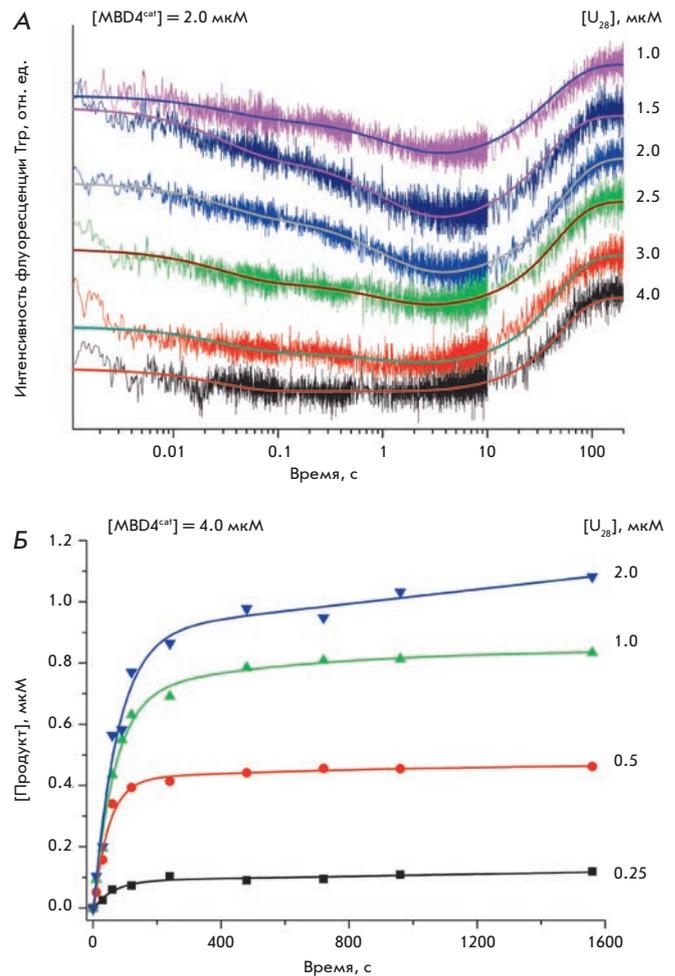


Рис. 2. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U₂₈-субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме. [MBD4^{cat}] = 2.0 мкМ, концентрация U₂₈ изменяется от 1.0 до 4.0 мкМ. Б – накопление продукта реакции по данным электрофореза в ПААГ. [MBD4^{cat}] = 4.0 мкМ, концентрация U₂₈ изменяется от 0.25 до 2.0 мкМ

а рост в интервале ~10–100 с – каталитически-компетентной конформации фермента и начало процесса накопления продукта. Необходимо отметить, что повышение интенсивности флуоресценции Trp в интервале 10–100 с (рис. 2А) совпадает по времени с началом накопления продуктов реакции (рис. 2Б). Скоростьлимитирующей стадией ферментативного процесса скорее всего является стадия диссоциации комплекса фермент–продукт, что согласуется с выводами, сделанными ранее [10].

Количественный анализ кинетических кривых взаимодействия MBD4^{cat} с 28-звенным ДНК-

субстратом (рис. 2А) позволил предложить минимальную кинетическую схему, удовлетворительно описывающую экспериментальные данные. Две равновесные стадии характеризуют первичное связывание ДНК и последующий процесс перестройки конформации фермента, приводящий к образованию каталитически компетентного комплекса, в котором N-гликозидная связь подвергается необратимому гидролизу. Завершает ферментативный цикл равновесная стадия диссоциации комплекса фермента и ДНК-продукта. Константы скорости и константы равновесия, характеризующие приведенные на схеме стадии, представлены в табл. 2. Используя константы скорости элементарных стадий, получены значения стационарных параметров ферментативного процесса (K_m и k_{cat}), которые хорошо согласуются с данными [11, 13].

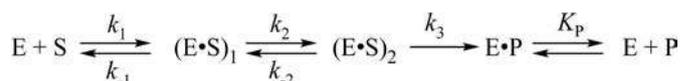
Используя уравнение (1), на основании данных ($e_0 = 4.0$ мкМ, $s_0 = 0.5$ мкМ, рис. 2Б) оценили фактическую скорость стационарной фазы реакции $V_{st} \approx (3.2 \pm 1.2) \times 10^{-5}$ мкМ/с. Ожидаемое значение максимальной скорости каталитической реакции, оцененное по формуле $V_{max} = k_{cat} \times e_0$, где e_0 – исходная концентрация фермента, с учетом 25% активности фермента равно 4.6×10^{-2} мкМ/с. Это означает, что лимитирующей является не химическая стадия, а, вероятно, диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции, что коррелирует с наличием «скачка» на кинетических кривых накопления продукта.

$$V_{st} = \Delta[P]/\Delta t, \quad (1)$$

где $\Delta[P]$ – прирост концентрации продукта Р за время Δt .

Взаимодействие MBD4^{cat} с 17-звенным ДНК-дуплексом

Кинетические кривые, полученные при взаимодействии MBD4^{cat} с более коротким 17-звенным ДНК-субстратом, имеют две фазы изменения интенсивности флуоресценции Тгр, как и в случае с 28-звенным дуплексом (рис. 3А). Анализ продуктов реакции с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 3Б) показал, что в случае U_{17} -субстрата накопление продуктов происходит в интервале времени < 1000 с. Кинетические кривые имеют выраженный «скачок» накопления продукта в интервале времени до 200 с с последующим медленным увеличением концентрации продукта. Последующее замедление накопления продуктов реакции свидетельствует о том, что процесс диссоциации комплекса фермент–продукт является скоростьюлимитирующим, как и для U_{28} -субстрата.



Кинетический механизм взаимодействия MBD4 с ДНК-субстратами. E – фермент, S – субстрат, $(E \cdot S)_1$ и $(E \cdot S)_2$ – комплексы фермента с субстратом, $(E \cdot P)$ – комплекс фермента с продуктом, P – продукт превращения субстрата, k_1 и k_{-1} – константы скорости прямых и обратных реакций равновесных стадий, k_2 – константа скорости каталитической стадии, K_p – равновесная константа диссоциации комплекса E · P

Анализ кривых кинетики флуоресценции, представленных на рис. 3А, показал, что они описываются минимальной кинетической схемой. Константы скорости и равновесия, характеризующие эти стадии, представлены в табл. 2. Интересно отметить, что уменьшение на 11 нуклеотидов неспецифического участка дуплекса U_{17} -субстрата по сравнению с U_{28} -субстратом не приводит к значительным изменениям констант скорости образования и распада первичного комплекса $(E \cdot S)_1$. Тем не менее уменьшение длины дуплекса привело к увеличению константы равновесия K_2 , характеризующей образование каталитического комплекса $(E \cdot S)_2$, в 2.4 раза по сравнению с U_{28} -субстратом (13.0 и 5.5 соответственно). Это должно быть связано с уменьшением времени поиска поврежденного участка, который происходит как путем одномерной диффузии вследствие скольжения и небольших «прыжков» (hopping) [21–23] фермента по цепи ДНК, так и трехмерной диффузии, включающей множественные акты ассоциации-диссоциации.

Как и в случае U_{28} -субстрата, у U_{17} -субстрата фактическая стационарная скорость накопления продукта V_{st} составляет $\sim (6.2 \pm 0.9) \times 10^{-5}$ мкМ/с при $e_0 = 4.0$ мкМ, $s_0 = 0.5$ мкМ, и меньше значения $V_{max} = 4.2 \times 10^{-2}$ почти в 1000 раз. Это различие, а также «скачок» на кинетических кривых накопления продукта реакции (рис. 3Б) свидетельствуют о том, что диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции лимитирует скорость ферментативного процесса.

Взаимодействие MBD4^{cat} с 12-звенным ДНК-дуплексом

На рис. 4 представлены кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Тгр, соответствующие процессу взаимодействия MBD4^{cat} с 12-звенным субстратом U_{12} . Из рис. 4А видно, что кинетические кривые имеют две фазы: падения интенсивности (10–500 мс) и роста с выходом на плато (0.5–10 с). Кинетика накопления продуктов

Таблица 2. Константы скорости и константы равновесия процессов взаимодействия MBD4^{cat} с различными субстратами, полученные из анализа флуоресцентных данных

Константы / Субстраты	U ₂₈	U ₁₇	U ₁₂	F ₁₂
$k_1 \times 10^{-6}, \text{c}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$	7.0 ± 2.0	12.0 ± 3.0	0.5 ± 0.2	10.0 ± 4.0
k_{-1}, c^{-1}	30 ± 10	45 ± 20	3.3 ± 0.5	8.0 ± 4.0
${}^a K_1 \times 10^{-6}, \text{M}^{-1}$	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.15 ± 0.06	1.2 ± 0.8
k_2, c^{-1}	2.1 ± 0.3	3.0 ± 1.0	0.18 ± 0.04	0.08 ± 0.01
k_{-2}, c^{-1}	0.38 ± 0.05	0.23 ± 0.05	0.12 ± 0.01	0.03 ± 0.01
${}^a K_2$	5.5 ± 1.1	13.0 ± 5.0	1.5 ± 0.3	2.7 ± 0.9
k_3, c^{-1}	0.056 ± 0.007	0.046 ± 0.002	< 0.01	
K_p, M	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^{-7}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$		
${}^b K_d, \text{M}$	6.6×10^{-7}	2.7×10^{-7}	2.6×10^{-6}	2.2×10^{-7}
${}^b K_m, \text{M}$	7.4×10^{-7}	3.2×10^{-7}		
${}^r k_{\text{cat}}, \text{c}^{-1}$	4.6×10^{-2}	4.2×10^{-2}		

$${}^a K_1 = k_1/k_{-1}, K_2 = k_2/k_{-2},$$

$${}^b K_d = 1/K_{\text{ass}}, K_{\text{ass}} = K_1 + K_1 \times K_2,$$

$${}^b K_m = (k_2 k_3 + k_{-1} k_{-2} + k_{-1} k_3)/k_1(k_2 + k_{-2} + k_3),$$

$${}^r k_{\text{cat}} = k_2 k_3 / (k_2 + k_{-2} + k_3).$$

ферментативной реакции, определенная с помощью электрофоретического разделения реакционной смеси в ПААГ (рис. 4Б), свидетельствует о том, что каталитическая стадия проходит на временах порядка (≥ 1000 с), т.е. значительно медленнее стадий, соответствующих изменению интенсивности Тгр. Следовательно, изменения интенсивности флуоресценции остатков Тгр, зарегистрированные в интервале времени до 200 с, скорее всего отражают начальные конформационные изменения фермента в ходе образования фермент-субстратного комплекса и дальнейшую перестройку конформации фермента. При этом каталитически компетентное состояние формируется неэффективно, и реакция гидролиза N-гликозидной связи значительно замедляется по сравнению с 17- и 28-звенными субстратами. Поэтому для анализа серии кинетических кривых использовали только равновесные стадии связывания ДНК, характеризующие образование комплексов (E · S)₁ и (E · S)₂ на схеме. Константы скорости, характеризующие эти стадии и полученные путем анализа кинетических кривых изменения интенсивности флуоресценции фермента (рис. 4А), представлены в табл. 2.

Сравнение констант скорости взаимодействия MBD4^{cat} с 12- и 17-звенными субстратами показывает, что при уменьшении длины дуплекса на пять нуклеотидов значительно уменьшается скорость как образования первичного комплекса (E · S)₁, характеризуемого константой скорости k_1 , так и его распада, k_{-1} , – в 24 и 14 раз соответственно. При этом константа ассоциации E и S с образованием комплекса (E · S)₁, K_1 , уменьшается лишь в 2 раза. Можно

предположить, что неспецифический участок U₁₇-субстрата выполняет функцию матрицы, с которой в условиях быстрого равновесия образуется первичный комплекс (E · S)₁, что позволяет ферменту производить эффективный поиск поврежденного участка. Действительно, константа образования k_2 каталитического комплекса (E · S)₂ в случае U₁₇-субстрата в 17 раз больше, чем в случае U₁₂-субстрата. Таким образом, увеличение неспецифического участка дуплекса на пять нуклеотидов в U₁₇-субстрате по сравнению с U₁₂-субстратом приводит к уменьшению общей константы диссоциации K_d в 10 раз (табл. 2). Отсутствие в U₁₂-субстрате неспецифического участка, по-видимому, препятствует образованию правильно ориентированной активной конформации фермента.

Взаимодействие MBD4^{cat} с аналогом продукта

Удаление модифицированного основания ферментом MBD4 приводит к образованию AP-сайта в ДНК. Для того чтобы идентифицировать природу конформационных изменений фермента и ДНК, происходящих в процессе связывания продукта реакции, содержащего AP-сайт, использовали его стабильный аналог, представляющий собой остаток (2R,3S)-2-(оксиметил)-3-окситетрагидрофурана (F-сайт), не содержащий OH-группу в положении C1' дезоксирибозы. Взаимодействие MBD4^{cat} с F₁₂-лигандом должно приводить к формированию комплекса, имитирующего комплекс фермента с продуктом реакции после осуществления каталитической стадии ферментативного процесса.

Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции Тгр при взаимодействии MBD4^{cat}

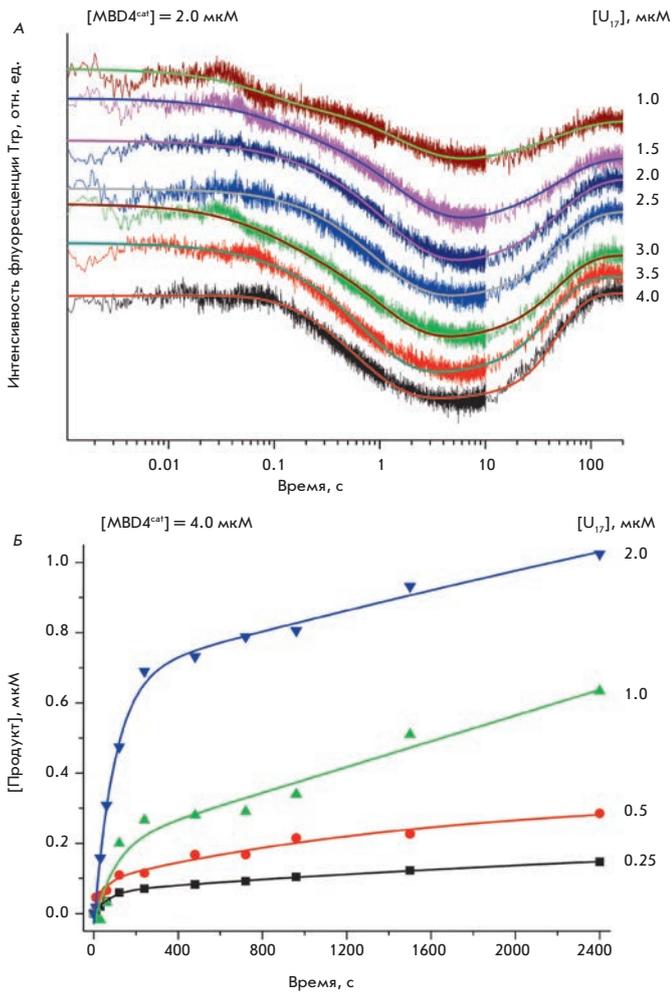


Рис. 3. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U_{17} -субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме. $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 2.0 \mu\text{M}$, концентрация U_{17} изменяется от 1.0 до 4.0 μM . Б – накопление продукта реакции, по данным электрофореза в ПААГ. $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 4.0 \mu\text{M}$, концентрация U_{17} изменяется от 0.25 до 2.0 μM

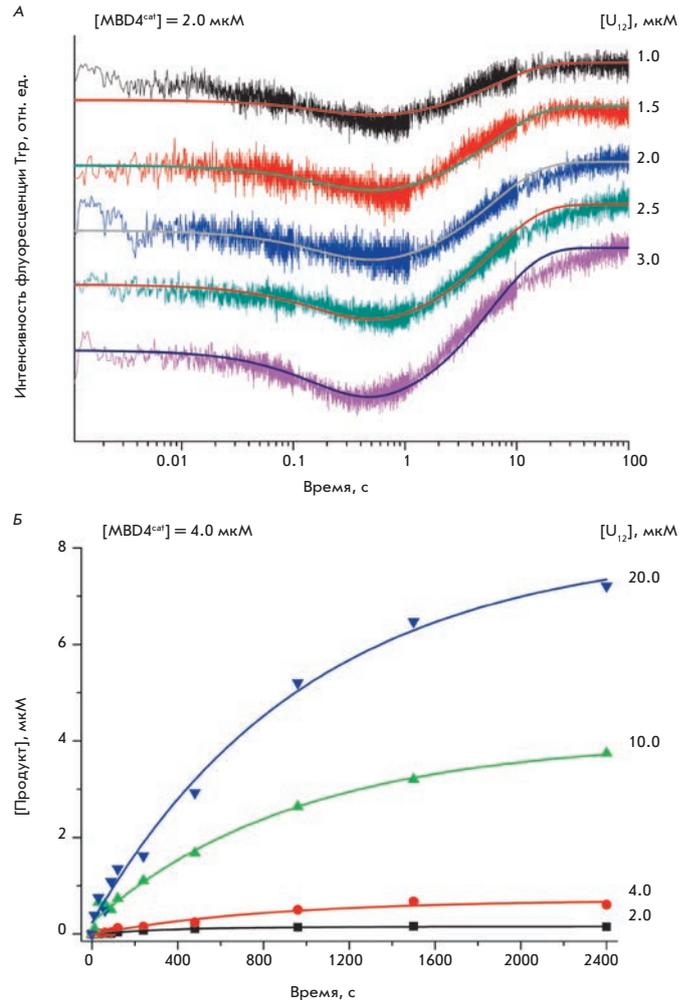


Рис. 4. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с U_{12} -субстратом. А – экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме (стадии 1 и 2); $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 2.0 \mu\text{M}$, концентрация U_{12} изменяется от 1.0 до 3.0 μM . Б – накопление продукта реакции, оцененное методом электрофореза в ПААГ; $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 4.0 \mu\text{M}$, концентрация U_{12} изменяется от 2.0 до 20.0 μM

и F_{12} -лиганда имеют двухфазный профиль (рис. 5), как и в случае U_{12} -субстрата (рис. 4). Можно предположить, что уменьшение и последующий рост интенсивности флуоресценции Trp имеют такую же природу, как и у ДНК-дуплекса, содержащего уридин. Таким образом, независимо от природы модифицированного нуклеотида первичное связывание и дальнейшая перестройка конформации фермента в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с ДНК приводят к образованию каталитически активного комплекса

(рис. 5). Полученные кинетические кривые удовлетворительно описываются двухстадийной равновесной кинетической схемой. Константы скорости, характеризующие эти стадии, представлены в табл. 2.

Сравнение констант скорости и равновесия (табл. 2), характеризующих взаимодействие MBD4^{cat} с U_{12} -субстратом и F_{12} -лигандом, показывает, что с аналогом продукта реакции первичный комплекс образуется примерно в 10 раз более эффективно. Нужно отметить, что константы равновесия

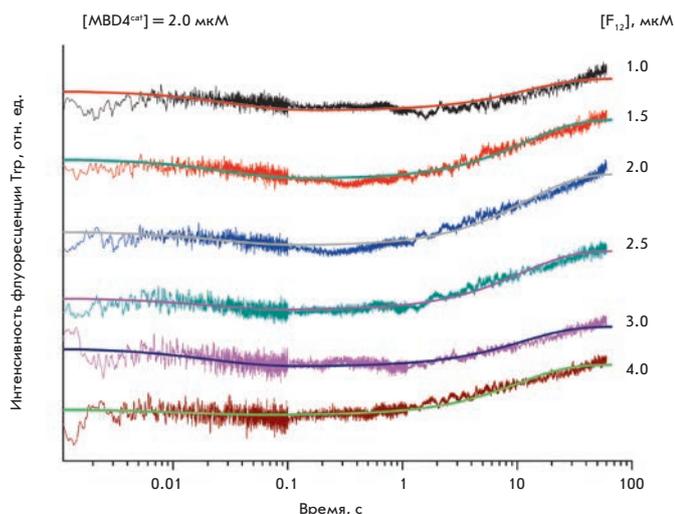


Рис. 5. Кинетика взаимодействия MBD4^{cat} с F_{12} -лигандом. Экспериментальные кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp и расчетные кривые, полученные путем обработки данных согласно схеме (стадии 1 и 2). $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 2.0 \text{ мкМ}$, концентрация F_{12} изменяется от 1.0 до 4.0 мкМ

второй стадии отличаются менее чем в 2 раза. Таким образом, можно сделать заключение, что поиск и связывание поврежденного участка ДНК ферментом MBD4^{cat} происходят более эффективно в случае дестабилизированного F-сайтом ДНК-дуплекса.

Сравнительный анализ конформационных изменений фермента и ДНК

Для того чтобы уточнить природу процессов, происходящих при образовании каталитического комплекса и зарегистрированных по изменению интенсивности остатков Trp фермента, использовали модельные ДНК-дуплексы, несущие флуоресцентные остатки (табл. 1) в качестве «сенсоров» конформационных изменений ДНК. Известно, что интенсивность флуоресценции аРи в ДНК зависит от микроокружения флуорофора и изменяется, например, в результате локального плавления дуплекса в непосредственной близости от флуорофора [24–26]. В двухцепочечных структурах ДНК при образовании стэкинга с соседними основаниями интенсивность флуоресценции остатков аРи резко уменьшается по сравнению с одноцепочечной ДНК. Использование UaPu_{17} -субстрата, несущего остаток аРи с 3'-стороны от уридина, позволило зарегистрировать конформационные изменения в ДНК, происходящие при взаимодействии с MBD4^{cat} , вероятно, в результате вы-

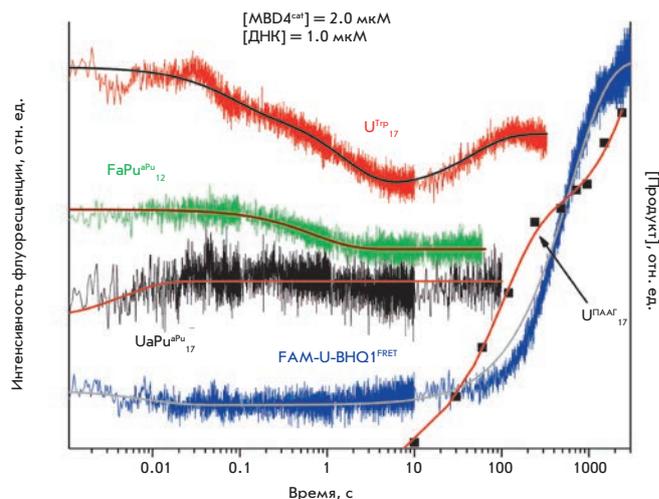


Рис. 6. Сравнение кинетических кривых, зарегистрированных по изменению интенсивности флуоресценции остатков Trp, аРи или FRET-сигнала в процессе взаимодействия MBD4^{cat} с U_{17} , UaPu_{17} , FaPu_{12} и FAM-U-BHQ1 -субстратами и по накоплению продуктов реакции. Показаны экспериментальные и теоретические кинетические кривые. Концентрация ДНК-субстратов равна 1.0 мкМ, $[\text{MBD4}^{\text{cat}}] = 2.0 \text{ мкМ}$

ворачивания поврежденного нуклеотида из ДНК и встраивания в образовавшуюся полость остатков Arg468 и Leu508. Как видно из рис. 6, на кинетической кривой, характеризующей взаимодействие MBD4^{cat} и UaPu_{17} -субстрата, имеется фаза быстрого роста (1–50 мс) интенсивности флуоресценции аРи, свидетельствующая о дестабилизации центральной части дуплекса на начальных этапах фермент-субстратного взаимодействия.

Кроме того, для исследования изменений структуры ДНК-субстрата применили метод FRET. Для этого использовали FAM-U-BHQ1 -субстрат, содержащий красители FAM и BHQ1 на 5'-концах олигонуклеотидов, формирующих дуплекс, что позволило зарегистрировать конформационные изменения дуплекса, связанные с изменением расстояния между красителями. Видно (рис. 6), что на начальном участке кинетической кривой (1–50 мс) происходит небольшое уменьшение FRET-сигнала, свидетельствующее об изгибании дуплекса. Сравнение с кривой изменения интенсивности флуоресценции остатков Trp показывает, что в этот момент времени (< 100 мс) фермент не претерпевает значительных конформационных изменений. Поэтому можно предположить, что в процессе первичного связывания ДНК происходит изгибание спирали и частичное плавление центральной части дуплекса. По-видимому, именно

такие индуцированные ферментом изменения структуры дуплекса позволяют MBD4^{cat} различать модифицированные и немодифицированные основания в процессе скольжения по двойной спирали ДНК.

Интересно, что фаза роста интенсивности флуоресценции остатков Trp (10–100 с), совпадающая с начальным накоплением продукта реакции, не приводит к изменению FRET-сигнала. Однако скорость-лимитирующая стадия диссоциации комплекса фермента с продуктом реакции вызывает медленный рост FRET-сигнала в интервале времени 100–3000 с, а также приводит к медленному накоплению продуктов реакции (рис. 6).

Интенсивность флуоресценции aPu при связывании ДНК-дуплексов, содержащих урацил (UaPu₁₇) и F-сайт (FaPu₁₂), изменяется разнонаправленно (рост и падение соответственно) и в разные промежутки времени ($t < 0.1$ с и $0.1 < t < 1$ с соответственно). Фазу роста интенсивности флуоресценции aPu для UaPu₁₇-субстрата, отражающую локальное плавление дуплекса при образовании первичного комплекса, невозможно зарегистрировать в случае FaPu₁₂-лиганда, поскольку расположенный с 3'-стороны от F-сайта остаток aPu уже находится в менее гидрофобном окружении, чем в канонической ДНК. Однако при взаимодействии MBD4^{cat} с FaPu₁₂-лигандом наблюдается хорошо выраженное уменьшение интенсивности флуоресценции aPu на более поздних временах (до 1 с). Уменьшение интенсивности флуоресценции aPu, связанное с увеличением гидрофобности окружения остатка aPu, скорее всего свидетельствует о встраивании аминокислотных остатков MBD4^{cat} (Arg468 и Leu508) в дуплекс на этих временах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опираясь на данные рентгеноструктурного анализа [11, 12], можно предположить, что при взаимодействии MBD4^{cat} с ДНК в начальный момент времени образуется первичный комплекс, в котором аминокислотные остатки образуют систему неспецифических контактов с рибозофосфатным остовом, позволяющую ферменту за счет тепловых движений двигаться вдоль двойной спирали в поиске поврежденного нуклеотида. Известно, что поиск ферментами специфических сайтов в молекуле ДНК происходит путем сочетания одномерной (1D) и трехмерной (3D) диффузии: без диссоциации фермент-субстратного комплекса за счет «скольжения» фермента и небольших «прыжков» по цепи ДНК, и путем множественных актов диссоциации-ассоциации соответственно [21, 23]. Длина участков 1D-диффузии отличается у разных ДНК-гликозилаз. Показано, что урацил-ДНК-гликозилаза UNG между актами диссоциации способна пере-

мещаться на длину, примерно соответствующую четырем нуклеотидам [27]. У 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы hOGG1 это расстояние может составлять от 60 [28] до 400 [29] нуклеотидов. ДНК-гликозилазы Fpg, Nei, Nth и hOGG1 [30–32] в процессе поиска поврежденного участка в молекуле ДНК используют некоторые остатки в качестве детекторов поврежденного участка ДНК. Если в ДНК-связывающем центре фермента оказывается модифицированный нуклеотид, то это приводит к формированию специфических контактов, выворачиванию этого нуклеотида из ДНК-дуплекса, встраиванию модифицированного основания в активный центр фермента и перемещению аминокислотных остатков-детекторов в образовавшуюся полость в ДНК-дуплексе. Такие конформационные перестройки не позволяют ферменту смещаться со специфического сайта на ДНК и заканчиваются формированием каталитически компетентного комплекса. Интересно отметить, что фермент MBD4^{cat}, относящийся вместе с hOGG1 и Nth к структурному семейству ДНК-гликозилаз с мотивом HhH, также встраивает Arg468 и Leu508 в ДНК-дуплекс при образовании каталитического комплекса. Поэтому, эти аминокислотные остатки могут выполнять функцию детекторов в процессе поиска поврежденного нуклеотида.

Сравнение кривых кинетики флуоресценции для 12-, 17- и 28-звенных ДНК-субстратов свидетельствует о том, что с увеличением длины дуплекса происходит замедление фазы уменьшения интенсивности флуоресценции Trp, характеризующей поиск модифицированного основания в процессе скольжения или перепрыгивания MBD4^{cat} по цепи ДНК. С использованием флуоресцентно меченных UaPu₁₇- и FAM-U-BHQ1-субстратов показано, что в первичном комплексе происходят изгибание ДНК-дуплекса и его локальное плавление. В последующий момент времени поврежденный нуклеотид выворачивается из дуплекса, и аминокислотные остатки фермента встраиваются в образовавшуюся полость. Результаты, полученные с использованием флуоресцентно меченного аналога продукта реакции FaPu₁₂, показывают, что встраивание Arg468 и Leu508 в ДНК-дуплекс предшествует фазе роста интенсивности флуоресценции Trp. Встраивание аминокислотных остатков в ДНК обеспечивает специфическое узнавание модифицированного основания. Фаза роста интенсивности флуоресценции Trp характеризует образование каталитически-активного комплекса и во всех случаях заканчивается к 100–200 с, что совпадает с начальным скачком накопления продуктов реакции. Диссоциация комплекса фермента с продуктом реакции является скоростью-лимитирующей стадией всего процесса. Наблюдаемая скорость каталитической реакции заметно увеличивается с увели-

чением длины дуплекса. Это указывает на возможное участие соседних с модифицированным основанием неповрежденных участков ДНК в формировании правильно ориентированной и активной конформации MBD4^{cat}.

Таким образом, впервые в режиме реального времени зарегистрированы конформационные переходы в ферменте MBD4 и ДНК-субстратах в ходе их взаимодействия, установлен кинетический механизм, рассчитаны константы скорости образования и распада промежуточных фермент-субстратных комплексов и определена природа взаимных кон-

формационных перестроек в процессе узнавания повреждения и его удаления.

Работа поддержана программой РАН «Молекулярная и клеточная биология» (№ 6.11), грантами РФФИ (№ 16-04-00037 О.С.Ф., № 15-04-00467 К.А.А., № 15-34-20121 Н.А.К.). За счет средств гранта РФФИ № 16-14-10038 выполнен предстационарный кинетический анализ взаимодействия фермента MBD4^{cat} с ДНК-субстратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zheng G., Fu Y., He C. // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 4602–4620.
- Sjolund A.B., Senejani A.G., Sweasy J.B. // Mutat. Res. 2013. V. 743–744. P. 12–25.
- Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA Repair and Mutagenesis. Washington: ASM Press, 2006. P. 1161.
- Barnes D.E., Lindahl T. // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 445–476.
- Gros L., Saparbaev M.K., Laval J. // Oncogene. 2002. V. 21. P. 8905–8925.
- Zhang W., Liu Z., Crombet L., Amaya M.F., Liu Y., Zhang X., Kuang W., Ma P., Niu L., Qi C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 412. P. 425–428.
- Hashimoto H., Zhang X., Cheng X. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. P. 8276–8284.
- Hill P.W., Amouroux R., Hajkova P. // Genomics. 2014. V. 104. P. 324–333.
- Turner D.P., Cortellino S., Schupp J.E., Caretti E., Loh T., Kinsella T.J., Bellacosa A. // Cancer Res. 2006. V. 66. P. 7686–7693.
- Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Genuardi M., Karbowski M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. // J. Cell Physiol. 2000. V. 185. P. 473–480.
- Morera S., Grin I., Vigouroux A., Couve S., Henriot V., Saparbaev M., Ishchenko A.A. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. P. 9917–9926.
- Manvilla B.A., Maiti A., Begley M.C., Toth E.A., Drohat A.C. // J. Mol. Biol. 2012. V. 420. P. 164–175.
- Petronzelli F., Riccio A., Markham G.D., Seeholzer S.H., Stoerker J., Genuardi M., Yeung A.T., Matsumoto Y., Bellacosa A. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 32422–32429.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 3042–3051.
- Gill S.C., von Hippel P.H. // Anal. Biochem. 1989. V. 182. P. 319–326.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989. P. 1626.
- Kuzmic P. // Anal. Biochem. 1996. V. 237. P. 260–273.
- Kuznetsov N.A., Koval V.V., Zharkov D.O., Vorobiev Y.N., Nevinsky G.A., Douglas K.T., Fedorova O.S. // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 424–435.
- Koval V.V., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // Mutat. Res. 2010. V. 685. P. 3–10.
- Kuznetsov N.A., Vorobjev Y.N., Krasnoperov L.N., Fedorova O.S. // Nucl. Acids Res. 2012. V. 40. P. 7384–7392.
- Halford S.E., Szczelkun M.D. // Eur. Biophys. J. 2002. V. 31. P. 257–267.
- Friedman J.I., Stivers J.T. // Biochemistry. 2010. V. 49. P. 4957–4967.
- Lee A.J., Warshaw D.M., Wallace S.S. // DNA Repair (Amst.). 2014. V. 20. P. 23–31.
- Jean J.M., Hall K.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 37–41.
- Rachofsky E.L., Osman R., Ross J.B.A. // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 946–956.
- Kuznetsov N.A., Kladova O.A., Kuznetsova A.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Zharkov D.O., Fedorova O.S. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 14338–14349.
- Schonhoft J.D., Stivers J.T. // Nat. Chem. Biol. 2012. V. 8. P. 205–210.
- Rowland M.M., Schonhoft J.D., McKibbin P.L., David S.S., Stivers J.T. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. P. 9295–9303.
- Blainey P.C., van Oijen A.M., Banerjee A., Verdine G.L., Xie X.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 5752–5757.
- Kuznetsov N.A., Bergonzo C., Campbell A.J., Li H., Mechetin G.V., de los Santos C., Grollman A.P., Fedorova O.S., Zharkov D.O., Simmerling C. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. 272–281.
- Nelson S.R., Dunn A.R., Kathe S.D., Warshaw D.M., Wallace S.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. P. E2091–2099.
- Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 387–395.

УДК 575.22:595.773.4

Картирование в энхансере En1A *Drosophila melanogaster* модулей, обеспечивающих активацию транскрипции и дистанционное взаимодействие с промотором

Л. С. Мельникова*, Е. А. Померанцева, В. В. Молодина, П. Г. Георгиев

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

*E-mail: lsm73@mail.ru

Поступило в редакцию 23.06.2016

Принято к печати 08.11.2016

РЕФЕРАТ Изучена структура нового энхансера En1A из района 1A X-хромосомы *Drosophila melanogaster*. В составе En1A картированы элементы, один из которых отвечает за активацию транскрипции, а второй – за специфичное взаимодействие с промотором гена *yellow*. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о модульном строении энхансеров, включающих отдельные последовательности, с которыми связываются активаторы транскрипции и особые коммуникаторные элементы, обеспечивающие дистанционные энхансер-промоторные взаимодействия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Drosophila melanogaster*, дистанционные взаимодействия, активация транскрипции, структура энхансеров, ген *yellow*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТФ – транскрипционные факторы; En1A (Enhancer 1A) – энхансер из района 1A хромосомы X; Cm1A (Communicator 1A) – коммуникаторный элемент энхансера En1A; TE (tethering element) – регуляторный элемент в составе промотора, обеспечивающий дистанционное энхансер-промоторное взаимодействие.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из ключевых особенностей энхансеров – способность специфично активировать транскрипцию гена-мишени, иногда удаленного на расстояния, достигающие десятков и даже сотен тысяч пар нуклеотидов [1]. Однако механизмы поддержания специфичных дистанционных взаимодействий между энхансерами и промоторами остаются почти неизученными. Известно, что в ряде случаев в обеспечении коммуникации между энхансером и промотором участвуют *цис*-регуляторные последовательности, найденные в промоторных областях эукариотических генов [2–4]. Полученные нами ранее данные [5] позволяют предположить, что специфичность некоторых энхансеров обеспечивается присутствием в них сайтов связывания факторов транскрипции (ТФ), отвечающих за активацию транскрипции, и сайтов связывания белков, обеспечивающих стабильное дистанционное взаимодействие между энхансером и промотором.

Цель представленной работы состояла в изучении нового энхансера En1A, обнаруженного в ин-

троне неизученного гена CG3777, расположенного на X-хромосоме.

Показано, что энхансер En1A имеет модульное строение. В составе En1A мы обнаружили активаторный и коммуникаторный элементы. Активаторный элемент способен функционально заменять энхансеры тела и крыльев гена *yellow*, т.е. стимулировать транскрипцию в соответствующих кутикулярных структурах. Коммуникаторный элемент необходим для взаимодействия En1A с промотором гена *yellow* и способен обеспечивать дистанционную GAL4-зависимую активацию транскрипции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все конструкции созданы на основе вектора pCaSpeR3, содержащего ген *mini-white*. Производный от pCaSpeR3 плазмидный вектор pCA, содержащий делецию гена *mini-white*, описан ранее [6].

В конструкциях EcoRI–PstI–Y, PstI–PvuII–Y, HindIII–y⁺–Y использованы соответствующие рестрикционные фрагменты химерного элемента из аллеля y⁺. Эти фрагменты были встроены перед

промотором гена *yellow* в положение -343 п.н. (здесь и далее, в том числе на рисунках, нумерация в локусе *yellow* исчисляется по отношению к сайту инициации транскрипции гена) по сайту рестрикции KpnI.

При создании конструкции (a1-a2)Y использована кДНК гена *yellow*, не содержащая интрон и энхансер щетинок (pCaSpeR3-Yil). Фрагмент размером 362 п.н. был амплифицирован с геномной ДНК мух линии y^{+s} с помощью праймеров a1 (5'-CTTTTGCATACACATCCAC-3') и a2 (5'-GCTGATGGAAGTTGCAGA-3') и клонирован в вектор на основе плазмиды pBlueScript между двумя *loxP*-сайтами по EcoRV-сайту (a1-a2/*lox*). Затем фрагмент a1-a2/*lox* клонировали в вектор pCaSpeR3-Yil по KpnI-сайту в положение -343 п.н. Во всех перечисленных конструкциях была делетирована регуляторная последовательность гена *yellow* до -343 п.н. (фрагмент XbaI-Eco47III).

Для получения вектора, не содержащего энхансеры тела и крыльев гена *yellow*, фрагмент XbaI-Eco47III, включающий энхансеры тела и крыльев, был удален из вектора pCA, содержащего полную последовательность гена *yellow* (CA-y (-890)). В конструкциях YG4(Cm1A), eveYG4(Cm1A) и DeveYG4(Cm1A) фрагмент ДНК, содержащий 10 сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4 (две копии по пять сайтов связывания из плазмидного вектора pUAST), был встроены в вектор CA-y (-890) на 3'-конец гена *yellow* по сайту рестрикции SmaI, а фрагмент a1-a2/*lox* – по сайту рестрикции SacI. Замена последовательности -68... +130 п.н в промоторе гена *yellow* на последовательность промотора гена *eve* и получение предпромоторной делеции -69... -100 п.н. описаны ранее [2].

ДНК конструкций и *P*-элемента с дефектными инвертированными повторами *P25.7wc*, использованного как источник транспозазы, инъектировали в линию *yacw*¹¹¹⁸ на стадии пребластодермального эмбриона. Выживших мух скрещивали с линией *yacw*¹¹¹⁸. Трансгенных мух отбирали на основе фенотипического проявления экспрессии генов *white* и *yellow*. Для дальнейшей работы выбрали линии с единственной копией конструкции в геноме, что было подтверждено с помощью Саузерн-блот-анализа. Детали клонирования последовательностей гена *yellow* в состав векторов, молекулярные методы исследования, трансформация эмбрионов и получение трансгенных линий дрозофил, фенотипический анализ экспрессии гена *yellow* в трансгенных линиях, индукция сайт-специфической рекомбинации между сайтами *loxP* и индукция GAL4-зависимой активации в трансгенных линиях подробно описаны в предыдущих работах [2, 5, 6].

Для индукции экспрессии дрожжевого белка GAL4 использовали линию *yw*¹¹¹⁸; *P[w+, tubGAL4]117/TM3, Sb* (Bloomington Center #5138). Для индукции рекомбинации между сайтами *loxP* использовали линию *y ac w*¹¹¹⁸; *Cyo, P[w+, cre]/Sco*. Нуклеотидная последовательность гена CG3777, структура и профиль его экспрессии приведены в базе данных FlyBase (<http://flybase.org/reports/FBgn0024989.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У *Drosophila melanogaster* ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулярных структур – тела, крыльев и щетинок. Энхансеры, контролирующие экспрессию *yellow* в кутикуле тела и крыльях, расположены на 5'-конце гена, тогда как энхансер, контролирующей экспрессию в щетинках, находится в интроне [7]. У мух дикого типа тело, крылья и щетинки имеют темную окраску.

В работах по изучению регуляции транскрипции у *D. melanogaster* в качестве модельной системы часто используется аллель y^2 . В аллеле y^2 между промотором и энхансерами тела и крыльев гена *yellow* встроился ретротранспозон МДГ4 (*gypsy*) [8]. В результате находящийся в составе МДГ4 инсультатор Su(Hw) блокирует активацию гена *yellow* энхансерами тела и крыльев. Таким образом, фенотип y^2 характеризуется желтой окраской тела и крыльев и одновременно темной окраской щетинок.

Супернестабильный аллель y^{+s} (рис. 1А) получен вследствие индукции Р-М гибридного дисгенеза в линии, содержащей мутацию y^2 [9]. Также получены производные аллеля $y^{+s} - y^{2s1}$ и y^{2s2} , содержащие в предпромоторной области гена *yellow* дубликации района 1А хромосомы X [9, 10]. Изучение структуры аллелей y^{2s1} и y^{2s2} позволило идентифицировать в составе дублицированного фрагмента из района 1А регуляторный элемент 1А-RE, который активирует экспрессию *yellow* на большом расстоянии и является инсультатором, специфичным для гена *yellow* [10]. В представленной работе мы продолжили детальное изучение структуры аллеля y^{+s} .

Мутация y^{+s} возникла в результате внедрения химерного элемента размером 5.4 т.п.н. в положение -69 п.н. и одновременной делеции последовательности *yellow* между -146 и -70 п.н. Химерный элемент состоял из *P*-элементов размером 1.2 т.п.н., расположенных «хвост к хвосту», и заключенной между ними последовательности длиной 3030 п.н., представляющей собой дубликацию района 1А хромосомы X, находящегося в геноме дистальнее локуса *yellow* (рис. 1А) [9]. Эта дубликация включала фрагмент неизученного гена CG3777, который экспрессируется на тех же стадиях развития, что и ген *yellow*.

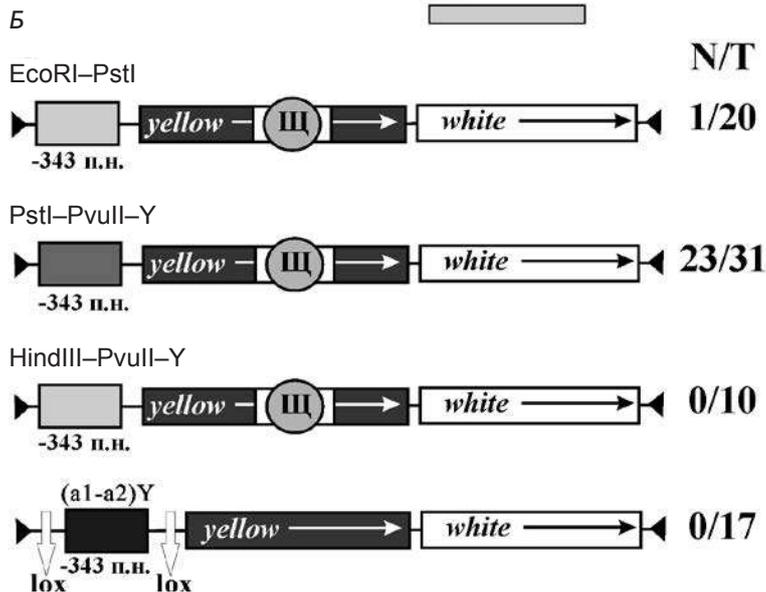
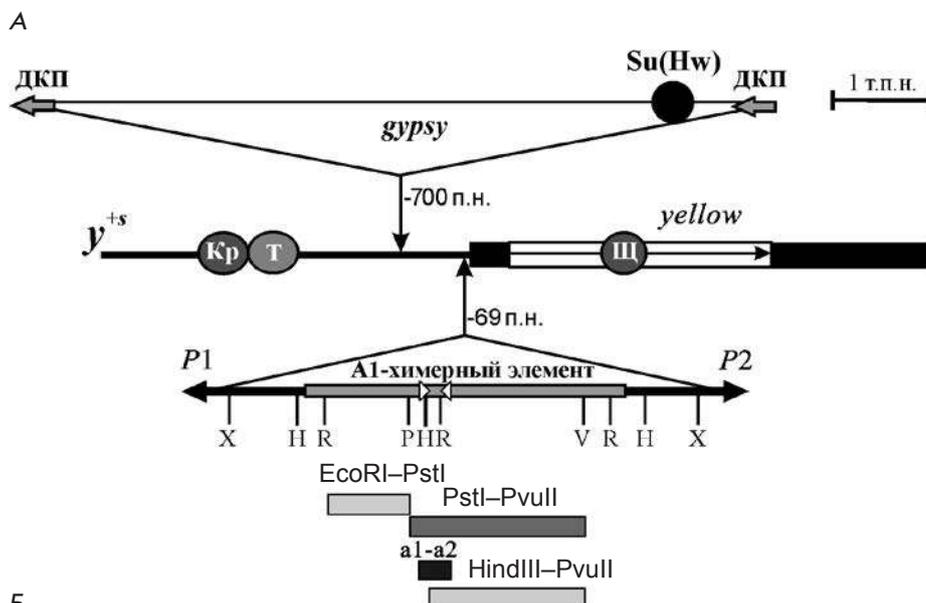


Рис. 1. Картирование нового энхансера En1A из района 1A хромосомы X. А – схематичное изображение локуса *yellow* и структуры аллеля y^{+s} . В гене *yellow* черными прямоугольниками обозначены экзоны, белым – интрон, кружками – энхансеры крыльев (Кр), тела (Т) и щетинок (Щ). Треугольниками показаны инсерции ретро-транспозона *gypsy* и химерного элемента. Длинные концевые повторы на концах ретротранспозона (ДКП) показаны серыми стрелками. Черными стрелками обозначены P-элементы и направление транскрипции гена *yellow*. Внутренняя часть химерного элемента, соответствующая последовательности гена *CG3777*, показана серым прямоугольником. Рестрикционные сайты обозначены символами: R – EcoRI; X – XhoI; P – PstI; H – HindIII; V – PvuII. Белые треугольники – праймеры a1 и a2. Прямоугольники под схемой соответствуют фрагментам химерного элемента в составе трансгенных конструкций. Б – схематическое изображение трансгенных конструкций, включающих фрагменты химерного элемента. Направление транскрипции генов *yellow* и *white* указано стрелками. Концы P-элемента в составе вектора обозначены черными треугольниками. Белые вертикальные стрелки обозначают сайты связывания Cre-рекомбиназы *loxP*. N/T – отношение числа линий мух с темной окраской тела и крыльев к общему числу полученных трансгенных линий соответствующего генотипа

Тело и крылья мух, несущих аллель y^{+s} , имеют темную окраску, близкую по интенсивности к окраске мух дикого типа. Следовательно, при перемещении к гену *yellow* участка из района 1A хромосомы X экспрессия гена в теле и крыльях активирована, несмотря на то, что соответствующие энхансеры заблокированы инсулятором Su(Hw). При помощи трансгенных конструкций (рис. 1Б) в перемещенной последовательности ДНК нам удалось локализовать энхансер размером 1748 п.н., названный энхансер 1A (En1A).

Сначала мы протестировали два рестрикционных фрагмента, которые совместно перекрывают

большую часть дупликации из района 1A: EcoRI-PstI длиной 771 п.н. и PstI-PvuII длиной 1748 п.н. (рис. 1А). В трансгенных конструкциях EcoRI-PstI-Y и PstI-PvuII-Y эти фрагменты находились перед промотором гена *yellow* в позиции -343 п.н. (рис. 1Б). Обе конструкции не содержали энхансеров тела и крыльев. В линиях, несущих конструкцию EcoRI-PstI-Y, в 19 случаях из 20 мухи имели неокрашенные тело и крылья. В трансгенных линиях PstI-PvuII-Y фенотип мух был близок к фенотипу дикого типа в 23 из 31 полученной линии, что доказывает способность фрагмента размером 1748 п.н. функционально заменять энхансеры тела и крыльев гена *yellow*.

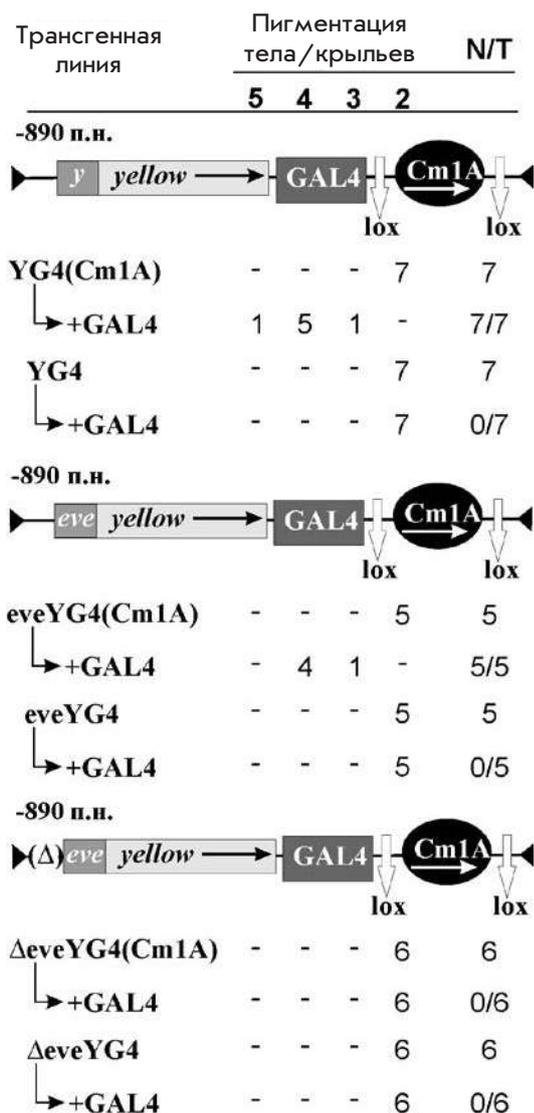


Рис. 2. Тестирование коммуникаторных свойств фрагмента Cm1A. Под схемами конструкций представлены результаты фенотипического анализа мух в трансгенных линиях. Обозначения; *y* – промотор гена *yellow*; *eve* – промотор гена *even skipped*; черный овал – коммуникатор Cm1A. Стрелка внутри овала указывает направление транскрипции. Символ Δ обозначает делецию последовательности гена *yellow* от -69 до -100 п.н. (TE). Пигментация тела и крыльев обозначена цифрами от 5 – темная окраска, как в диком типе, до 2 – желтая окраска, соответствующая фенотипу аллеля *y*². Количество трансгенных линий каждого фенотипа обозначено цифрами. С помощью стрелок и надписи «+GAL4» обозначены производные, полученные в результате активации GAL4 в трансгенных линиях соответствующего генотипа. N/T – отношение линий, в которых фенотип мух изменился после вырезания фрагмента Cm1A или в результате GAL4-активации, к общему числу полученных трансгенных линий. Прочие обозначения, как на рис. 1

Следовательно, энхансер En1A локализован в пределах участка PstI–PvuII.

Для точного картирования En1A созданы две генетические конструкции, содержащие отдельные фрагменты PstI–PvuII, встроенные в положение -343 п.н. – HindIII–PvuII–Y и (a1–a2)Y (рис. 1Б). Фрагмент HindIII–PvuII длиной 1511 п.н. (рис. 1А) не обладал свойствами энхансера: во всех 10 трансгенных линиях HindIII–PvuII–Y тело и крылья мух имели желтую окраску (рис. 1Б). При биоинформатическом анализе структуры последовательности PstI–PvuII был выделен фрагмент размером 362 п.н., включающий повторяющиеся мотивы, которые, возможно, являются сайтами связывания регуляторных белков. Этот фрагмент ДНК был амплифицирован при помощи ПЦП с использованием праймеров a1 и a2, а затем в составе конструкции (a1–a2)Y помещен перед промотором гена *yellow* (рис. 1Б) Фрагмент a1–a2 окружен сайтами узнавания рекомбиназой Cre (*loxP*-сайты), позволяющими вырезать исследуемый элемент *in vivo* [11]. Нужно отметить, что в конструкции (a1–a2)Y кДНК гена *yellow* не содержала энхансер щетинок (рис. 1Б). Мы получили 17 трансгенных линий, несущих данную конструкцию. Несмотря на отсутствие энхансера щетинок, мухи всех линий имели фенотип *y*². Вырезание последовательности a1–a2 приводило к исчезновению пигментации щетинок в 12 линиях из 15. Таким образом, в конструкции (a1–a2)Y изучаемый фрагмент 362 п.н. взаимодействовал с промотором и стимулировал экспрессию *yellow* в щетинках, но не был способен функционально заменить энхансеры тела и крыльев.

Полученные результаты позволили предположить, что энхансер En1A имеет неоднородную структуру. Одна его часть размером 362 п.н. (a1–a2), получившая название «коммуникаторной» (далее Cm1A), самостоятельно стимулирует экспрессию гена *yellow* только в щетинках, однако она необходима для стимуляции полноразмерным En1A экспрессии *yellow* в теле и крыльях. Другая часть последовательности PstI–PvuII размером 1386 п.н. способна индуцировать высокий уровень экспрессии *yellow* в теле и крыльях лишь в комбинации с коммуникаторной частью (рис. 1А,Б). Полноразмерный En1A размером 1748 п.н. активирует транскрипцию гена *yellow* во всех кутикулярных структурах. Возможно, фрагмент 1386 п.н. содержит сайты связывания активаторов транскрипции *yellow* в теле и крыльях, но их взаимодействие с промотором обеспечивают белки, связывающие последовательность Cm1A.

Для дальнейшего изучения коммуникаторных свойств элемента Cm1A мы использовали модельную систему, основанную на свойствах дрожжевого активатора GAL4. Известно, что в геноме дрозофилы

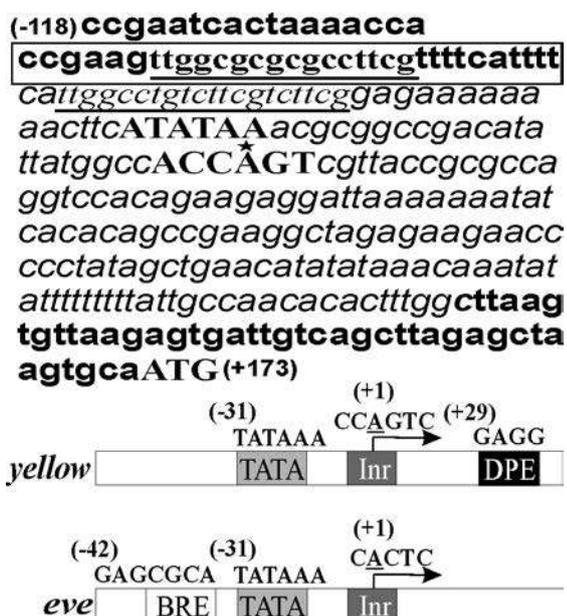


Рис. 3. Промоторные области генов *yellow* и *eve*. В верхней части рисунка показана последовательность промоторной области гена *yellow*. Промотор TATA, инициатор транскрипции и сайт начала трансляции обозначены заглавными буквами. 198 п.н., замененные в конструкциях *eveYG4(Cm1A)* и *DeveYG4(Cm1A)*, обозначены курсивом. Сайт инициации транскрипции указан звездочкой. Возможные последовательности связывания коммуникаторных белков подчеркнуты. Последовательность от -69 до -100 п.н., включающая ТЕ гена *yellow*, заключена в рамку. Цифры в скобках указывают расстояния относительно сайта инициации транскрипции. Коровые элементы промоторов *yellow* и *eve* изображены схематично. Обозначения: стрелки указывают направление транскрипции. TATA – TATA-мотив; Inr – инициатор транскрипции; DPE (downstream promoter element) – нижележащий элемент промотора; BRE (TFIIB binding element) – элемент, связывающий транскрипционный фактор TFIIB. Последовательности коровых элементов промоторов обозначены заглавными буквами

этот активатор способен стимулировать промоторы различных генов [2]. Однако GAL4, расположенный на 3'-конце изучаемого гена, не способен активировать транскрипцию [12]. В конструкции YG4(Cm1A) сайты связывания белка GAL4 и окруженный *loxP*-сайтами потенциальный коммуникатор Cm1A были встроены на 3'-конец гена *yellow*. При этом 5'-последовательность *yellow*, содержащая энхансеры тела и крыльев (до -890 п.н.), была делетирована (рис. 2). В семи трансгенных линиях, несущих конструкцию YG4(Cm1A), мухи имели фенотип u^2 . Таким образом, в отсутствие GAL4-активации фрагмент Cm1A не способен самостоятельно активировать

транскрипцию гена *yellow* в теле и крыльях. Затем мы скрестили трансгенные линии YG4(Cm1A) с линией, экспрессирующей белок GAL4. В результате GAL4-активации тело и крылья мух во всех линиях приобрели более темную окраску (рис. 2). Делеция Cm1A приводила к снижению экспрессии *yellow* до исходного уровня. Следовательно, элемент Cm1A действительно обладает свойствами коммуникатора. В составе конструкции YG4(Cm1A) он обеспечивает стабильное дистанционное взаимодействие между GAL4-активатором и промотором гена *yellow*.

Ранее в промоторной области гена *yellow* в положении -69... -100 п.н. нами был локализован ТЕ, обеспечивающий дистанционные взаимодействия энхансеров тела и крыльев с промотором гена *yellow*, а также с гетерологичным промотором гена *eve* [2]. Мы предположили, что коммуникатор Cm1A функционально взаимодействует именно с ТЕ гена *yellow*. Для проверки этого предположения были созданы конструкции *eveYG4(Cm1A)* и *DeveYG4(Cm1A)* (рис. 2). В обеих конструкциях промотор гена *yellow* был заменен на гетерологичный промотор гена *eve* (-68... +130 п.н.) (рис. 3). Кроме того, в конструкции *DeveYG4(Cm1A)* последовательность ТЕ гена *yellow* была делетирована (рис. 2, 3). Результаты, полученные при фенотипическом анализе пяти трансгенных линий *eveYG4(Cm1A)*, были аналогичны результатам анализа линий YG4(Cm1A). Как и в предыдущем случае, коммуникатор обеспечивал GAL4-зависимую активацию транскрипции гена *yellow*. Поскольку структура промоторов *yellow* и *eve* различна (рис. 3), можно утверждать, что коровые элементы промотора не участвуют в функциональном взаимодействии с Cm1A. В шести трансгенных линиях, несущих конструкцию *DeveYG4(Cm1A)*, активация GAL4 не приводила к изменению исходного фенотипа u^2 (рис. 2). Следовательно, в отсутствие ТЕ гена *yellow* коммуникатор Cm1A не способен поддерживать дистанционное взаимодействие между активатором транскрипции и промотором гена. Вероятно, белки, связывающие коммуникаторный элемент Cm1A, способны взаимодействовать с белками, которые привлекаются на ТЕ гена *yellow*. В описанной модельной системе такое взаимодействие пространственно сближает GAL4-активатор и промотор, что делает возможным контакт между активационным комплексом, собирающимся на последовательностях GAL4, и транскрипционным комплексом промотора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что новый энхансер En1A имеет модульное строение. В предыдущей работе мы доказали, что регулятор-

ная система гена *white* также включает элементы, не влияющие на транскрипцию, но обеспечивающие дистанционное энхансер-промоторное взаимодействие. В предпромоторной области и в составе энхансера глаз гена *white* присутствуют сайты связывания белка Zeste. Белок Zeste не участвует в активации транскрипции, но, связываясь со своими сайтами, позволяет энхансеру глаз активировать находящийся на значительном расстоянии промотор [5]. Результаты данной работы свидетельствуют в пользу предположения, что регуляторные области различных генов имеют модульное строение и включают в свой состав активаторные элементы, с которыми связываются транскрипционные факторы, инициирующие и поддерживающие эффективную транс-

крипцию, и элементы-коммуникаторы, с которыми связываются белки, обеспечивающие пространственное сближение энхансера и промотора. Описанные модельные системы могут использоваться для изучения структуры энхансеров и выявления последовательностей, участвующих в дистанционных взаимодействиях между регуляторными элементами генома.

Коллектив авторов благодарит Е.К. Корягину за техническое участие в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D. // Cell Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 12. P. 2361–2375.
2. Melnikova L., Kostuchenko M., Silicheva M., Georgiev P. // Chromosoma. 2008. V. 117. № 2. P. 137–145.
3. Calhoun V.C., Levine M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 17. P. 9878–9883.
4. Calhoun V.C., Stathopoulos A., Levine M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 26. P. 9243–9247.
5. Kostyuchenko M., Savitskaya E., Koryagina E., Melnikova L., Karakozova M., Georgiev P. // Chromosoma. 2009. V. 118. № 5. P. 665–674.
6. Savitskaya E., Melnikova L., Kostuchenko M., Kravchenko E., Pomerantseva E., Boikova T., Chetverina D., Parshikov A., Zobacheva P., Gracheva E., et al. // Mol. Cell. Biol. 2006. V. 26. № 3. P. 754–761.
7. Geyer P.K., Corces V.G. // Genes Dev. 1987. V. 1. № 9. P. 996–1004.
8. Geyer P.K., Spana C., Corces V.G. // EMBO J. 1986. V. 5. № 10. P. 2657–2662.
9. Georgiev P., Tikhomirova T., Yelagin V., Belenkaya T., Gracheva E., Parshikov A., Evgen'ev M.B., Samarina O.P., Corces V.G. // Genetics. 1997. V. 146. № 2. P. 583–594.
10. Pomerantseva E., Biryukova I., Silicheva R., Savitskaya E., Golovnin A., Georgiev P. // Genetics. 2006. V. 172. № 4. P. 2283–2291.
11. Siegal M.L., Hartl D.L. // Methods Mol. Biol. 2000. V. 136. P. 487–495.
12. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // Development. 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106.

УДК 577.2:616-006:578.828

Антиретровирусная активность нового производного пиримидил-ди(дiazодиспироалкана)

Е. А. Новоселова^{1*}, О. Б. Рябова², И. А. Ленева³, В. Г. Нестеренко¹, Р. Н. Болгарин¹, В. А. Макаров²

¹ ООО «НИАРМЕДИК ПЛЮС», 125252, Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, 12

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биохимии, лаборатория биомедицинской химии, 119071, Москва, Ленинский просп., 33-26

³ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, лаборатория экспериментальной вирусологии, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5

*E-mail: helen.novoselova@gmail.com

Поступило в редакцию 01.02.2017

Принято к печати 16.02.2017

РЕФЕРАТ Синтезирован 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-диаза-6,9-дiazониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетрахлорид дигидрохлорида, соединение, ингибирующее репликацию вирусов различных семейств, использующих гепарансульфатпротеогликаны для прикрепления к клетке хозяина. Это соединение показало высокую эффективность в отношении ряда штаммов ВИЧ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА HIV, ВИЧ, гепарансульфат, диспирозоединения, противовирусная активность.

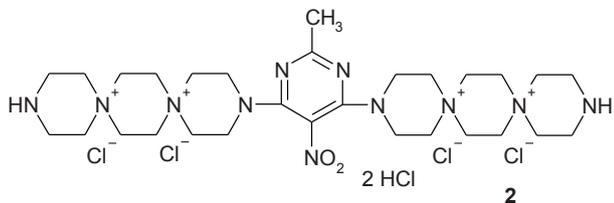
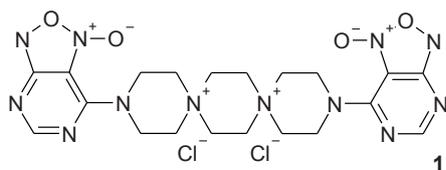
ВВЕДЕНИЕ

Считается, что наиболее перспективным направлением в области поиска как противовирусных, так и противомикробных лекарственных препаратов, является поиск соединений, блокирующих взаимодействие между патогеном и клеткой хозяина. Этот подход имеет ряд преимуществ, особенно в случае противовирусных средств, поскольку активному соединению нет необходимости проникать внутрь клетки, что позволяет резко снизить как цитотоксичность, так и общую токсичность используемого вещества.

Действительно, на первом этапе развития вирусной инфекции происходит адгезия вируса к клетке, что реализуется через связывание специфических вирусных белков с определенными молекулами клеточной поверхности. Наиболее часто адгезия осуществляется за счет специфического присоединения к гепарансульфатпротеогликанам (HSPG), находящимся на поверхности клетки. Известно, что этот механизм используют такие вирусы, относящиеся к разным семействам, как герпесвирусы типа 1 и 2 (HSV-1, -2) [1], папилломавирусы (HPV) [2], цитомегаловирус человека (HCMV) [3], некоторые штаммы вируса иммунодефицита человека (HIV) [4], респираторно-синцитиальный вирус человека (HRSV) [5], вирусы гепатита В и С (HBV и HCV) [6] и др.

Наиболее известным и подробно изученным ингибитором процесса адгезии является N,N-бис(1-оксидо[1,2,5]оксадиазоло[3,4d]пиримидин-7-ил)-3,12-диаза-6,9-дiazониа(5,2,5,2)диспирогексадекана дихлорид **1** (рисунк), ранее синтезированный нами. Показано, что данное соединение **1** и его аналоги, включающие диспиротрипиперазиновый фрагмент, эффективно обратимо связываются с HSPG клетки и таким образом препятствуют прикреплению вирусов [7]. Диспирозоединение **1** ингибирует репликацию у представителей семейства вирусов герпеса [8], а также вирусов других семейств, использующих HS в качестве рецептора либо корецептора [3]. Однако метаболическая нестабильность соединения **1**, обусловленная разложением с выделением оксида азота, не позволила изучить его биологические свойства [9].

Поэтому нами была предпринята попытка получения нового производного диспиротрипиперазиния: проведен дизайн оптимального соединения, способного связываться с известными HSPG с учетом потенциальной метаболической стабильности целевого соединения, и осуществлен синтез 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-диаза-6,9-дiazониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетрахлорид дигидрохлорида **2**. Предполагалось, что диспиропиперазин **2**, представляя собой химически более стабильную структуру, будет так же эффективно бло-



Строение N,N-бис(1-оксидо[1,2,5]окса-
дiazоло[3,4d]-пиримидин-7-ил)-3,12-диаза-6,9-
дiazония(5,2,5,2)-диспирогексадекана дихлорид (1)
и 3,3'-(2-метил-5-нитропиримидин-4,6-диил)бис-3,12-
дiazа-6,9-дiazониадиспиро[5.2.5.2]гексадекан тетра-
хлорид дигидрохлорида (2)

кировать HSPG клетки и тем самым препятствовать адгезии вируса к клетке, что должно привести к нарушению жизненного цикла вируса и снижению его титра.

В настоящей работе мы сообщаем о высокой антиретровирусной активности нового производного диспиротрипиперазина 2, что полностью подтверждает выдвинутую нами гипотезу. В данный момент диспиросоединение 2 проходит углубленные доклинические исследования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили в Национальном институте рака (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, США). Противовирусную активность определяли с использованием ХТТ-теста [10] при различных концентрациях соединения и инкубировании клеток (линии CEM-SS, MT-2, MT-4) в присутствии серийных разведений диспиропиперазина 2 (растворяли в диметилсульфоксиде, DMSO) в течение 6 дней при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ с последующим добавлением реагентов ХТТ. Метод основан на спектрометрическом определении уровня формазана, трансформированного живыми клетками из водорастворимой тетразолиевой соли ХТТ.

Использовали следующие штаммы ВИЧ: эталонный HIV-1 IIIB; чувствительные к азидотимидину HIV-1 6S, HIV-1 RF; лекарственно-устойчивые штаммы HIV-1 N119 (устойчив к невирапину, мутация Y181C), HIV-1 DPS (устойчив к дифенилсульфону, мутация Y181C) и HIV-1 A-17 (устойчив к невирапину, мутации K103N, Y181C). Также ис-

Противовирусная активность диспиропиперазина 2 в отношении различных штаммов вируса

Штамм вируса	Линия клеток	CC ₅₀ , мкМ	IC ₅₀ , мкМ	TI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
HIV-1 6S	MT-2	98.2	1.4	71.4
HIV-1 IIIB	MT-4	200.0	5.7	35.0
HIV-1 RF	CEM-SS	197.0	150.0	1.3
HIV-1 N119	MT-4	200.0	31.7	6.3
HIV-1 DPS	MT-4	200.0	1.2	170.0
HIV-1 A-17	MT-2	79.1	4.7	16.7
HIV-1 A-17	MT-4	200.0	33.7	5.9
HIV-2 ROD	CEM-SS	200.0	13.3	15.0
SIV MAC 251	MT-4	200.0	6.3	31.5

Примечание. CC₅₀ – цитотоксическая концентрация; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; TI – терапевтический индекс.

пользовали штамм HIV-2 ROD и вирус иммунодефицита обезьян SIV MAC 251.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, представленные в таблице, показывают, что синтезированный нами диспиротрипиперазин 2 эффективно ингибирует репликацию HIV-1 и -2 и SIV. При этом, в отличие от полученных ранее данных об активности соединения 1 против вирусов герпеса, наблюдали достаточно широкий диапазон чувствительности HIV и SIV.

Среди проверенных штаммов наиболее чувствительными к ингибирующему действию диспиросоединения 2 оказались HIV-1 6S и HIV-1 DPS – IC₅₀ = 1.37 и 1.17 мкМ соответственно. В отличие от этих штаммов, HIV-1 RF оказался в 100 раз менее чувствительным к исследуемому соединению (IC₅₀ = 150 мкМ).

В отличие от вирусов HSV, где значения IC₅₀ устанавливались в одном диапазоне, как и значения, задаваемые для всех испытываемых штаммов (от 8.2 до 20.4 мкМ), ингибирование репликации HIV сильно зависело от используемых штаммов, где значения IC₅₀ варьировались от 150 мкМ (HIV-1 RF на клеточной линии CEM-SS) до 1.4 мкМ (HIV-1 6S на клетках MT-2). В случае штамма HIV-1 A-17 значения IC₅₀ определяли на разных клеточных линиях, и они варьировали от 33.7 мкМ в линии MT-4 до 4.7 мкМ в линии MT-2.

Столь существенные различия в значениях IC₅₀ (как для одной клеточной линии, но разных штаммов HIV, так и для одного штамма, но на разных клеточных культурах) могут быть обусловлены двумя

причинами. Во-первых, различные клеточные линии могут иметь разную концентрацию поверхностных гепарансульфатпротеогликанов. Во-вторых, достоверно показано, что штаммы ВИЧ значительно отличаются друг от друга по эффективности использования корецепторов (CCR5 и CXCR4) на этапе прикрепления к клетке-мишени [11].

В отличие от вирусов герпеса, структура присоединения HIV при поддержке гепарансульфата до сих пор не получила подтверждения методом рентгеноструктурного анализа, и возможность взаимодействия с клеткой хозяина с использованием гепарансульфатпротеогликанов для HIV известна только по литературным данным.

Предполагается, что новый класс производных пиримидил-ди(diazодиспироалканов) можно будет использовать в качестве противовирусных средств.

На это указывают такие факторы, как специфичность ингибирующего действия, показанная на примере диспиротрипиперазиния **2** в отношении штаммов вирусов; способность диспиросоединений формировать очень стабильные связи с некоторыми вирусными рецепторами или корецепторами; состав с химически определяемой низкой молекулярной массой [7].

Необходимо отметить, что такой механизм действия очень перспективен в плане преодоления резистентности вирусов к официальным лекарственным средствам, так как он воздействует не на сам вирус, а на клетку. Благодаря указанным свойствам соединения данного класса могут служить ценным инструментом для изучения взаимодействий между вирусом и клеткой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shukla D., Spear P.G. // *J. Clin. Invest.* 2001. V. 108. № 4. P. 503–510.
2. Selinka H.C., Giroglou T., Sapp M. // *Virology.* 2002. V. 299. № 2. P. 279–287.
3. Paeschke R., Woskobojnik I., Makarov V., Schmidtke M., Bogner E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 4. P. 1963–1971.
4. Patel V., Ferguson M., Minor P.D. // *Virology.* 1993. V. 192. № 1. P. 361–364.
5. Hallak L.K., Spillmann D., Collins P.L., Peeples M.E. // *J. Virol.* 2000. V. 74. № 22. P. 10508–10513.
6. Jiang Y.F., He B., Ma J., Li N.P., Gong G.Z., Cheng D. // *Acta Gastroenterol. Belg.* 2012. V. 75. № 3. P. 316–321.
7. Schmidtke M., Wutzler P., Makarov V. // *Letts. Drug Design & Discovery.* 2004. V. 1. № 4. P. 293–299.
8. Artemenko A.G., Muratov E.N., Kuz'min V.E., Kovdienko N.A., Hromov A.I., Makarov V.A., Riabova O.B., Wutzler P., Schmidtke M. // *J. Antimicrobial Chemotherapy.* 2007. V. 60. № 1. P. 68–77.
9. Каминка М.Э., Калинин М.А., Пушкина Т.В., Тупикина С.М., Рябова О.Б., Макаров В.А., Граник В.Г. // *Эксп. и клин. фармакол.* 2004. Т. 67. № 3. С. 30–33.
10. Weislow O.S., Kiser R., Fine D.L., Bader J., Shoemaker R.H., Boyd M.R. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1989. V. 81. № 8. P. 577–586.
11. O'Brien S.J., Moore J.P. // *Immunol. Rev.* 2000. V. 177. P. 99–111.

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: $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

ИННОВАЦИОННАЯ РОССИЯ

дискуссионный клуб

Мы формируем диалог между студентами, учеными, преподавателями, бизнесменами, менеджерами, инноваторами, инвесторами, дизайнерами, искусствоведами, архитекторами, фотографами – всеми социально-активными людьми.

Узнай больше
на WWW.STRF.RU

Мы приглашаем на наши мероприятия
всех, кому есть что сказать, кто хочет
поделиться своими идеями



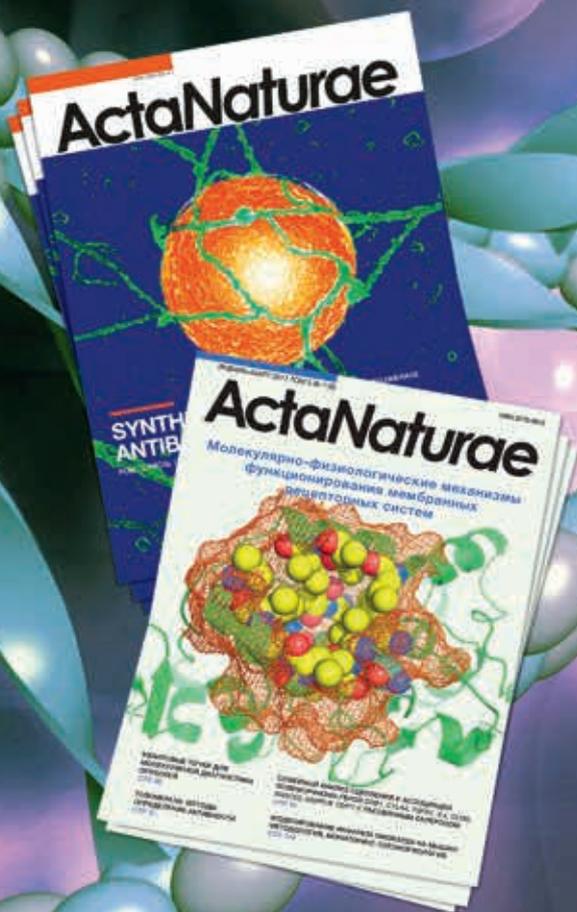
Тел.: +7 (495) 930-87-07, 930 8850
E-mail: seminar@strf.ru

Acta Naturae

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Acta Naturae издается компанией «Парк-медиа» на русском и английском языках и входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Министерства образования и науки РФ и реферативную базу данных PubMed.



ПОДПИСКА В РЕДАКЦИИ:

119234, Москва, Ленинские горы, 1, владение 75Г
Телефон: +7 (495) 930-87-07, 930-88-51
Bio-Mail: podpiska@biorf.ru
Web site: www.actanaturae.ru

ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ

Индексы: 37283, 59881
www.pressa.rosp.ru

ИНФОРМНАУКА

Индекс: 59881
www.informnauka.com

ИНТЕР-ПОЧТА

Индекс: 17510
www.interpochta.ru

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на journal@biorf.ru и звоните по телефону: 8 (495) 930-87-07

