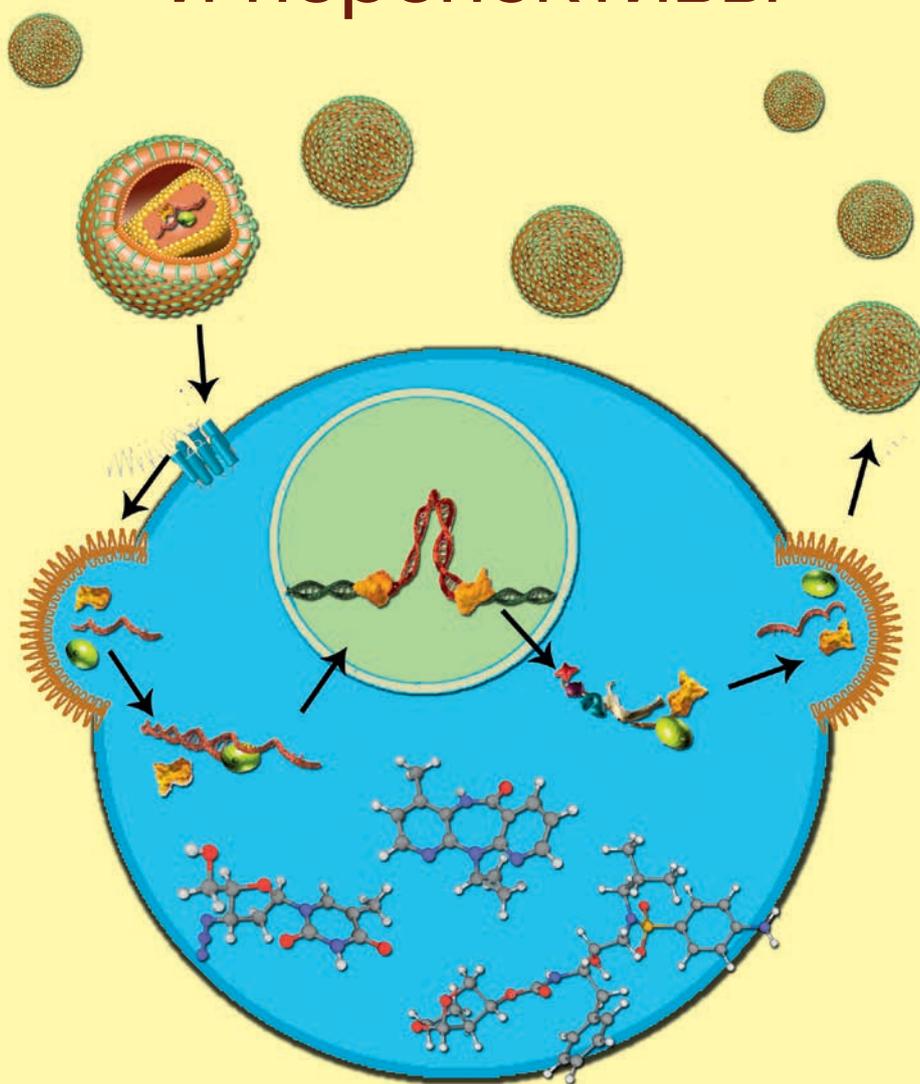


Acta Naturae

Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы



**ОСОБЕННОСТИ
ПРОЦЕССИНГА
ТЕЛОМЕРАЗНЫХ
РНК ДРОЖЖЕЙ И
ЧЕЛОВЕКА
СТР. 16**

**СИНТЕТИЧЕСКИЕ
ФЛУОРОФОРЫ
ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ
БИОМОЛЕКУЛ
В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ
СТР. 37**

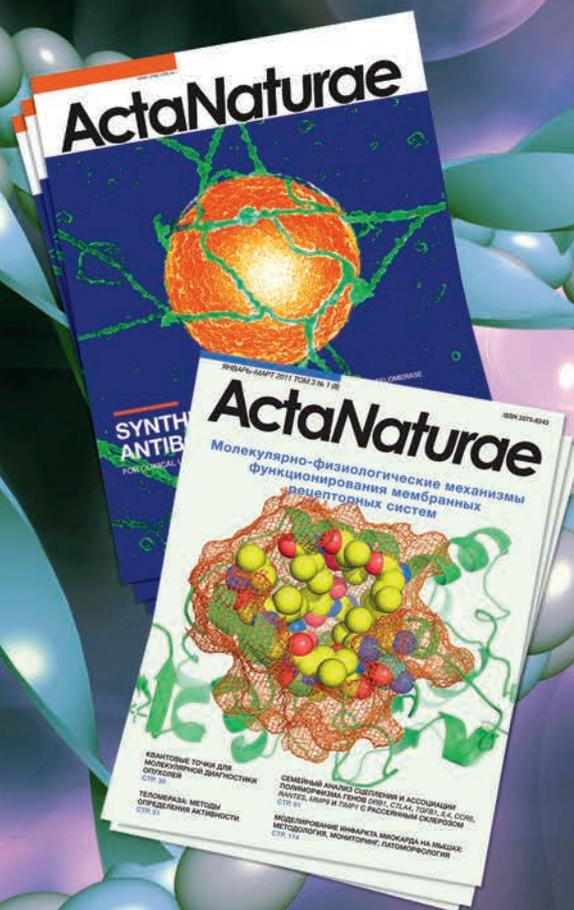
**РОЛЬ БЕЛКОВ
СЕМЕЙСТВА BAR
В РЕГУЛЯЦИИ
ДИНАМИКИ
КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН
СТР. 66**

ПОДПИСКА НА ЖУРНАЛ

ActaNaturae

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@bioif.ru
Web site: www.actanaturae.ru

ПОДПИСКА ПО КАТАЛОГАМ НА ПОЧТЕ И ЧЕРЕЗ ИНТЕРНЕТ:

РОСПЕЧАТЬ
Индексы: 37283, 59881
www.ppressa.rosp.ru

ИНФОРМНАУКА
Индекс: 59881
www.informnauka.com

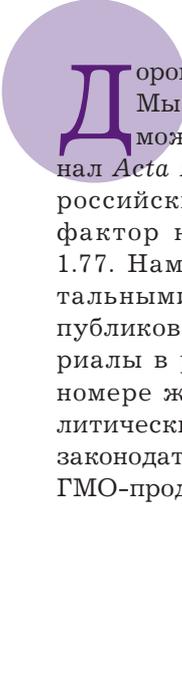
ИНТЕР-ПОЧТА
Индекс: 17510
www.interpochta.ru

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

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



Письмо редакторов



Дорогие читатели!
Мы успешно заканчиваем 2016 год и можем уверенно сказать, что журнал *Acta Naturae* стал одним из ведущих российских научных изданий. Импакт-фактор нашего журнала поднялся до 1.77. Нам удастся наряду с фундаментальными научными исследованиями публиковать и другие интересные материалы в рубрике «Форум». Так, в этом номере журнала мы представляем аналитический обзор, посвященный ревизии законодательной базы в отношении ГМО и ГМО-продукции, а также подходам к оцен-

ке их безопасности и связанных с ними потенциальных рисков.

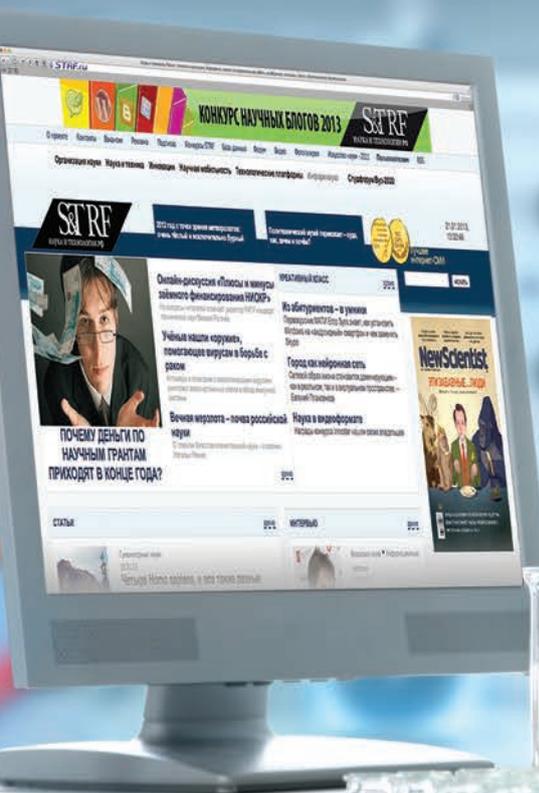
Усилиями редакции разработана и внедряется электронная подача статей и работа с ними, что должно обеспечить новый технологический уровень подготовки и мониторинга публикаций. Мы надеемся, что наш журнал и в дальнейшем сохранит достойные позиции и высокий импакт-фактор благодаря качеству наших публикаций.

С наступающим Новым годом и до новых встреч на страницах *Acta Naturae*!●

Редколлегия

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

Работает при финансовой
поддержке Министерства
образования и науки РФ



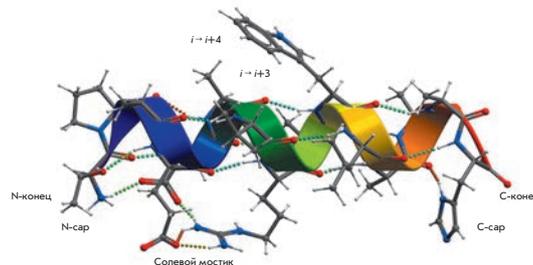
Лучшее российское интернет-СМИ
о науке, образовании, инновациях

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

Дизайн стабильных α -спиральных пептидов и термостабильных белков в биотехнологии и биомедицине

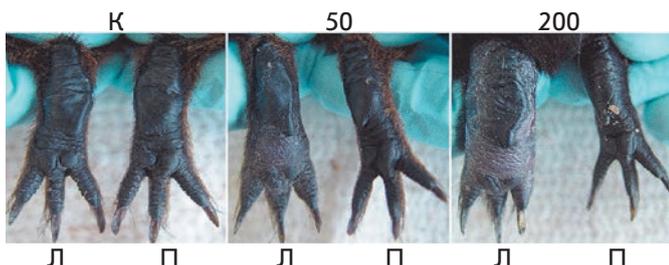
А. П. Якимов, А. С. Афанасьева, М. А. Ходорковский,
М. Г. Петухов

Конструирование высокостабильных α -спиральных пептидов, используемых в качестве высокоактивных и высокоспецифичных ингибиторов межбелковых и других взаимодействий, в последнее время находит все больше практических применений в медицине. В обзоре рассмотрены подходы к увеличению конформационной стабильности α -спиральных пептидов, методы улучшения прохождения пептидов и белков через клеточные мембраны и повышения устойчивости к действию внутриклеточных протеаз.



Структура и факторы, влияющие на конформационную стабильность α -спиралей в белках и мономерных пептидах

Индукцированный адьювантом артрит у морских свинок



Внешний вид задних конечностей морских свинок через 37 сут после инъекции CFA

О. С. Таранов, С. Н. Якубицкий, Т. С. Непомнящих,
А. Е. Нестеров, С. Н. Щелкунов

Предложена модель ревматоидного артрита, индуцируемого у беспородных морских свинок однократной инъекцией полного адьюванта Фрейнда подкожно в стопу задней конечности. Показана высокая воспроизводимость индукции артрита в данной модели. Сделано заключение о перспективности использования этой модели для оценки противоартритных препаратов и схем их применения.

Влияние модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов на активность клеток Пуркинье мозжечка крыс

Т. В. Карелина, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик,
Д. А. Сибаров, С. М. Антонов

Показано, что активаторы SK-каналов NS309 и СуРРА вызывают снижение простых спайков клеток Пуркинье мозжечка крыс. Максимальный эффект не зависел от возраста, но наступал быстрее у старых животных. Выявлено непосредственное действие NS309 и СуРРА на калиевые каналы клеток Пуркинье, что усиливает следовую гиперполяризацию последних и увеличивает интервал между спайками. Применение активаторов SK-каналов, возможно, позволит компенсировать возрастные изменения авторитмических функций мозжечка.

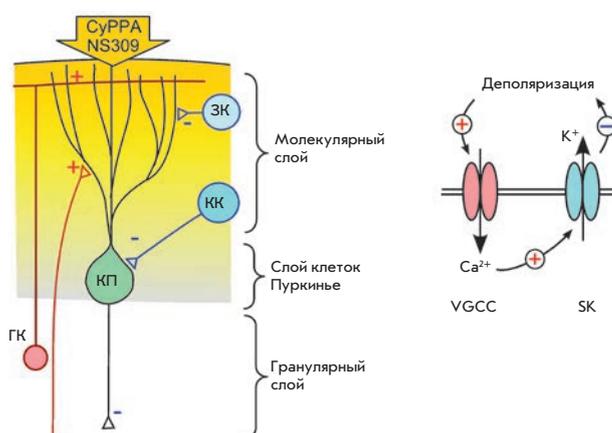


Схема воздействия модуляторов SK-каналов на клетки Пуркинье при аппликации на поверхность мозжечка

Acta Naturae

ТОМ 8, № 4 (31), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2016

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. Исагулянц (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. Шведас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректур: 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, vera.knorre@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, 2016

Номер подписан в печать 5 декабря 2016 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.
Смотрите страницу на сайте ВАК:
http://vak.ed.gov.ru/ru/help_desk

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.770

СОДЕРЖАНИЕ

Письмо редакторов 1

ФОРУМ

И. В. Коробко, П. Г. Георгиев, К. Г. Скрыбин,
М. П. Кирпичников

ГМО в России — наука, общество и закон 6

ОБЗОРЫ

М. П. Рубцова, Д. П. Василькова, Ю. В. Нарайкина,
О. А. Донцова

Особенности процессинга теломеразных РНК
дрожжей и человека 16

М. М. Прокофьева, С. Н. Кочетков, В. С. Прасолов
Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы 26

В. И. Мартынов, А. А. Пахомов, Н. В. Попова,
И. Е. Деев, А. Г. Петренко

Синтетические флуорофоры для визуализации
биомолекул в живых системах 37

Б. С. Шенкман

От медленных к быстрым. Гипогравитационная
перестройка миозинового фенотипа мышечных
волокон 52

СОДЕРЖАНИЕ

Т. Б. Станишнева-Коновалова, Н. И. Деркачева,
С. В. Полева, О. С. Соколова

**Роль белков семейства BAR в регуляции
динамики клеточных мембран 66**

А. П. Якимов, А. С. Афанасьева, М. А. Ходорковский,
М. Г. Петухов

**Дизайн стабильных α -спиральных пептидов
и термостабильных белков в биотехнологии
и биомедицине 77**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Р. С. Есипов, Ю. А. Абрамчик, И. В. Фатеев,
И. Д. Константинова, М. А. Костромина,
Т. И. Муравьева, К. Г. Артемова, А. И. Мирошников

**Каскад термофильных ферментов
как инструмент создания модифицированных
нуклеотидов 89**

Т. В. Карелина, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик,
Д. А. Сибаров, С. М. Антонов

**Влияние модуляторов кальций-активируемых
калиевых каналов на активность клеток
Пуркинье мозжечка крыс 99**

С. Ю. Смирнова, Ю. В. Сидорова, Н. В. Рыжикова,
К. А. Сычевская, Е. Н. Паровичникова, А. Б. Судариков

**Эволюция опухолевых клонов при остром
лимфобластном лейкозе взрослых 108**

О. С. Таранов, С. Н. Якубицкий, Т. С. Непомнящих,
А. Е. Нестеров, С. Н. Щелкунов

**Индукцированный адьювантом артрит
у морских свинок 119**

Е. И. Шрамова, Г. М. Прошкина, С. П. Чумаков,
Ю. М. Ходарович, С. М. Деев

**Индукция фототоксичности
флавопротеида miniSOG посредством
биолюминесцентного резонансного
переноса энергии 127**

Правила для авторов 134

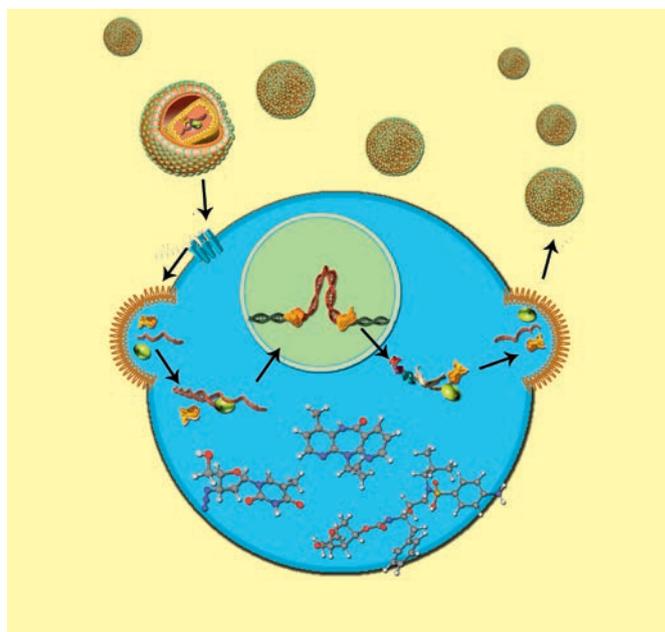


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Прокофьевой и др.)

УДК 577.2, 573.6

ГМО в России – наука, общество и закон

И. В. Коробко^{1*}, П. Г. Георгиев¹, К. Г. Скрябин², М. П. Кирпичников³¹Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

*E-mail: igorvk@igb.ac.ru

Законодательное регулирование в России сегодня катастрофически отстает от уровня развития генной инженерии. Только взвешенный и научно обоснованный подход к позиционированию организмов, полученных с применением различных генно-инженерных технологий, а также к оценке рисков, связанных с ними, позволит эффективно использовать результаты передовых технологий генной инженерии в экономике. В отсутствие востребованности этих результатов в практическом секторе сложившаяся ситуация приведет к отставанию в научных исследованиях и к потере имеющихся сегодня компетенций.

История человечества неразрывно связана с отбором растений и животных, обладающих практически полезными признаками, с целью их хозяйственного использования. С развитием науки методики селекции были адаптированы для ускоренного создания и отбора вариантов с нужными признаками. Появление методов генной инженерии стало очередной вехой на этом пути, позволив сделать качественный скачок от отбора искомым признаков среди случайных генетических изменений к направленному получению организмов с требуемыми свойствами путем внесения направленных модификаций в геном. Развитие технологий направленной модификации генома, помимо возможности создания с высокой эффективностью организмов с требуемыми признаками, открыло возможность получения чужеродных белков и метаболитов для их применения в различных областях,

прежде всего в фармацевтической и пищевой промышленности, ветеринарии и сельском хозяйстве, промышленной биотехнологии и охране окружающей среды.

Важность модифицированных методами генной инженерии организмов, так называемых ГМО, сегодня сложно переоценить – с их помощью обеспечивается производство многих современных лекарственных средств, прежде всего, рекомбинантных белков и вакцин, а также повышается эффективность растениеводства, что позволяет решать продовольственную проблему и т.д. Все большее место в биотехнологии занимают генно-модифицированные (ГМ) животные, используемые в качестве биореакторов для производства рекомбинантных белков [1]. ГМО, помимо промышленного использования, являются незаменимым инструментом в научных исследованиях, начиная с манипуляций с генетическим материалом и заканчивая

моделями заболеваний человека. Таким образом, роль ГМО в современном мире неуклонно возрастает и расширяется. Вместе с этим, все большая значимость ГМО в жизни человека и развитие технологий направленной модификации геномов требуют выработки оптимальных подходов к регулированию обращения и использования в хозяйственном обороте ГМО и продукции, содержащей или полученной с их помощью или с использованием (ГМО-продукция), которые бы обеспечивали, с одной стороны, их эффективное, прежде всего в социальном и экономическом плане, применение, а с другой – безопасность их использования.

Важно отметить, что использование ГМО и ГМО-продукции в хозяйственном обороте и их востребованность непосредственно связаны с возможностью проведения научных исследований в области разработки новых и оптимизации существующих техно-

логий направленной модификации генома, требующих как фундаментальных, так и прикладных исследований, поскольку в случае отсутствия запроса или законодательной невозможности использования ГМО в реальном секторе экономики это направление научных исследований становится неактуальным и стагнирующим. Это, в свою очередь, создает зависимость проведения научных исследований в области трансгенеза и направленной модификации генома от законодательной базы, регулирующей обращение ГМО, и государственной политики в этой области. Развитие биотехнологий является одним из приоритетов для Российской Федерации, что закреплено в Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года, утвержденной в 2012 году, и разработанной на ее основе «дорожной карте» «Развитие биотехнологий и геномной инженерии». Геномная инженерия занимает существенное место в «дорожной карте», включающей в себя комплекс мероприятий, призванных урегулировать существующие противоречия в законодательной сфере, касающейся ГМО, обеспечить эффективную оценку потенциальных рисков, связанных с их использованием, и применение самых современных и безопасных технологий при их создании, что в совокупности должно создать импульс для развития геномной инженерии как в области научных исследований, так и сделать их результаты востребованными в реальном секторе экономики. Благодаря заданному Комплексной программой вектору развития сегодня в Российской Федерации уделяется определенное внимание геномной инженерии в форме финансирования научно-исследовательских программ по ключевым направлениям био-

экономики через программы фундаментальных научных исследований, федеральные целевые программы, гранты научных фондов и другие инструменты. Так, ранее в рамках государственного проекта «Разработка биотехнологий и промышленное освоение производства семенного материала высоких репродукций ГМ сельскохозяйственных растений» впервые в России были созданы биотехнологические сорта (Bt) картофеля отечественной селекции: Елизавета плюс и Луговской плюс, устойчивые к колорадскому жуку. К реальным преимуществам российского Bt-картофеля относятся надежность, рентабельность и простота выращивания, положительный экологический эффект, связанный с отказом от применения инсектицидов. Указанные сорта прошли государственную регистрацию как пищевой продукт (2005 и 2006 гг.) и разрешены для реализации населению в качестве пищевого продукта на территории Российской Федерации; сорта внесены в Государственный реестр охраняемых селекционных достижений (2009 г.) и защищены патентами Российской Федерации [2–10]. В 2015 году Российский научный фонд (РНФ) провел конкурс научных проектов, одним из тематических направлений которого стало создание технологий получения лекарственных препаратов в эукариотических системах, в том числе в растениях и животных – «биофабриках». По результатам конкурса в этом направлении было поддержано три научных проекта, призванных, в том числе, разработать новые подходы в области трансгенеза животных, которые вберут в себя лучшие технологии и принципы в этой области. Это позволит в дальнейшем не только эффективно получать животных, продуцирующих хозяйственно

значимые, прежде всего, для медицинской и фармацевтической промышленности, рекомбинантные белки, но и повысит безопасность этих белков и снизит риски, связанные с их использованием. Эти примеры наглядно иллюстрируют направленность проводимой политики не только на сохранение, но и на развитие компетенции в этой области. Однако в разрез с приоритетами Комплексной программы и мероприятиями «дорожной карты» в существующем законодательном поле вовлечение ГМ-растений и животных в хозяйственный оборот практически невозможно, а ожидаемые изменения в нем и предлагаемые к применению подходы не лишены существенных недостатков. Сохранение подобной ситуации может привести к отсутствию каких-либо практических изменений в этом сегодня страдающем от законодательной неопределенности и стагнирующем секторе экономики, отличительными чертами которого являются высокая технологичность и существенная инновационная составляющая.

ЗАКОНОДАТЕЛЬНАЯ БАЗА В ОБЛАСТИ ГМО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На сегодняшний день в Российской Федерации обращение ГМО регулируется Федеральным законом от 05 июня 1996 года № 86-ФЗ (ред. от 19 июня 2011 года) «О государственном регулировании в области геномной инженерии деятельности» (далее – «86-ФЗ») и постановлением Правительства Российской Федерации от 16 февраля 2001 года № 120 «О государственной регистрации геномно-инженерно-модифицированных организмов». Кроме того, порядок обращения ряда видов ГМО-продукции, в частности, пищевой продукции, кормов и кормовых добавок, регулируется национальными норма-

тивными документами или вновь вводимыми нормативными актами Таможенного союза, например, такими, как Технические регламенты Таможенного союза ТР ТС 021/2011, ТР ТС 022/2011, ТР ТС 027/2012, ТР ТС 029/2012 в отношении пищевой продукции и ее маркировки. Однако механизмы государственной регистрации ГМО, предназначенных для выпуска в окружающую среду, подзаконные акты и нормативные документы, регламентирующие процесс их регистрации, отсутствуют. В таких условиях возникает ситуация, фактически исключающая возможность разведения и выращивания ГМО, например, сельскохозяйственного назначения. Кроме того, за время, прошедшее с момента принятия 86-ФЗ, технологии генной модификации претерпели существенные изменения – появились методы, позволяющие вносить желаемые изменения в геном организма без появления в нем «чужих» для организма последовательностей ДНК (так называемое «бесшрамное» редактирование генома), такие, как CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), ZFN (Zinc Finger Nucleases) [11–14]. Также происходит сдвиг от ГМО 1-го и 2-го поколений, отличительной чертой которых является присутствие в организме-реципиенте чужеродного генетического материала, к организмам, относимым к ГМО поколений 3–4, которые не содержат в своем геноме чужеродного генетического материала. Эти тенденции, несомненно, требуют явного отражения и однозначного позиционирования в законодательстве.

Ситуацию с фактической невозможностью государственной регистрации и получения разрешения на выращивание и разведе-

ние ГМО призвано исправить постановление Правительства Российской Федерации от 23 сентября 2013 года № 839 «О государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, полученной с применением таких организмов или содержащей такие организмы» (далее – «Постановление № 839»), вступающее в силу 01 июля 2017 года. Постановление № 839 регламентирует процедуры государственной регистрации и получения разрешения на целевое использование ГМО, предназначенных для выпуска в окружающую среду, а также продукции, содержащей или полученной с использованием таких организмов, и отменяет действие постановления Правительства Российской Федерации от 16 февраля 2001 года № 120. Постановление № 839 дифференцирует ГМО на основании их целевого использования с требованием проведения актуальных для каждого вида целевого использования экспертиз, порядок которых должен быть разработан соответствующими органами исполнительной власти. Однако уже сегодня очевидно, что содержащийся в Постановлении № 839 перечень целевых использований ГМО, включающий в себя производство лекарственных средств для медицинского применения, медицинских изделий, продовольственного сырья и пищевых продуктов, кормов и кормовых добавок для животных, лекарственных средств для ветеринарного применения, а также разведение и (или) выращивание на территории Российской Федерации модифицированных растений и животных, микроорганизмов для сельскохозяйственного назначения, не является исчерпывающим, что может в будущем созда-

вать проблемы при практическом использовании ГМО в определенных областях. Так, уже сегодня проводятся полевые испытания ГМ-комаров, предназначенных для элиминации переносимых комарами заболеваний, в частности, лихорадки Денге [15–17]. Очевидно, что ни одно из поименованных в Постановлении № 839 целевых назначений ГМО не охватывает этого примера, который может быть классифицирован как «модификация окружающей среды». Также Постановление № 839 не предусматривает возможности проведения регистрации ГМО и ГМО-продукции в таком динамично развивающемся и экономически значимом секторе, как техническое использование, например, полученного из ГМО биотоплива, ГМ-хлопка и т.п.

Постановление № 839 предусматривает государственную регистрацию ГМО в связке с получением разрешения на его целевое использование. То есть, в случае отказа в разрешении на использование ГМО его регистрации не происходит, и внесение такого организма в реестр ГМО не предусматривается. Вместе с тем, авторы полагают, что одной из насущных задач в области регулирования обращения ГМО в Российской Федерации является сбор информации о ГМО, которые потенциально могут быть использованы в хозяйственном обороте (даже в случае отсутствия разрешения на их использование), позволяющей проводить их однозначную идентификацию и, при необходимости, мониторинг. В отсутствие учета ГМО, не одобренных по каким-либо причинам к использованию (например, из-за недостаточности предоставленной информации), возникает риск их несанкционированного применения без технической возможности идентификации таких ГМО и выявления фактов их использова-

ния. В связи с этим целесообразно ввести учет линий ГМО (например, в виде единого реестра таких организмов), предполагающий сбор данных о ГМО, особенностях их генетических модификаций и методов мониторинга вне зависимости от результатов государственной регистрации.

К возможным недостаткам процедуры регистрации ГМО следует отнести проведение экспертизы заключения о результатах молекулярно-генетического исследования ГМО несколькими различными федеральными органами исполнительной власти в зависимости от целевого назначения организма. Таким образом, в зависимости от целевого использования ГМО и ответственного за его регистрацию органа объемы молекулярно-генетических исследований ГМО могут различаться. Несомненно, объемы и содержание молекулярно-генетических исследований ГМО должны учитывать специфику типа ГМО, особенности его использования и целевое назначение, но рационально их гармонизировать и унифицировать для различных видов целевого использования, а экспертизу результатов молекулярно-генетических исследований отнести на унифицированный этап включения информации о ГМО в единый реестр в рамках регистрационного процесса вне зависимости от целевого назначения организма и разрешения на его использование.

Наконец, Постановление № 839 предусматривает проведение государственной регистрации только ГМО, предназначенных для выпуска в окружающую среду. В то же время Постановление № 839 (а также Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» в отношении пищевой продукции) требует государственной регистрации

ГМО как обязательное условие для регистрации полученной с его использованием продукции вне зависимости от того, где происходит выращивание и разведение ГМО – в окружающей среде или изолированно от нее (в закрытой системе, обеспечивающей отсутствие контакта ГМО с окружающей средой). Таким образом, при выращивании и разведении ГМО в закрытой системе без выпуска в окружающую среду содержащая его или полученная с его использованием продукция не может быть зарегистрирована в связи с отсутствием механизма государственной регистрации ГМО, не предназначенных для выпуска в окружающую среду. Таким образом, уже сегодня возникает необходимость определения в законодательном поле механизмов государственной регистрации ГМО, не предназначенных для выпуска в окружающую среду, но используемых для производства продукции.

Третий «кит» в законодательстве в области ГМО, наряду с ФЗ-86 и Постановлением № 839, – Федеральный закон от 3 июля 2016 года № 358 «О внесении изменений в отдельные законодательные акты РФ в части совершенствования государственного регулирования в области генно-инженерной деятельности» (далее – 358-ФЗ). Недавно принятый 358-ФЗ предусматривает полный запрет на выращивание и разведение ГМ-растений и животных, за исключением их выращивания и разведения для проведения научных исследований и экспертиз. Следует отметить, что настоящий запрет распространяется только на ГМ-растения и животных, «генетическая программа которых изменена с использованием методов генной инженерии и которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого не может являться результатом

природных (естественных) процессов» (358-ФЗ, статья 4). Таким образом, ГМО 3-го и 4-го поколений, изменения в геномах которых в принципе могут произойти и естественным путем, без использования методов генной инженерии, не попадают под этот законодательный запрет, что делает еще более актуальной необходимость ясного законодательного определения статуса таких организмов и содержащей или полученной с их помощью или с их использованием продукции.

Несмотря на то что часть получаемых с использованием методов генной инженерии организмов не попадают под запрет 358-ФЗ, введение запретительных мер может негативно повлиять на развитие этого сектора экономики, являющегося драйвером инновационного развития. Сложившаяся ситуация усугубляется отсутствием запретительных мер в отношении ГМО-продукции в условиях запрета на выращивание и разведение ГМ-растений и животных, что в случае вынужденной необходимости использования ГМО-продукции растительного и животного происхождения создает риск попадания в полную зависимость от внешних источников ГМО.

Введенный запрет на разведение и выращивание ГМ-растений и животных также может оказать негативное влияние на проведение (и соответственно финансирование) интенсивных научных исследований в области трансгенеза растений и животных как фундаментальных, так и направленных на трансфер их результатов в прикладную область. В такой ситуации Российская Федерация может очень быстро потерять свои позиции и компетенции в этой области, окончательно попадая в полную зависимость от внешних источников ГМО. В частности, запрет, в слу-

чае его введения, исключит возможность получения лекарственных (и других) белков в молоке ГМ-животных, что, по мнению авторитетной в области аналитики компании RAND Corporation, является одним из актуальных трендов в биотехнологии, бионотехнологии и биомедицинских науках на период до 2020 года [18], что действительно подтверждается присутствием на рынке лекарственных препаратов ATryn® и Ruconest® на основе рекомбинантных белков человека – антитромбина III и ингибитора С1-эстеразы, получаемых в молоке ГМ-коз и ГМ-кроликов соответственно [1].

ЧТО ТАКОЕ ГМО!

Понятие «ГМО» является краеугольным камнем для всей области, поскольку непосредственно определяет объект регулирования. Сегодня 86-ФЗ определяет ГМО как «организм или несколько организмов, любое неклеточное, одноклеточное или многоклеточное образование, способные к воспроизводству или передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов». Данное определение, с одной стороны, слишком широкое, и, в соответствии с ним, к ГМО следует относить, например, плазмиды (которые являются векторами), воспроизводство которых возможно только при наличии специфических клеток-хозяев. С другой стороны, требование к воспроизводству и способности передачи генетической информации выводит из-под определения ГМО, например, бесплодные организмы, являющиеся гибридами фертильных ГМО. В то же время перемещение генетической моди-

фикации на фон нового генотипа, возникающего в результате гибридизации, может влиять на ее проявления и требует отдельной оценки безопасности и рисков, связанных с ее использованием. Поэтому понятие «ГМО» должно включать в себя и такие организмы. Наконец, с появлением возможности модификации организмов без внесения в их геном ДНК другого вида – с использованием технологий «бесшрамного» направленного редактирования генома, возникает необходимость определения и их правового статуса. Подобные организмы, относимые к ГМО поколений 3–4 (см. ниже в разделе «Классификация ГМО»), действительно являются продуктом генно-инженерной деятельности. Однако такие организмы потенциально могут быть получены и с использованием классической селекции, что означает принципиальную эквивалентность проведенных манипуляций естественным процессам и научно обосновывает неотнесение таких организмов к ГМО. Наряду с этим, ГМ-происхождение таких организмов невозможно доказать объективными методами, в отличие от «классических» ГМО поколений 1–2, которые содержат в своем геноме чужеродную ДНК, присутствие которой служит доказательством проведенных генно-инженерных манипуляций. Очевидно, что принципиальная невозможность объективного доказательства создания таких организмов с применением методов генной инженерии может приводить к юридическим коллизиям. В свете вышесказанного, организмы, полученные с использованием генно-инженерных манипуляций, но не содержащие чужеродной ДНК, рационально позиционировать в правовом поле так же, как организмы, полученные с помощью селекции, а к ГМО следует

относить только организмы, которые в результате генно-инженерных манипуляций несут в своем геноме «чужеродную» ДНК. К этому же мнению склоняется и международное научное сообщество [19].

Таким образом, сегодня возникает необходимость корректировки понятия «генно-инженерно-модифицированный организм», призванное, с одной стороны, исправить недостатки существующего определения (как его избыточность, так и недостаточность), проиллюстрированные выше, а с другой – однозначно определить в правовом поле место организмов, полученных с использованием методов генной инженерии, появление которых, однако, может быть результатом естественных (природных) процессов. 358-ФЗ, делающий исключение для организмов, генетическая программа которых изменена с использованием методов генной инженерии, которые содержат генно-инженерный материал, внесение которого может быть результатом природных (естественных) процессов, неявным образом не относит такие организмы к ГМО, что, однако, требует закрепления в нормативных актах явным образом. Учитывая вышесказанное, ГМО могут быть определены как «организмы, не имеющие клеточной структуры, одноклеточные или многоклеточные образования, полученные с применением методов генной инженерии и содержащие последовательности ДНК, которые не могут появиться в результате естественных половых процессов и процессов горизонтального переноса генетического материала с участием организмов, не являющихся ГМО, и/или рекомбинационных процессов или мутаций (делеций и инсерций собственного генетического материала, точечных замен нуклеотидов, хромосомных перестроек)».

Иные организмы, полученные с применением методов геной инженерии, к ГМО не относятся.

БЕЗОПАСНОСТЬ ГМО

Одним из факторов, ограничивающих использование ГМО, является вопрос их безопасности. Безопасность ГМО и ГМО-продукции можно разделить на безопасность для потребителя и безопасность для окружающей среды.

Сегодня существует мнение, в первую очередь, относящееся к пищевой продукции, что введение генетической модификации делает продукцию, содержащую или полученную с использованием ГМО, априори опасной для здоровья человека. Однако ни в одном исследовании не выявлены негативные эффекты пищевой ГМО-продукции, обусловленные генетической модификацией. Те же опубликованные результаты исследований, которые якобы доказывают опасность ГМО-продукции и приводятся в качестве аргументов, при детальном анализе показывают свою научную и методическую несостоятельность и соответственно необоснованность сделанных выводов [20]. Действительно, само по себе присутствие чужеродной организму-реципиенту ДНК в пищевой ГМО-продукции никак не может повлиять на безопасность его употребления в пищу: во-первых, отсутствие переноса ДНК в организм млекопитающих при попадании в организм через пищевой тракт показано экспериментально [21], во-вторых, человек постоянно с пищей употребляет огромные количества чужеродной для него ДНК растений и животных, однако ее горизонтального переноса не наблюдается.

Интересно отметить, что в действительности человек употребляет в пищу ГМО уже на протяжении нескольких тысячелетий,

как это выявили недавние научные исследования. А именно, анализ генома окультуренного по меньшей мере 8000 лет батата выявил в нем две модификации последовательностями генома агробактерий, одна из которых, как полагают авторы, и привела к появлению полезных признаков, ставших основанием для выбора именно этой разновидности батата для окультуривания [22]. При этом векторы на основе генетических элементов агробактерий широко используются в качестве одного из инструментов современной геной инженерии при получении ГМ-растений [23]. Таким образом, уже многие тысячелетия человек употребляет в пищу созданное природой ГМ-растение, что наглядно доказывает отсутствие негативного влияния генетических модификаций как таковых на здоровье человека в отношении самого «чувствительного» с точки зрения общества целевого применения ГМО – использования в качестве пищевой продукции.

Учитывая вышесказанное, единственной опасностью для потребителя со стороны продукции, содержащей или полученной с использованием ГМО, является опасность, связанная со свойствами, приобретенными организмом в результате генетической модификации. Однако эти риски должны оцениваться на общих основаниях в соответствии с существующими правилами и нормами для аналогичной новой не-ГМО-продукции, которой они также присущи в полной мере [24]. В качестве наглядного примера рисков, связанных с использованием организмов, полученных в результате классической селекции, можно привести сорт картофеля *Lenape*, выведенного с рынка из-за повышенного уровня токсических соединений, попутно и неконтролируемо возникшего в процессе селекции [25].

Таким образом, риски, связанные с генетической модификацией в геноме ГМО *per se*, отсутствуют, в то время как полученные не-ГМ-организмы, как и ГМО, могут быть небезопасными.

КЛАССИФИКАЦИЯ ГМО

Классификация ГМО имеет большое практическое значение, поскольку в зависимости от специфических особенностей необходимо дифференциально подходить и к оценке связанных с ГМО и ГМО-продукцией рисков, а также к вопросам их мониторинга.

Одной из распространенных на сегодняшний день является классификация ГМО по поколениям, применимая в основном, в силу исторических причин, к ГМ-растениям (и в полной мере может быть применена к ГМ-животным). К ГМО 1-го поколения относят организмы, несущие в своем геноме трансген, включающий последовательности ДНК таксономически иного вида. ГМО 2-го поколения аналогичны ГМО 1-го поколения, но несут несколько полученных в результате генно-инженерных модификаций признаков, и могут быть получены, например, в результате скрещивания двух ГМО 1-го поколения. В силу присутствия в геноме таких организмов ДНК таксономически отличных организмов ГМО 1-го и 2-го поколений могут быть идентифицированы на основании этого признака [26]. Кроме того, присутствие чужеродных последовательностей ДНК рассматривается как неоспоримый признак получения подобных организмов в результате генно-инженерных манипуляций. Ситуация в корне отлична для организмов, относящихся к 3-му и особенно к 4-му поколениям, которые являются почти интрагенными (т.е. содержат последовательности ДНК, происходящие из собственно-

го генома, с минимальными модификациями), инtragenными и *цис*-генными (модифицированные исключительно с использованием собственного аутентичного генетического материала) организмами [26]. Качественное отличие таких организмов от ГМО 1–2 поколений – принципиальная возможность их возникновения естественным путем или в ходе селекционного отбора в результате мутаций и хромосомных перестроек. Это, в свою очередь, сопряжено с невозможностью объективного доказательства получения таких организмов с применением методов генной инженерии. В связи с вышесказанным организмы 3-го и 4-го поколений целесообразно позиционировать в том же правовом поле, что и организмы, полученные в результате селекции.

Разделение ГМО на первые два поколения имеет минимальное значение для оценки их безопасности, потенциальных рисков использования и необходимых ограничений, указывая лишь на необходимость выявления более чем одного трансгена у ГМО 2-го поколения при их идентификации и мониторинге. На наш взгляд, существенно более значимыми с практической точки зрения в классификации ГМО и содержащей или полученной с их использованием продукции являются такие признаки, как:

выращивание и разведение в закрытой (т.е. не предполагающей контакта ГМО с окружающей средой) или открытой системе;

содержание в продукции самих ГМО, жизнеспособных или инaktivированных;

присутствие в продукции генетического материала ГМО или его отсутствие.

Вышеперечисленные параметры позволяют предложить оптимальные, не содержащие избыточных требований, принципы

молекулярно-генетической характеристики ГМО и оценки рисков, связанных с использованием ГМО и ГМО-продукции.

ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ГМО И ГМО-ПРОДУКЦИИ

ГМО, выращивание и разведение которых осуществляется в закрытой системе

ГМО этого типа в принципе не взаимодействуют с окружающей средой, а контакт с человеком лимитирован производственным процессом и персоналом, осуществляющим его. В связи с этим необходимость оценки дефинитного взаимодействия ГМО с окружающей средой и связанных с этим потенциальных рисков существует только в отношении отходов производства. Потенциальные риски для производственного персонала в данном случае рационально приравнивать к рискам, присутствующим работе с аналогичными не-ГМ-организмами, с дополнительной оценкой возможных рисков, связанных с генетической модификацией с учетом возникающих в процессе производства контактов персонала с ГМО. Учитывая возможность непреднамеренного высвобождения ГМО в окружающую среду в случае форс-мажорной ситуации, для ГМО этого типа должны быть разработаны методы однозначной идентификации и мониторинга, основанные на детекции уникального трансгена, и меры по ликвидации последствий такого высвобождения. В то же время обязательная необходимость описания трансформационного события для ГМО этого типа (в случае трансформационного события, под которым понимается интеграция трансгена в определенное место генома организма-реципиента) должна зависеть от типа конечной ГМО-продукции (см. ниже).

ГМО, которые выращивают и разводят в открытой системе

Для ГМО этого типа необходимо оценивать потенциальные риски, связанные с их взаимодействием с окружающей средой и возможным влиянием на нее. Эти риски можно разделить на две группы – связанные с новыми приобретенными свойствами организма, а также с естественными свойствами организма-реципиента при его интродукции в несвойственную ему экосистему, и возникающими из-за возможного неконтролируемого распространения генетической модификации в экосистеме. Для оценки рисков первой группы рациональным подходом могло бы стать применение подходов, методик и критериев, используемых при анализе влияния на окружающую среду аналогичных не-ГМ-организмов. Такая оценка могла бы учитывать и риски, возникающие в связи с продукцией ГМ-организмом несвойственных организму-реципиенту белков и метаболитов благодаря генетической модификации. Однако в настоящее время проведение экологической экспертизы для новых сортов растений и пород животных не предусмотрено, а опыт экологической экспертизы с целью определения рисков при интродукции новых видов ограничен, что не позволяет эффективно применить этот подход на практике и требует разработки научно обоснованных стандартизованных методик экологической экспертизы, в равной степени применимых и к не-ГМ-организмам. Действительно, вне зависимости от того, является ли приобретенная устойчивость организма к каким-либо факторам окружающей среды (например, патогенам) результатом генно-инженерных манипуляций или возникла в процессе селекции, экологические риски при выпуске в окружающую среду эк-

вивалентны и требуют оценки как для ГМО, так и для организмов, полученных в результате селекции. При этом в случае экологической экспертизы организма с новыми свойствами целесообразно проводить сравнительный анализ с воздействием на окружающую среду организма-аналога (для ГМО – организма-реципиента).

В случае ГМО возникает необходимость дополнительной оценки специфических рисков, возникающих в связи с присутствием в геноме трансгена. К таким рискам можно отнести риски неконтролируемого горизонтального или вертикального переноса трансгена (следует отметить, что риск неконтролируемого распространения признаков, приобретенных в результате классической селекции, например, устойчивости к патогенам или насекомым-вредителям, абсолютно идентичен, однако не подлежит анализу в рамках действующих правил). Оценку таких рисков (неконтролируемого переноса трансгена) рационально проводить с учетом специфики ГМ-организма и способа генетической модификации. Так, например, для ГМ-животных риск горизонтального переноса интегрировавшегося в геном трансгена, как правило, исключен, однако должен быть оценен риск вертикального переноса в результате близкородственного скрещивания. В случае ГМ-микроорганизмов, наоборот, при их выпуске в окружающую среду необходимо оценивать риск горизонтального переноса. Во избежание субъективности со стороны экспертизы объемы исследований при оценке рисков горизонтального и вертикального переноса следует максимально стандартизировать в зависимости от таксономического типа ГМО и его предполагаемого использования.

В соответствии с Постановлением № 839, определяющим (и единственным) фактором при принятии решения о выпуске в окружающую среду ГМО является его безопасность (исключение составляют только ГМО, предназначенные для использования в производстве лекарственных средств и медицинских изделий). В то же время любые новые свойства организма, вне зависимости от способа их получения, априори могут быть факторами риска в силу невозможности исчерпывающего анализа их влияния на окружающую среду, что потенциально является основанием для безусловных запретительных мер, полностью исключающих любые возможные риски. В связи с этим, решение о целесообразности выращивания и разведения ГМО должно приниматься не только на основании выявленных или вероятных рисков экологического характера, но и с учетом анализа иных факторов – технологических, социально-экономических и т.д., и опираться на интегральный многофакторный анализ «риск–польза (преимущества)».

Для ГМО, которые выращивают и разводят в открытой системе, в частности, для ГМ-растений и животных, необходима не только разработка метода их однозначной идентификации с целью мониторинга в окружающей среде, но и определение события трансформации (при его наличии). Трансформационное событие уникальным образом идентифицирует линию ГМО и позволяет дифференцировать ее от сходных линий, несущих тот же трансген. В этом случае выявление трансформационного события может использоваться и в качестве уникального идентификатора ГМО.

ГМО-продукция

К оценке безопасности ГМО-продукции также целесообразно

подходить дифференцированно, с учетом специфических рисков, которые могут быть присущи выделенным в предыдущем разделе типам. При этом общий подход к оценке безопасности ГМО-продукции должен базироваться на принципах и методах, аналогичных для не-ГМО-продукции, с дополнением оценки специфических рисков, возникающих из-за присутствия трансгена.

Как отмечено выше, на наш взгляд, целесообразно выделить три типа ГМО-продукции для целей регулирования. Первый тип – «продукция, полученная с применением ГМО» – представляет собой продукт переработки ГМО или продуктов его жизнедеятельности, или продукт жизнедеятельности ГМО, не предполагающий присутствия генетического материала ГМО, максимально допустимые остаточные количества которого подлежат контролю. Примерами такого типа ГМО-продукции являются рекомбинантные белки, целевые метаболиты (например, аминокислота) и т.п. По сравнению с аналогичной продукцией, полученной с использованием не-ГМ-организма, для такой продукции отсутствуют дополнительные риски, связанные с ее ГМ-происхождением, по причине отсутствия ДНК в продукте. В силу этого обстоятельства подобная продукция может и должна рассматриваться как не-ГМО-продукция. Единственный дополнительный контролируемый параметр ее качества – отсутствие генетического материала по аналогии с принципами, применяемыми в области производства и контроля качества лекарственных средств, предполагающими содержание остаточной ДНК продуцента в количествах, не превышающих установленных пределов. Из соображений достаточности для ГМО, используемых при производстве продукции этого

типа, разводимых и выращиваемых в закрытых системах, не возникает необходимости в определении трансформационного события (при его наличии).

Второй тип ГМО-продукции – «продукция, полученная с использованием ГМО», которая предполагает присутствие в ней цельных нежизнеспособных ГМО или продуктов их переработки, процесс которой не предполагает освобождения от генетического материала организма. Дополнительные риски, которые возникают для этого типа ГМО-продукции, связаны с присутствием генетического материала ГМО и заключаются в возможности его горизонтального переноса, что и должно учитываться при оценке рисков вместе с контролем отсутствия в продукции жизнеспособных организмов.

Наконец, третий тип ГМО-продукции можно определить как «продукция, содержащая или являющаяся ГМО», что предполагает присутствие жизнеспособных ГМО. С этим типом продукции связано наибольшее число дополнительных потенциальных рисков, подлежащих оценке, по сравнению с аналогичной продукцией не-ГМ-происхождения. Так, необходима оценка рисков неконтролируемого распространения в окружающей среде ГМО, источником которой может быть такая продукция, а при их существенности возникает необходимость проведения всего комплекса оценки рисков, применимого к собственно ГМО, предназначенных для выпуска в окружающую среду.

Современные технологии направленной модификации генома и вопросы молекулярно-генетической характеристики и оценки безопасности ГМО

Как отмечалось выше, законодательное регулирование обращения ГМО и ГМО-продукции может

оказать непосредственное влияние на развитие научных исследований в области модификации генома. Однако и развитие технологий направленной модификации генома, и их практическое применение при создании хозяйственно-значимых ГМО может иметь существенное значение для характеристики и оценки безопасности ГМО и ГМО-продукции, особенно применительно к ГМО, в которых трансген интегрирован в геном реципиента.

Ранние технологии трансгеноза растений и животных позволяли получать ГМО с неконтролируемой интеграцией трансгена в геном организма-реципиента, в частности, с неконтролируемыми сайтами интеграции и копийностью трансгена. Помимо большой вариабельности в эффективности экспрессии трансгена и его стабильности, это создает определенные технические трудности в определении трансформационного события, т.е. точной локализации трансгена в геноме реципиента, особенно в случае тандемной интеграции его множественных копий. Кроме того, случайность интеграции трансгена в геном реципиента потенциально может приводить к нежелательным побочным эффектам, связанным с безопасностью ГМО, например, к появлению измененных форм белков, нарушению метаболических путей и т.п. Сегодня новейшие технологии модификации генома, в частности, основанные на использовании платформы CRISPR-опосредованной гомологичной рекомбинации, в том числе в комбинации с системами сайт-направленной рекомбинации, для повышения эффективности трансгеноза (с использованием рекомбиназ Cre, Flp и др.) позволяют с точностью до одного нуклеотида контролировать место встройки трансгена в геном. Это позволяет выбрать оптимальный, в зависи-

мости от специфики задачи, геномный сайт для встройки трансгена. Например, для продукции рекомбинантного белка в молоке это может быть область несущественного для секреции молока гена β -казеина, обладающего высокой эндогенной транскрипционной активностью в ткани молочной железы [27, 28], или обеспечивающие транскрипционную активность трансгена локусы генома, которые факультативны для нормального развития и жизнедеятельности организма, например, локус *ROSA26* [29–32]. Помимо эффективного получения трансгенных организмов, обеспечивающих конститутивные условия для экспрессии трансгена и гарантирующих отсутствие случайных побочных эффектов модификации генома на метаболизм реципиента, что имеет непосредственное значение для обеспечения его безопасности, использование направленной интеграции трансгена в геном позволяет контролировать его копийность и делает описание трансформационного события стандартизированной рутинной задачей. Таким образом, применение новейших технологий направленного редактирования генома позволяет существенно упростить молекулярно-генетические исследования, необходимые для государственной регистрации ГМО, и снизить риски влияния генетической модификации на профиль безопасности ГМО по сравнению с организмом-реципиентом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя, сегодня в Российской Федерации существует насущная необходимость в ревизии законодательной базы в отношении ГМО и ГМО-продукции, подходов к оценке их безопасности и связанных с ними потенциальных рисков. Предложенная нами концепция делает возможным эффективное проведение таких

оценок, в то же время позволяя избежать избыточных исследований в зависимости от особенностей ГМО, условий его выращивания и разведения, а также особенностей ГМО-продукции. Формирование эффективной системы включения ГМО в хозяй-

ственный оборот, несомненно, станет стимулом и для активного проведения научных исследований в этой конкурентной в мире области, где сегодня пока Российская Федерация обладает достаточными компетенциями и потенциалом [33], которые, одна-

ко, в случае сохранения нынешней ситуации в правовом поле и, тем более, при полном запрете использования ГМ-растений и животных будут быстро утеряны в связи с отсутствием их востребованности. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Y.M., Georgiev P.G. // *Acta Naturae*. 2013. V. 5. № 1. P. 33–46.
2. Камионская А.М., Кузнецов Б.Б., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2286385, Российская Федерация. МПК C12N15/00 (2006.01), C12N15/09 (2006.01), C12N15/82 (2006.01), A01H1/06 (2006.01), A01H4/00 (2006.01). 2006.
3. Камионская А.М., Кузнецов Б.Б., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2286386, Российская Федерация. МПК C12N15/00, C12N15/09, C12N15/82, A01H1/06, A01H4/00. 2006.
4. Стародубцева (Камионская) А.М., Белоусова М.Б., Шульга О.А., Конов А.Л., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2231551, Российская Федерация. МПК C12N15/82, A01H4/00. 2004.
5. Стародубцева (Камионская) А.М., Белоусова М.Б., Шульга О.А., Конов А.Л., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2231550, Российская Федерация. МПК C12N15/82, A01H4/00. 2004.
6. Стародубцева (Камионская) А.М., Белоусова М.Б., Шульга О.А., Конов А.Л., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2231549, Российская Федерация. МПК C12N15/82, A01H4/00. 2004.
7. Стародубцева (Камионская) А.М., Белоусова М.Б., Шульга О.А., Конов А.Л., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2231251, Российская Федерация. МПК C12N15/82, A01H4/00. 2004.
8. Стародубцева (Камионская) А.М., Белоусова М.Б., Шульга О.А., Конов А.Л., Скрябин К.Г. Патент на изобретение № 2231548, Российская Федерация. МПК C12N15/82, A01H4/00. 2004.
9. Шестибратов К.А., Долгов С.В. Патент на изобретение № 2261275, Российская Федерация. МПК C12N15/00, C12N15/29, C12N15/82, A01H5/00, A01H1/06. 2002.
10. Максименко О.Г., Долгова А.С., Бончук А.Н., Тихонов М.В., Гасанов Н.Б., Зарайский Е.И., Долгов С.В., Георгиев П.Г. Патент на изобретение № 2507736, Российская Федерация. МПК A01H1/00. 2014.
11. Petersen B., Niemann H. // *Transgenic Res*. 2015. V. 24. № 3. P. 381–396.
12. Osakabe Y., Osakabe K. // *Plant Cell Physiol*. 2015. V. 56. № 3. P. 389–400.
13. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 3. P. 19–40.
14. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 3rd. // *Trends Biotechnol*. 2013. V. 31. № 7. P. 397–405.
15. Favia G. // *Bioengineered*. 2015. V. 6. № 1. P. 5–7.
16. Lacroix R., McKemey A.R., Raduan N., Kwee Wee L., Hong Ming W., Guat Ney T., Rahidah A.A.S., Salman S., Subramaniam S., Nordin O., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 8. P. e42771.
17. Harris A.F., Nimmo D., McKemey A.R., Kelly N., Scaife S., Donnelly C.A., Beech C., Petrie W.D., Alphey L. // *Nat. Biotechnol*. 2011. V. 29. № 11. P. 1034–1037.
18. Silbergliitt R., Antón P.S., Howell D.R., Wong A. *The Global Technology Revolution 2020, In-Depth Analyses. Bio/Nano/Materials/Information Trends, Drivers, Barriers, and Social Implications. Technical Report*. Santa Monica, Calif.: RAND Corporation, 2006. 281 с.
19. Huang S., Weigel D., Beachy R.N., Li J. // *Nat. Genet*. 2016. V. 48. № 2. P. 109–111.
20. Xia J., Song P., Xu L., Tang W. // *Biosci. Trends*. 2015. V. 9. № 2. P. 134–137.
21. Rizzi A., Raddadi N., Sorlini C., Nordgrd L., Nielsen K.M., Daffonchio D. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2012. V. 52. № 2. P. 142–161.
22. Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 18. P. 5844–5849.
23. Lacroix B., Citovsky V. // *Int. J. Dev. Biol*. 2013. V. 57. № 6–8. P. 467–481.
24. Tagliabue G. // *EMBO Rep*. 2016. V. 17. № 1. P. 10–13.
25. Beier R.C. // *Rev. Environ. Contam. Toxicol*. 1990. V. 113. P. 47–137.
26. Lin C.-H., Pan T.-M. // *J. Food Drug. Anal*. 2016. V. 24. № 1. P. 1–8.
27. Cosenza G., Pauciullo A., Colimoro L., Mancusi A., Rando A., Di Bernardino D., Ramunno L. // *Anim. Genet*. 2007. V. 38. № 6. P. 655–658.
28. Kumar S., Clarke A.R., Hooper M.L., Horne D.S., Law A.J., Leaver J., Springbett A., Stevenson E., Simons J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 13. P. 6138–6142.
29. Chen S.X., Osipovich A.B., Ustione A., Potter L.A., Hipkens S., Gangula R., Yuan W., Piston D.W., Magnuson M.A. // *Dis. Model. Mech*. 2011. V. 4. № 4. P. 537–547.
30. Friedrich G., Soriano P. // *Genes Dev*. 1991. V. 5. № 9. P. 1513–1523.
31. Soriano P. // *Nat. Genet*. 1999. V. 21. № 1. P. 70–71.
32. Tchorz J.S., Suply T., Ksiazek I., Giachino C., Cloëtta D., Danzer C.P., Doll T., Isken A., Lemaistre M., Taylor V., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 1. P. e30011.
33. Skryabin K.G. // *New. Biotechnology*. 2010. V. 27. № 5. P. 593–595.

УДК 577.29

Особенности процессинга теломеразных РНК дрожжей и человека

М. П. Рубцова^{1,2,3*}, Д. П. Василькова¹, Ю. В. Нарайкина^{3,4}, О. А. Донцова^{1,2,3}

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

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

³Сколковский институт науки и технологий, 143026, Москва, территория инновационного центра «Сколково», ул. Нобеля, 3

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

*E-mail: mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 28.07.2016

Принята к печати 13.09.2016

РЕФЕРАТ Теломераза – один из ключевых компонентов аппарата поддержания длины концов линейных хромосом эукариот – теломер. В результате удаления затравки, используемой для репликации ДНК, линейные хромосомы укорачиваются в каждом раунде деления. На концах линейных хромосом находятся специальные повторяющиеся теломерные последовательности, которые предотвращают потерю генетической информации в результате недорепликации. В соматических клетках высших эукариот теломеры укорачиваются, пока не становятся настолько короткими, что уже не могут выполнять свою функцию. В таких обстоятельствах клетка претерпевает кризис и, как правило, погибает. В редких случаях происходит активация теломеразы, и клетка приобретает неограниченный потенциал деления. Некоторые клетки (половые, эмбриональные, стволовые, а также соматические клетки с высоким пролиферативным потенциалом) поддерживают теломеразную активность, необходимую им для выполнения своих функций. В большинстве соматических клеток теломераза не активна. Для активности теломеразы *in vitro* необходимы два основных компонента – теломеразная обратная транскриптаза и теломеразная РНК. Реактивация теломеразы в раковых клетках происходит в результате восстановления экспрессии гена обратной транскриптазы. Экспрессия теломеразной РНК в большинстве клеток человека конститутивна, что позволяет предполагать другие функции этой РНК, еще недостаточно изученные. Настоящий обзор посвящен биоге-незу теломеразных РНК дрожжей и человека. Мы решили остановиться именно на этих организмах ввиду того, что в последние годы произошел прорыв в изучении процессинга теломеразных РНК разных видов дрожжей и человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА процессинг, сплайсинг, теломераза, теломеразная РНК, транскрипция, экзосома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TER – теломеразная РНК; hTR – теломеразная РНК человека; TLC1 – теломеразная РНК *Saccharomyces cerevisiae*; TERT – теломеразная обратная транскриптаза; мяРНК – малые ядерные РНК.

ВВЕДЕНИЕ

Теломераза представляет собой рибонуклеопротеидный комплекс, содержащий обратную транскриптазу (TERT) – белковую субъединицу, обеспечивающую полимеразную активность, и теломеразную РНК (TER) [1, 2]. Теломеразная РНК содержит матрицу для синтеза теломер, а также выполняет важную архитектурную функцию, действуя как структурный каркас для формирования активного фермента [3]. В формировании активного цен-

тра теломеразы участвуют разные элементы сложной пространственной структуры теломеразной РНК, которые способствуют эффективному добавлению нуклеотидов в процессе синтеза теломерного повтора, а также транслокации фермента на теломере, необходимой для процессивного синтеза длинной теломерной последовательности [4]. С разными доменами теломеразной РНК взаимодействуют дополнительные белковые факторы, необходимые для ее стабилизации, эффективной сборки и регу-

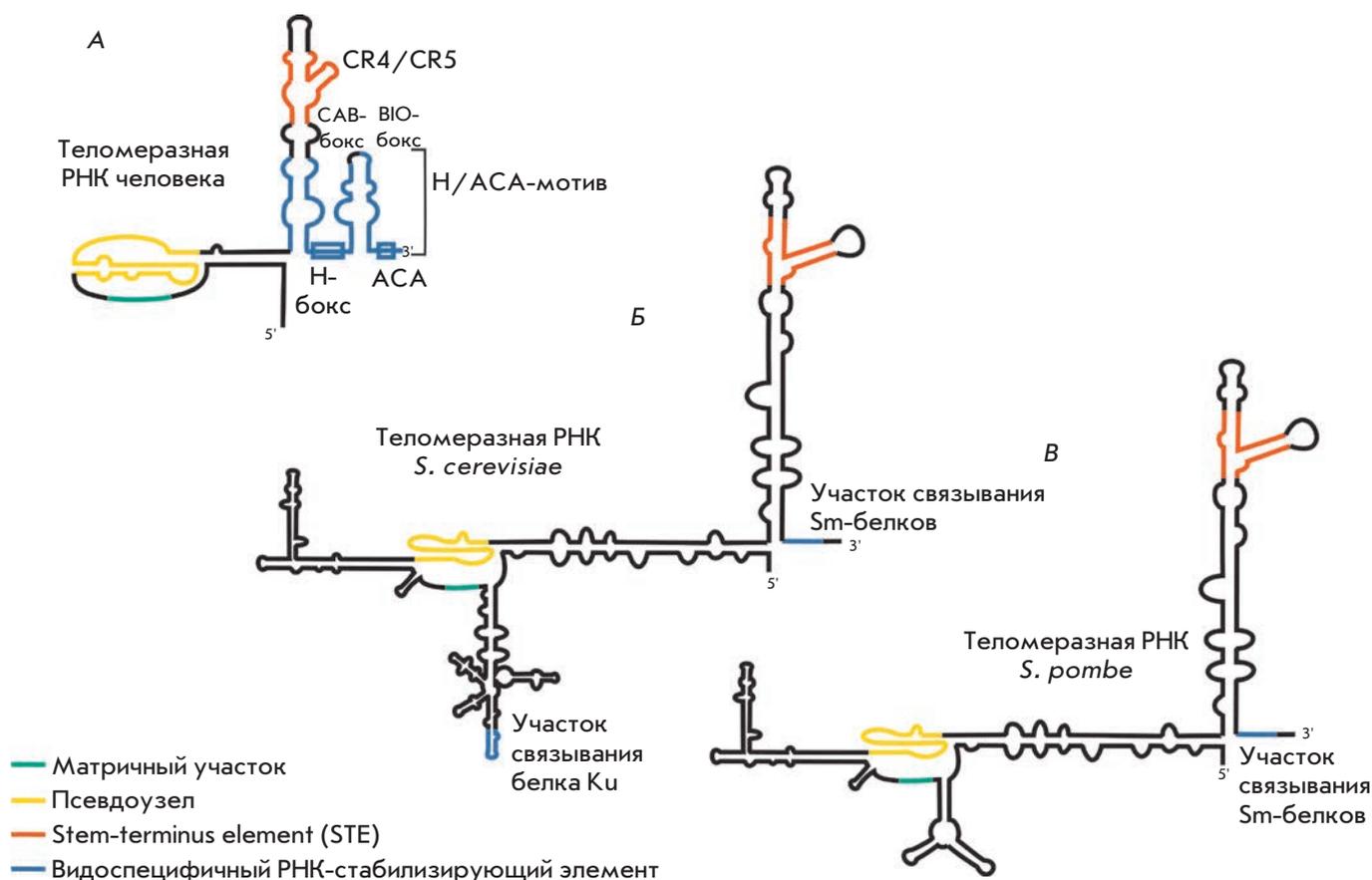


Рис. 1. Структура теломеразных РНК. А – схематическое изображение вторичной структуры теломеразной РНК человека. Б – схематическое изображение вторичной структуры теломеразной РНК *S. cerevisiae*. В – схематическое изображение вторичной структуры теломеразной РНК *S. pombe*

ляции активности фермента, локализации и транспорта внутри клетки.

СТРУКТУРА ТЕЛОМЕРАЗНЫХ РНК

Теломеразные РНК дрожжей и млекопитающих, несмотря на высокую степень вариации как размеров, так и нуклеотидных последовательностей, содержат четыре консервативных структурных элемента, необходимых для образования и функционирования фермента [5–11]. Матричный участок, как следует из его названия, служит матрицей для синтеза теломер [3], псевдоузел участвует в позиционировании матричного участка в активном центре фермента [12] и вместе со STE-элементом (stem-terminus element) взаимодействует с TERT, а видоспецифичный 3'-концевой элемент обеспечивает стабильность теломеразной РНК [13] и необходим для правильной внутриклеточной локализации теломеразной РНК [14–16] (рис. 1).

ПРОЦЕССИНГ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ТЕЛОМЕРАЗНЫХ РНК

Процессинг и локализация теломеразной РНК *Saccharomyces cerevisiae* (TLC1)

В процессе транскрипции РНК-полимераза II синтезирует две формы теломеразной РНК: длинную полиаденилированную и короткую неполиаденилированную. Судьба длинной полиаденилированной формы в настоящий момент плохо изучена. Известно, что доля этой формы составляет 10% от всей теломеразной РНК клетки, но она не поддерживает активность теломеразы [17]. Предполагается, что длинная полиаденилированная теломеразная РНК может процессироваться до зрелой каталитически активной формы. Известно, что экспрессия TLC1 дрожжей *S. cerevisiae* под контролем сильного промотора (pGal4), направляющего экспрессию белок-кодирующих генов, приводит к накоплению полиа-

денилированной формы, но не влияет на содержание неполиаденилированной, а нарушение системы полиаденилирования блокирует образование полиаденилированной формы и сильно снижает количество зрелой TLC1 в клетке [17, 18]. Эти данные позволяют предполагать, что длинный полиаденилированный первичный транскрипт может подвергаться процессингу с образованием зрелой теломеразной РНК, хотя экспериментальных данных, подтверждающих такой механизм, до сих пор не получено.

В клетках дрожжей в образовании двух форм первичного транскрипта теломеразной РНК принимают участие разные транскрипционные комплексы, ассоциированные с РНК-полимеразой II. РНК-полимераза II на стадии инициации транскрипции образует комплекс с факторами терминации и процессинга, т.е. промотор определяет механизм терминации. Оказалось, что полиаденилированная и неполиаденилированная формы первичного транскрипта теломеразной РНК *S. cerevisiae* образуются независимо. Нарушение сигналов полиаденилирования приводит к исчезновению длинной полиаденилированной формы TLC1, но не влияет на образование неполиаденилированной зрелой формы [18]. TLC1 ассоциирована с факторами терминации транскрипции Nrd1-Nab3-Sen1, характерными для некодирующих РНК [19]. В 3'-концевой области гена *TLC1* находятся участки связывания факторов терминации Nab3 и Nrd1, делеция которых приводит к накоплению полиаденилированного первичного транскрипта [18, 19]. Известно, что факторы терминации Nrd1, Nab3 и Sen1 ассоциированы с комплексом, состоящим из РНК-полимеразы II, кеп-связывающего комплекса (CBP80, CBP20), экзосомы и TRAMP [20]. В состав TRAMP входят белки TRF4/5 (неканоническая поли(А)-полимераза), Air1/2 (РНК-связывающий белок) и РНК-хеликаза MTR4 [21, 22]. TRF4 добавляет короткую олиго(А)-последовательность, создавая неструктурированный 3'-конец таких некодирующих РНК, как малые ядерные, ядрышковые и TLC1, который может процессироваться экзосомой [18, 23–26]. Работу экзосомы ограничивают Sm-белки, ассоциированные с 3'-концевым участком зрелой теломеразной РНК. Если экзосома не встречает на своем пути преграды в виде комплекса Sm-белков, то она полностью деградирует малые ядерные и ядрышковые РНК, а также теломеразную РНК [27] (рис. 2).

Локализация в клетке и сборка активного теломеразного комплекса *S. cerevisiae*

Один из важных этапов биогенеза теломеразной РНК и самой теломеразы – правильная внутриклеточная локализация их компонентов (рис. 2). Как уже сказано, первичный транскрипт теломеразной РНК

как дрожжей, так и человека подвергается котранскрипционному процессингу с последующим созреванием или деградацией при помощи экзосомы. При правильном созревании теломеразная РНК *S. cerevisiae* оказывается в ядрышке, где происходит гиперметилование ее кеп ферментом Tgs1 [28]. Триметилированная процессированная форма TLC1 экспортируется из ядра системой ядерно-цитоплазматического транспорта [29]. За экспорт теломеразной РНК отвечают Crm1/Xpo1, а также факторы экспорта мРНК Mex67 и Dbp5/Rat8. В цитоплазме теломеразная РНК образует комплекс с белковыми субъединицами теломеразы Est1, Est2 и Est3, после чего факторы импорта в ядро, Mtr10 и Kap122, переносят фермент обратно в ядро [29–31], где в поздней S-фазе он взаимодействует с теломерами и удлиняет их.

Процессинг теломеразных РНК делящихся дрожжей

Теломеразная РНК претерпела в процессе эволюции значительные изменения, которые коснулись как структуры, так и механизма процессинга. В настоящий момент не остается сомнений, что у всех организмов теломеразная РНК синтезируется в виде длинного предшественника, правильный процессинг которого приводит к появлению зрелой каталитически активной теломеразной РНК. Теломеразная РНК участвует в тонкой регуляции состояния клетки, поэтому для правильного функционирования теломеразной РНК ее количество в клетке необходимо поддерживать на физиологическом уровне. В делящихся дрожжах (*Schizosaccharomycetes*) [32], дрожжах *Hansenula polymorpha* (*Saccharomycetaceae*) [33] и других грибах (*Sordariaceae*, *Trichocomaceae*) [34] предшественник теломеразной РНК синтезируется РНК-полимеразой II в виде полиаденилированного транскрипта (рис. 3). Первичный транскрипт теломеразной РНК в клетках этих организмов содержит два экзона, интрон и поли(А)-последовательность на 3'-конце. Процессинг первичного транскрипта осуществляет сплайсосома. В результате первой стадии сплайсинга (разрезание в 5'-участке сплайсинга) образуется зрелая форма теломеразной РНК. Впервые процессинг, осуществляемый сплайсосомой, был обнаружен в клетках дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* [32]. Как известно, сплайсинг является строгокоординированным процессом, все стадии которого протекают очень быстро и в строго определенном порядке. На первой стадии 2'-гидроксильная группа аденозина в точке ветвления, находящейся в середине участка ветвления, атакует 5'-концевой участок сплайсинга по сахарофосфатному остову. В результате образуется интермедиат, имеющий структу-

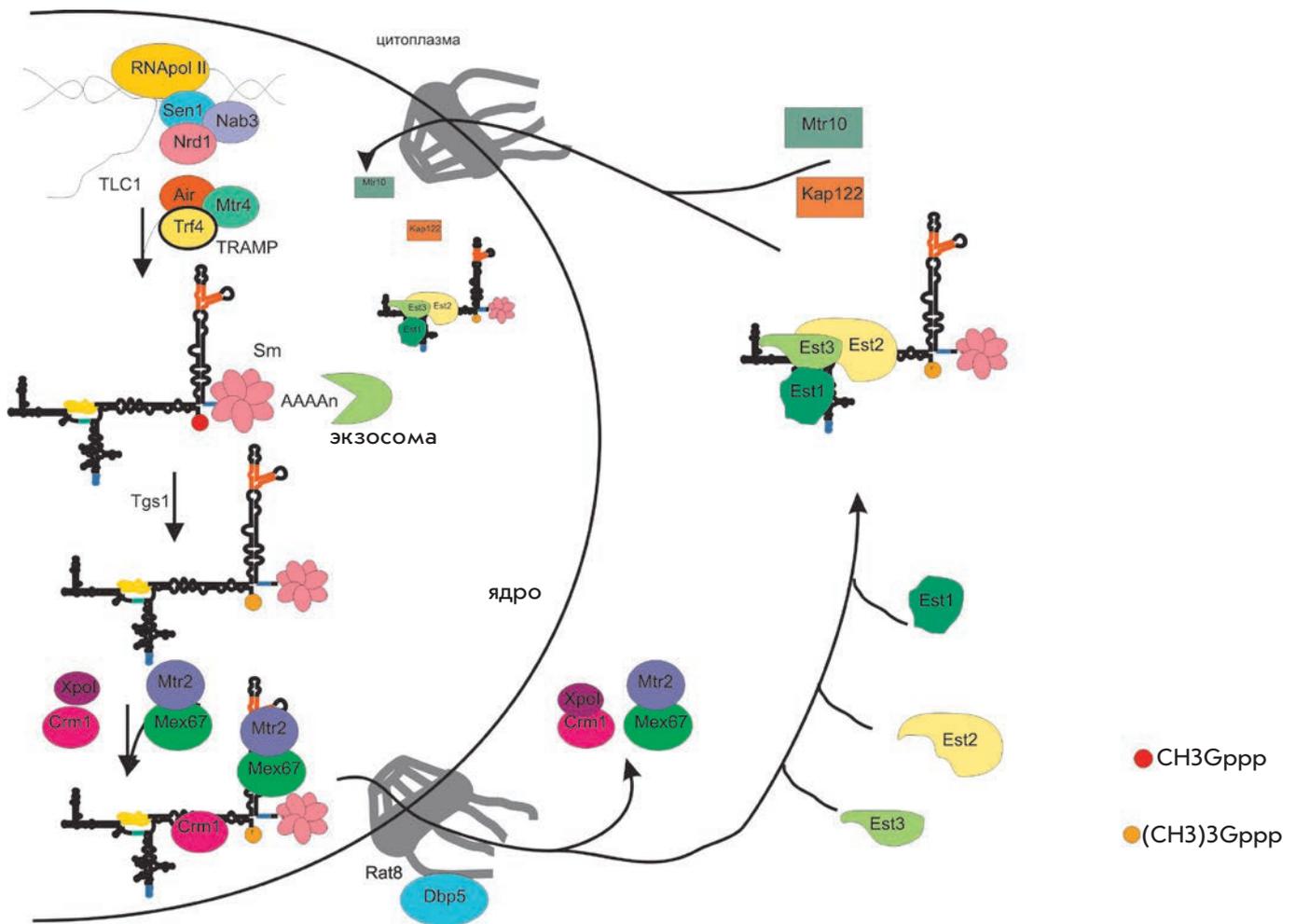


Рис. 2. Модель процессинга и локализации теломеразной РНК *S. cerevisiae*

ру лассо, где 5'-конец интрона присоединен к точке ветвления через 2'-5'-связь. Освободившаяся 3'-гидроксильная группа 5'-концевого экзона атакует 3'-концевой участок сплайсинга, что приводит к соединению экзонов и выщеплению интрона в виде лариата. В состав сплайсосомы входят малые ядерные РНК (мяРНК) U1, U2, U4, U5 и U6, которые за счет комплементарных взаимодействий с разными участками пре-мРНК направляют и обеспечивают быстрое и точное прохождение сплайсинга [35]. Оказалось, что замедление сплайсинга предшественника ТЕР после эффективной первой стадии обусловлено особенностями регуляторных участков самой теломеразной РНК [32, 36]. В *S. pombe* расстояние между точкой ветвления и 3'-концевым участком сплайсинга теломеразной РНК равно 22 нуклеотидам [32], что примерно в 2 раза больше, чем у большинства интронов этого организма [37]. Укорочение интрона до 14 нуклеотидов приводит к полному сплайсингу

и деградации теломеразной РНК [32]. Дальнейший анализ участков сплайсинга выявил интересные особенности [31, 35]. Оказалось, что неполная комплементарность 5'-концевого участка сплайсинга U1 мяРНК [32], высокая степень комплементарности участка ветвления и U2 мяРНК, большое расстояние между точкой ветвления и 3'-концевым участком сплайсинга, а также слабый полипиримидиновый тракт синергично снижают скорость перехода ко второй стадии сплайсинга [36]. В процессинге теломеразной РНК *S. pombe* участвуют белки PrP22 и PrP43, являющиеся хеликазами с DExD/H-боксом [36]. Эти белки, используя энергию гидролиза АТФ, высвобождают интермедиаты сплайсинга при замедлении второй стадии (лигирование экзонов). Таким образом происходит высвобождение сплайсосомы, застывшей на интермедиатах, когда переход ко второй стадии сплайсинга затруднен [38]. Мутации, ингибирующие АТФ-азную активность этих белков, значительно

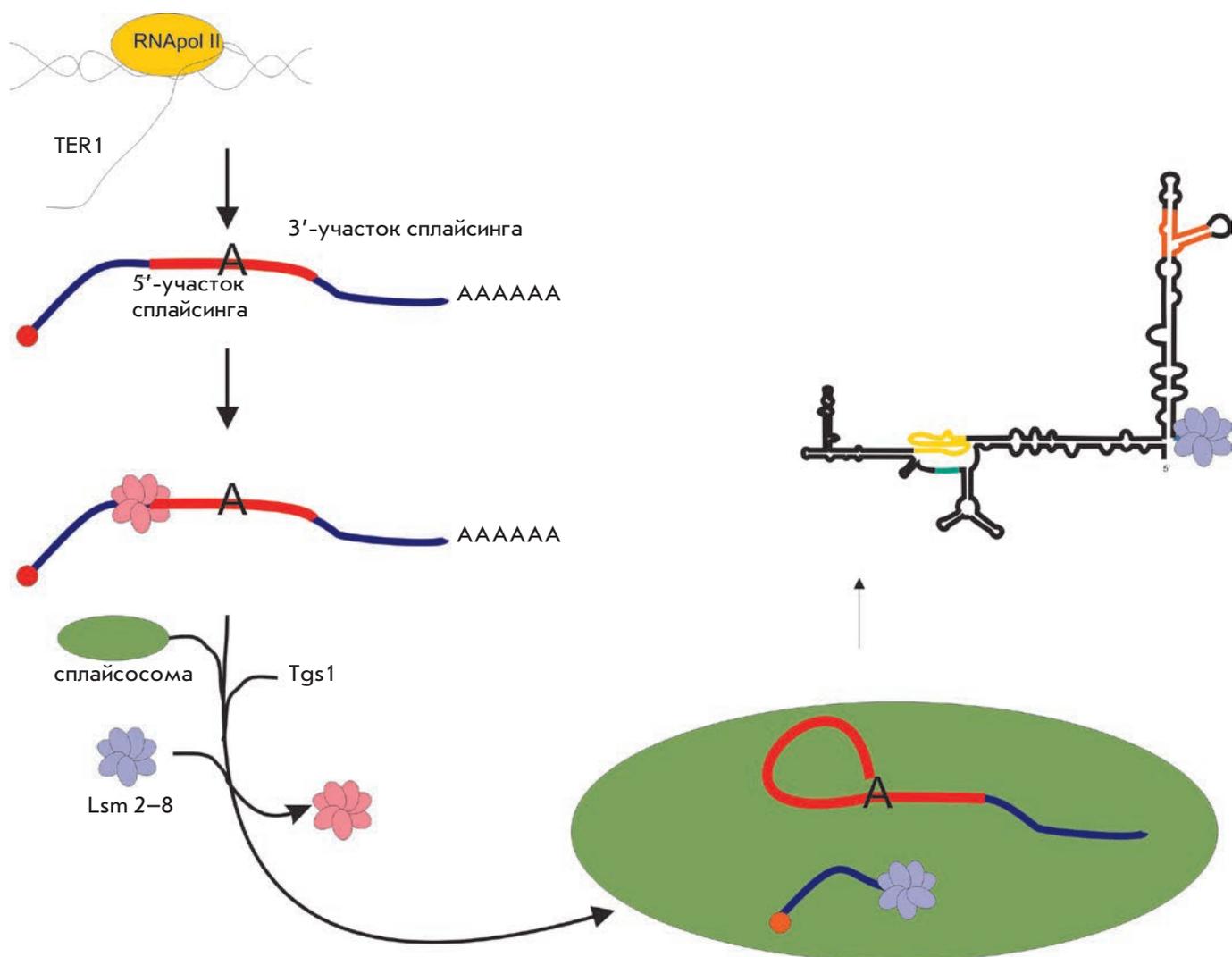


Рис. 3. Модель процессинга теломеразной РНК *S. pombe*

увеличивают содержание полностью сплайсированной формы TER1 [36].

Известно, что с теломеразной РНК дрожжей *S. cerevisiae* связаны Sm-белки [39], которые также взаимодействуют с U1, U2, U4 и U5 мяРНК [40, 41]. Участок связывания Sm-белков расположен в нескольких нуклеотидах от 3'-конца зрелой формы [39]. В клетках *S. pombe* сплайсосома разрезает TER1 на расстоянии одного нуклеотида от участка связывания Sm-белков, что может нарушать стабильность этого комплекса. Оказалось, что Sm-белки взаимодействуют с полиаденилированным предшественником TER1 и способствуют его разрезанию сплайсосомой [42]. Smd2 привлекает Tgs1, который осуществляет посттранскрипционное гиперметилирование TER1 с образованием 2,2,7-триметилгуанозинового 5'-кепа. После

разрезания и гиперметилирования TER1 Sm-белки диссоциируют и замещаются Lsm-белками (рис. 3), которые защищают теломеразную РНК от деградации экзосомой [42].

Впоследствии выяснилось, что другие виды дрожжей, а также грибов поддерживают процессинг теломеразной РНК путем разрезания предшественника сплайсосомой. У *S. cryophilus* и *S. octoporus* 5'-концевой участок сплайсинга содержит цитозин в третьем положении, что стабилизирует взаимодействие с U6 мяРНК на первой стадии и замедляет переход ко второй [43]. У *Aspergillus* sp. и *Neurospora crassa* первый нуклеотид 5'-концевого участка сплайсинга – аденин – важен для высвобождения процессированного продукта после первой стадии сплайсинга [33, 42]. Предполагается, что об-

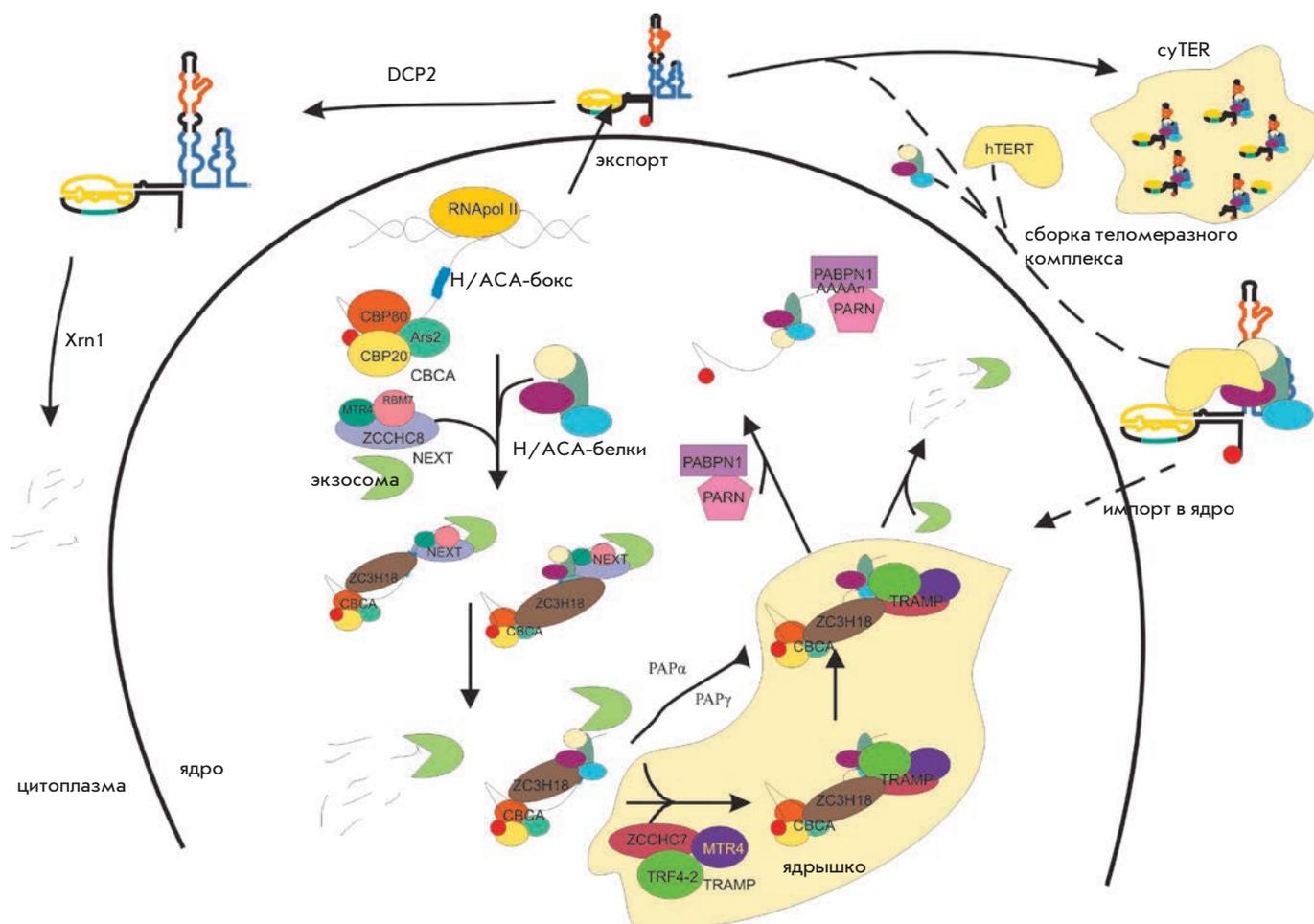


Рис. 4. Модель процессинга и локализации теломеразной РНК человека

разование неканонических взаимодействий между первым и последним гуанозином в интроне необходимо для позиционирования 3'-концевого участка сплайсинга во второй реакции трансэтерификации и лигирования экзонов [44], а замена гуанозина на аденин в теломеразных РНК, наиболее близких к общему предку грибов семейств *Pezizomycotina* и *Taphrinomycotina*, препятствует образованию правильной трехмерной структуры и приводит к остановке сплайсинга после первой реакции трансэтерификации и последующей диссоциации застывшей сплайсосомы [34, 36, 43].

Кардинальные различия в механизме процессинга теломеразных РНК у эволюционно-родственных организмов не влияют на строгий контроль количества и качества теломеразной РНК в клетке. В клетках дрожжей экзосома деградирует неправильно процессированную теломеразную РНК так же, как РНК, не образовавшую комплекс с белками, регулирующими ее локализацию и активность.

Процессинг и локализация теломеразной РНК человека

Теломеразные РНК дрожжей и человека значительно различаются длиной и структурой, однако при этом сохраняется консервативность основных элементов, важных для формирования и функционирования теломеразного комплекса. Зрелая теломеразная РНК человека (hTR) состоит из 451 нуклеотида [45]. Транскрипцию гена *hTTR* осуществляет РНК-полимераза II [46]. Промотор гена *hTTR* достаточно хорошо картирован, а терминаторная область изучена плохо [47]. Предполагается, что сначала образуется первичный транскрипт, длина которого до сих пор не определена. Удлиненную до 541 нуклеотида форму теломеразной РНК человека выявили первоначально методом обратной транскрипции с последующей ПЦР-амплификацией [45]. Более свежие данные, полученные методом высокопроизводительного секвенирования, свидетельствуют о существовании первичного транскрипта теломеразной РНК

длиной до 1451 нуклеотида [48]. 3'-Концевой домен теломеразной РНК человека образует структуру, схожую со структурами, общими для РНК семейства H/ACA [49]. Эта структура состоит из двух шпильек, соединенных одноцепочечной петлей H, и содержит одноцепочечный мотив 5'-ACA-3', находящийся в 3 нуклеотидах от 3'-конца зрелой теломеразной РНК (рис. 1). H/ACA-шпильки ассоциированы с набором из четырех белков: дискерина, NHP2, NOP10 и GAR1 [13]. H/ACA-шпилька и белки, связанные с ней, обеспечивают стабильность теломеразной РНК, так же как и других H/ACA-РНК. Известно, что H/ACA-РНК служат гидами при направленном псевдоуридилровании рибосомных РНК, но мишень теломеразной РНК не определена, поэтому H/ACA-мотиву в ее составе отводится только стабилизирующая функция.

Совмещение методов глубокого секвенирования и определения 3'-конца РНК (3'-RACE) позволило выявить гетерогенность 3'-конца теломеразной РНК человека [50]. Оказалось, что 3'-концевая последовательность может содержать от одного до семи дополнительных нуклеотидов, соответствующих геномной последовательности, и короткий олиго(A)-участок (1–10 нуклеотидов). Таким образом, можно заключить, что теломеразная РНК синтезируется в виде удлиненного предшественника, который процессируется с образованием промежуточной олигоденилированной формы.

Известно, что мяРНК, содержащие H/ACA-мотивы, подвергаются процессингу при помощи экзосомы [51]. В клетках млекопитающих экзосому к ее субстрату привлекают несколько белковых комплексов. Известно, что комплекс TRAMP (TRF4, ZCCHC7 и MTR4) участвует в деградации некодирующих РНК и aberrантных транскриптов в ядрышке. Для этого белок TRF4 олигоденилирует транскрипт, что служит сигналом для деградации экзосомой [51, 52]. Комплекс NEXT (RBM7, ZCCHC8 и MTR4) привлекает экзосому на активно транскрибируемые РНК и так называемые PROMoter uPstream Transcripts (PROMPTs), синтез которых начинается перед промоторами кодирующих генов [53, 54]. NEXT взаимодействует с кеп-связывающим комплексом (CBC), образуя комплекс CBCN и осуществляя ко-транскрипционный кеп-зависимый 3'-процессинг или деградацию РНК в ядре [54–57].

Инактивирующие мутации в гене *PARN1*, кодирующем поли(A)-рибонуклеазу 1, были обнаружены недавно у больных с выраженными проявлениями дискератога, заболевания, связанного с короткими теломерами [58]. Оказалось, что нарушения в функционировании, а также нокдаун гена *PARN1* приводят к снижению общего количества теломеразной

РНК в клетках при увеличении доли непроцессированной олигоденилированной РНК [16, 47, 58, 59]. В группе Baumann обнаружили, что сплайсостатин А, ингибитор сплайсинга, не влияет на процессинг теломеразной РНК человека [48], в то время как изогингетин, который блокирует работу не только сплайсосомы, но и экзосомы [55], ингибирует процессинг этой РНК, приводя к накоплению 3'-удлиненной формы. В клетках со сниженным содержанием белка RRP40, основного компонента экзосомы, а также ассоциированных с ней двух нуклеаз – RRP6 и DIS3 – происходит накопление удлиненной с 3'-конца и зрелой форм теломеразной РНК и снижение количества олигоденилированной формы. Зрелая теломеразная РНК накапливается и при нокдауне компонента микропроцессора DGCR8. Оказалось, что DGCR8 участвует в привлечении экзосомы к мяРНК и теломеразной РНК, регулируя таким образом их общее количество в клетке [60]. Нокдаун компонентов NEXT, а также комплекса CBC способствует накоплению 3'-удлиненной формы теломеразной РНК [48]. Белок TRF4, компонент TRAMP, а также канонические поли(A)-полимеразы PAP α и PAP γ осуществляют олигоденилирование предшественника теломеразной РНК [61]. Интересно, что олигоденилирование теломеразной РНК белком TRF4 способствует ее деградации, а PAP α/γ участвует в процессинге с образованием зрелой теломеразной РНК [61]. Олигоденилированную форму теломеразной РНК человека стабилизирует PABPN1 (ядерный поли(A)-связывающий белок 1), который стимулирует синтез поли(A)-последовательности и привлекает PARN, способствуя созреванию hTR. Свободная олиго(A)-последовательность, не защищенная PABPN1, служит сигналом деградации РНК комплексом TRAMP с экзосомой [61].

Одну из важных ролей в процессинге теломеразной РНК человека играют белки, взаимодействующие с доменом H/ACA. Дискерин, NOP10, NHP2, NAF1 и GAR1 являются РНК-шаперонами, и их взаимодействие с теломеразной РНК в ходе процессинга стабилизирует ее, предотвращая деградацию экзосомой. Дискерин защищает теломеразную РНК от деградации ядерной 3'-5'-экзосомой. Нокдаун дискерина и мутации, нарушающие связывание теломеразной РНК с этим белком, приводят к снижению количества зрелой формы теломеразной РНК в клетках, тогда как нокдаун дискерина и PARN1 вызывают накопление теломеразной РНК в цитоплазматических тельцах, названных cyTER (cytoplasmic TER). Деградация теломеразной РНК с 5'-конца, осуществляемая декепирующим белком DCP2 и 5'-3'-экзонуклеазой XRN1 [16], также свидетельствует о цитоплазматической локализации теломеразной РНК.

Суммируя данные по процессингу теломеразной РНК человека, можно предложить общую схему ее синтеза и созревания (рис. 4). Первичный транскрипт во время синтеза РНК-полимеразой II кеппируется и взаимодействует с дискерином, NOP10, NHP2 и NAF1, которые стабилизируют и защищают РНК от деградации [62]. Часть теломеразной РНК, с которой связан дискерин и другие шапероны, претерпевает процессинг с образованием зрелой формы. Для этого комплекс NEXT с экзосомой привлекается СВС-комплексом и укорачивает длинный предшественник в ядре до тех пор, пока не встречает преграду в виде комплекса белков, связанных с мотивом H/ACA [48]. Такой продукт содержит от одного до семи дополнительных нуклеотидов на 3'-конце. Ядерные поли(А)-полимеразы PAP α , PAP γ и TRF4, компонент ассоциированного с экзосомой ядрышкового комплекса TRAMP, олигоаденилируют такой субстрат [48, 60]. Олигоаденилированный предшественник взаимодействует с PABPN1 [60], который защищает его от дальнейшей деградации, а также привлекает PARN1 [16, 48, 59, 60]. PARN1 аккуратно укорачивает олиго(А)-последовательность и оставшиеся дополнительные нуклеотиды, образуя зрелую форму теломеразной РНК. Первичный транскрипт, который не образовал комплекс с дискерином и другими шаперонами, подвергается деградации комплексом TRAMP с экзосомой. Некоторая часть первичного транскрипта экспортируется из ядра в цитоплазму, где декепируется белком DCP2 и подвергается деградации цитоплазматической 5'-3'-экзонуклеазой XRN1 [16].

Известно, что в опухолевых клетках линии HeLa теломеразная РНК накапливается в тельцах Кахаля. В структуре теломеразной РНК выделяют участок, так называемый САВ-бокс, отвечающий за ее локализацию в тельцах Кахаля, где происходит взаимодействие теломеразы с теломерой [63]. Мутации в САВ-боксе [14], так же как и мутации в белке ТСАВ1 [64], нарушают локализацию теломеразной РНК человека в тельцах Кахаля. ТСАВ1 взаимодействует с САВ-боксом теломеразной РНК и обеспечивает ее локализацию в тельцах Кахаля [64]. И мутации, и отсутствие ТСАВ1 не влияют на ферментативную активность теломеразы, но препятствуют ее локализации в тельцах Кахаля и на теломерах [65]. Вероятно, hTERT может образовать комплекс с hTR как в ядре, так и в цитоплазме, но в локализации теломеразы на теломере участвуют тельца Кахаля и непосредственно теломеразная РНК.

В последних работах по изучению процессинга и локализации теломеразных РНК дрожжей и человека показано, что количество теломеразной РНК

в клетке находится под очень строгим контролем. Предполагается, что процессинг и деградация теломеразной РНК являются конкурирующими процессами, баланс которых регулирует количество теломеразной РНК в клетке. Обнаружение теломеразной РНК в цитоплазме ставит новые вопросы. Непонятно, необходима ли эта стадия для процессинга или сборки теломеразы или теломеразная РНК человека выполняет в клетке альтернативные функции, некоторые из которых описаны ранее [66].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Теломераза поддерживает пролиферативный потенциал клеток, что делает ее одним из важнейших объектов изучения старения и трансформации клетки. Нарушения в функционировании теломеразы приводят к развитию опухолей и теломеропатий. Один из основных компонентов теломеразы – теломеразная РНК, ген которой экспрессируется в большинстве типов клеток на протяжении всей жизни. Экспрессия гена *hTERT*, кодирующего второй компонент теломеразы, тонко регулируется, и активация фермента зависит от появления белка hTERT в клетке. Механизм синтеза и процессинга теломеразной РНК привлекает внимание ученых уже больше 10 лет, а за последнее время произошел настоящий прорыв в изучении этой важной стадии биогенеза теломеразы. Одной из наиболее важных особенностей процессинга теломеразных РНК является тонкая регуляция количества этой молекулы в клетке. Как у дрожжей, так и у человека в процессинге теломеразной РНК участвует экзосома, которая быстро деградирует РНК, не защищенную РНК-шаперонами. Оказывается, большая часть продукта транскрипции гена теломеразной РНК деградирует в процессе биогенеза. Нарушения процессинга приводят к деградации теломеразной РНК, что вызывает развитие ряда заболеваний, относящихся к теломеропатиям.

Несмотря на прогресс в понимании механизмов процессинга теломеразной РНК, остаются вопросы, ответы на которые пока не найдены. Полное и детальное понимание как механизмов функционирования, так и биогенеза теломеразы позволит разработать новые подходы к терапии заболеваний, развитие которых связано с нарушениями системы поддержания теломер. ●

Работа по изучению механизмов процессинга теломеразных РНК осуществлена при поддержке РФФИ (грант № 14-04-01637 А), работа по анализу внутриклеточной локализации теломеразных РНК выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-14-10047).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Greider C.W., Blackburn E.H. // *Cell*. 1987. V. 51. № 6. P. 887–898.
2. Morin G.B. // *Cell*. 1989. V. 59. № 3. P. 521–529.
3. Shippen-Lentz D., Blackburn E.H. // *Science*. 1990. V. 247. № 4942. P. 546–552.
4. Blackburn E.H., Collins K. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011. V. 3. № 5. a003558.
5. Theimer C.A., Feigon J. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. V. 16. № 3. P. 307–318.
6. Egan E.D., Collins K. // *RNA*. 2012. V. 18. № 10. P. 1747–1759.
7. Schmidt J.C., Cech T.R. // *Genes Dev.* 2015. V. 29. № 11. P. 1095–1105.
8. Zhang Q., Kim N.-K., Feigon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 51. P. 20325–20332.
9. Qi X., Li Y., Honda S., Hoffmann S., Marz M., Mosig A., Podlevsky J.D., Stadler P.F., Selker E.U., Chen J.J.-L. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 1. P. 450–462.
10. Webb C.J., Zakian V.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2008. V. 15. № 1. P. 34–42.
11. Евфратов С.А., Смекалова Е.М., Головин А.В., Логвина Н.А., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. № 2. С. 41–47.
12. Niederer R.O., Zappulla D.C. // *RNA*. 2015. V. 21. № 2. P. 254–261.
13. Fu D., Collins K. // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. № 5. P. 1361–1372.
14. Jády B.E., Bertrand E., Kiss T. // *J. Cell Biol.* 2004. V. 164. № 5. P. 647–652.
15. Kiss T., Fayet-Lebaron E., Jády B.E. // *Mol. Cell*. 2010. V. 37. № 5. P. 597–606.
16. Shukla S., Schmidt J.C., Goldfarb K.C., Cech T.R., Parker R. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2016. V. 23. № 4. P. 286–292.
17. Chapon C., Cech T.R., Zaugg A.J. // *RNA* 1997. V. 3. № 11. P. 1337–1351.
18. Смекалова Е.М., Шубернецкая О.С., Зверева М.Э., Громенко Е.В., Рубцова М.П., Донцова О.А. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 10. С. 1350–1361.
19. Jamonnak N., Creamer T.J., Darby M.M., Schaugency P., Wheelan S.J., Corden J.L. // *RNA*. 2011. V. 17. № 11. P. 2011–2025.
20. Noël J.-F., Larose S., Abou Elela S., Wellinger R.J. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 12. P. 5625–5636.
21. Vasiljeva L., Buratowski S. // *Mol. Cell*. 2006. V. 21. № 2. P. 239–248.
22. Porrua O., Libri D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2015. V. 16. № 3. P. 190–202.
23. Jia H., Wang X., Anderson J.T., Jankowsky E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 19. P. 7292–7297.
24. Jia H., Wang X., Liu F., Guenther U.-P., Srinivasan S., Anderson J.T., Jankowsky E. // *Cell*. 2011. V. 145. № 6. P. 890–901.
25. Wyers F., Rougemaille M., Badis G., Rousselle J.-C., Dufour M.-E., Boulay J., Régnault B., Devaux F., Namane A., Séraphin B., et al. // *Cell*. 2005. V. 121. № 5. P. 725–737.
26. Houseley J., LaCava J., Tollervey D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 529–539.
27. Coy S., Volanakis A., Shah S., Vasiljeva L. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675052/>.
28. Mouaikel J., Verheggen C., Bertrand E., Tazi J., Bordonné R. // *Mol. Cell*. 2002. V. 9. № 4. P. 891–901.
29. Gallardo F., Olivier C., Dandjinou A.T., Wellinger R.J., Chartrand P. // *EMBO J*. 2008. V. 27. № 5. P. 748–757.
30. Ferrezuelo F., Steiner B., Aldea M., Fitcher B. // *Mol. Cell Biol.* 2002. V. 22. № 17. P. 6046–6055.
31. Wu H., Becker D., Krebber H. // *Cell Rep*. 2014. V. 8. № 6. P. 1630–1638.
32. Box J.A., Bunch J.T., Tang W., Baumann P. // *Nature*. 2008. V. 456. № 7224. P. 910–914.
33. Smekalova E.M., Malyavko A.N., Zvereva M.I., Mardanov A.V., Ravin N.V., Skryabin K.G., Westhof E., Dontsova O.A. // *RNA*. 2013. V. 19. № 11. P. 1563–1574.
34. Qi X., Rand D.P., Podlevsky J.D., Li Y., Mosig A., Stadler P.F., Chen J.J.-L. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6105.
35. Wahl M.C., Will C.L., Lührmann R. // *Cell*. 2009. V. 136. № 4. P. 701–718.
36. Kannan R., Hartnett S., Voelker R.B., Berglund J.A., Staley J.P., Baumann P. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 6. P. 627–638.
37. Zhang M.Q., Marr T.G. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. № 9. P. 1750–1759.
38. Semlow D.R., Staley J.P. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. № 7. P. 263–273.
39. Seto A.G., Zaugg A.J., Sobel S.G., Wolin S.L., Cech T.R. // *Nature*. 1999. V. 401. № 6749. P. 177–180.
40. Raker V.A., Plessel G., Lührmann R. // *EMBO J*. 1996. V. 15. № 9. P. 2256–2269.
41. Patel S.B., Bellini M. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 20. P. 6482–6493.
42. Tang W., Kannan R., Blanchette M., Baumann P. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7393. P. 260–264.
43. Kannan R., Helston R.M., Dannebaum R.O., Baumann P. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6104.
44. Parker R., Siliciano P.G. // *Nature*. 1993. V. 361. № 6413. P. 660–662.
45. Feng J., Funk W.D., Wang S.S., Weinrich S.L., Avilion A.A., Chiu C.P., Adams R.R., Chang E., Allsopp R.C., Yu J. // *Science*. 1995. V. 269. № 5228. P. 1236–1241.
46. Egan E.D., Collins K. // *Mol. Cell Biol.* 2012. V. 32. № 13. P. 2428–2439.
47. Zhao J.Q., Hoare S.F., McFarlane R., Muir S., Parkinson E.K., Black D.M., Keith W.N. // *Oncogene*. 1998. V. 16. № 10. P. 1345–1350.
48. Tseng C.-K., Wang H.-F., Burns A.M., Schroeder M.R., Gaspari M., Baumann P. // *Cell Rep*. 2015. V. 13. № 10. P. 2232–2243.
49. Mitchell J.R., Collins K. // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. № 2. P. 361–371.
50. Goldfarb K.C., Cech T.R. // *BMC Mol. Biol.* 2013. V. 14. P. 23.
51. Berndt H., Harnisch C., Rammelt C., Stöhr N., Zirkel A., Dohm J.C., Himmelbauer H., Tavanez J.-P., Hüttelmaier S., Wahle E. // *RNA*. 2012. V. 18. № 5. P. 958–972.
52. Rammelt C., Bilen B., Zavolan M., Keller W. // *RNA*. 2011. V. 17. № 9. P. 1737–1746.
53. LaCava J., Houseley J., Saveanu C., Petfalski E., Thompson E., Jacquier A., Tollervey D. // *Cell*. 2005. V. 121. № 5. P. 713–724.
54. Ntini E., Järvelin A.I., Bornholdt J., Chen Y., Boyd M., Jørgensen M., Andersson R., Hoof I., Schein A., Andersen P.R., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 8. P. 923–928.
55. Andersen P.R., Domanski M., Kristiansen M.S., Storrval H., Ntini E., Verheggen C., Schein A., Bunkenborg J., Poser I., Hallais M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 12. P. 1367–1376.
56. Lubas M., Christensen M.S., Kristiansen M.S., Domanski M., Falkenby L.G., Lykke-Andersen S., Andersen J.S., Dziembowski A., Jensen T.H. // *Mol. Cell*. 2011. V. 43. № 4. P. 624–637.
57. Lubas M., Andersen P.R., Schein A., Dziembowski A., Kudla G., Jensen T.H. // *Cell Rep*. 2015. V. 10. № 2. P. 178–192.
58. Tummala H., Walne A., Collopy L., Cardoso S., de la Fuente

- J., Lawson S., Powell J., Cooper N., Foster A., Mohammed S., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 5. P. 2151–2160.
59. Moon D.H., Segal M., Boyraz B., Guinan E., Hofmann I., Cahan P., Tai A.K., Agarwal S. // *Nat. Genet.* 2015. V. 47. № 12. P. 1482–1488.
60. Macias S., Cordiner R.A., Gautier P., Plass M., Cáceres J.F. // *Mol. Cell.* 2015. V. 60. № 6. P. 873–885.
61. Nguyen D., Grenier St-Sauveur V., Bergeron D., Dupuis-Sandoval F., Scott M.S., Bachand F. // *Cell Rep.* 2015. V. 13. № 10. P. 2244–2257.
62. Egan E.D., Collins K. // *Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 30. № 11. P. 2775–2786.
63. Cristofari G., Adolf E., Reichenbach P., Sikora K., Terns R.M., Terns M.P., Lingner J. // *Mol. Cell.* 2007. V. 27. № 6. P. 882–889.
64. Venteicher A.S., Abreu E.B., Meng Z., McCann K.E., Terns R.M., Veenstra T.D., Terns M.P., Artandi S.E. // *Science.* 2009. V. 323. № 5914. P. 644–648.
65. Stern J.L., Zyner K.G., Pickett H.A., Cohen S.B., Bryan T.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 32. № 13. P. 2384–2395.
66. Рубцова М.П., Василькова Д.П., Малявко А.Н., Нарайкина Ю.В., Зверева М.Э., Донцова О.А. // *Acta Naturae.* 2012. T. 4. № 2. С. 44–61.

УДК 578.282

Терапия ВИЧ-инфекции: методы и перспективы

М. М. Прокофьева*, С. Н. Кочетков, В. С. Прасолов

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

*E-mail: m.prokofjeva@gmail.com

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Поступила в редакцию 14.04.2016

Принята к печати 14.07.2016

РЕФЕРАТ Вирус иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) является возбудителем одного из самых опасных заболеваний – синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). За 30 лет, прошедших с момента открытия вируса, разработан ряд препаратов, действие которых направлено на подавление различных стадий жизненного цикла ВИЧ-1. Этот подход позволяет подавить репликацию вируса, что существенно продлевает жизнь ВИЧ-инфицированных. К недостаткам этого метода относится возникновение у вируса устойчивости ко многим препаратам, что требует создания новых лекарственных средств, эффективных против устойчивых форм вируса. В настоящее время изучают возможности таких принципиально новых подходов к терапии СПИД, как использование нейтрализующих антител, редактирование генома и блокирование латентной формы интегрированного провируса. В представленном обзоре рассмотрен традиционный подход с использованием ингибиторов ВИЧ-1, а также перспективы других вариантов терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ВИЧ-1, ингибиторы жизненного цикла вируса, редактирование генома, антивирусная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ОТ – обратная транскриптаза; НИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ННИОТ – нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы; ВААРТ – высокоактивная антиретровирусная терапия; LTR – длинный концевой повтор.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка подходов к терапии ВИЧ-инфекции представляет одну из наиболее важных задач биомедицинской химии. Применяемые в настоящее время лекарственные препараты направлены на подавление одной из ключевых стадий развития инфекции – первичного контакта вируса с клеткой, проникновения, синтеза ДНК-провируса, его переноса в ядро и интеграцию в геном клетки-хозяина, синтеза и созревания новых вирионов [1]. Высокая изменчивость ВИЧ-1, вызванная тем, что обратная транскриптаза (ОТ) ВИЧ-1 не обладает корректирующей экзонуклеазной активностью, вследствие чего транскрипция всегда происходит с ошибками, приводит к образованию множества мутантных форм вируса, часть из которых лекарственно-устойчивые [2]. Поскольку лекарственно-устойчивые формы вируса постоянно образуются в организме ВИЧ-инфицированных и обнаруживаются, в том числе у так называемых первичных пациентов, ранее не принимавших анти-ВИЧ-препараты, поиск средств, эффективно подавляющих мутантные формы ВИЧ-1, остается актуальным.

ИНГИБИТОРЫ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА

Жизненный цикл ВИЧ-1

Жизненный цикл ВИЧ-1 схематично изображен на *рис. 1А*. Первичный контакт вируса с незараженной клеткой осуществляется за счет неспецифического связывания с гепарансульфатами, расположенными на поверхности клеточной мембраны. После первичного контакта белки оболочки вируса специфически взаимодействуют с поверхностными белками клетки (рецепторами). Рецептором ВИЧ-1 является CD4, T-клеточный рецептор, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов, с которым взаимодействуют гликопротеины оболочки вируса – gp120 и gp41. В качестве корецепторов ВИЧ-1 использует хемокиновые рецепторы CCR5 и CXCR4 [3]. Мутации в гене CCR5 могут существенно влиять на инфекционный процесс. Так, делеция 32 п.н. в кодирующей области гена CCR5 ($\Delta 32$ CCR5) приводит к тому, что в клетке синтезируется укороченная форма CCR5, которая не экспонируется на поверхности клеточной мембраны. Такие клетки устойчивы к штаммам ВИЧ-1, которые в качестве корецептора

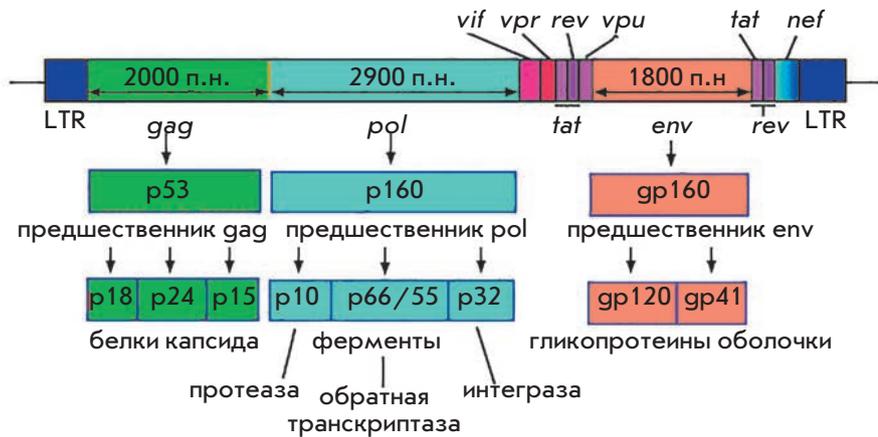
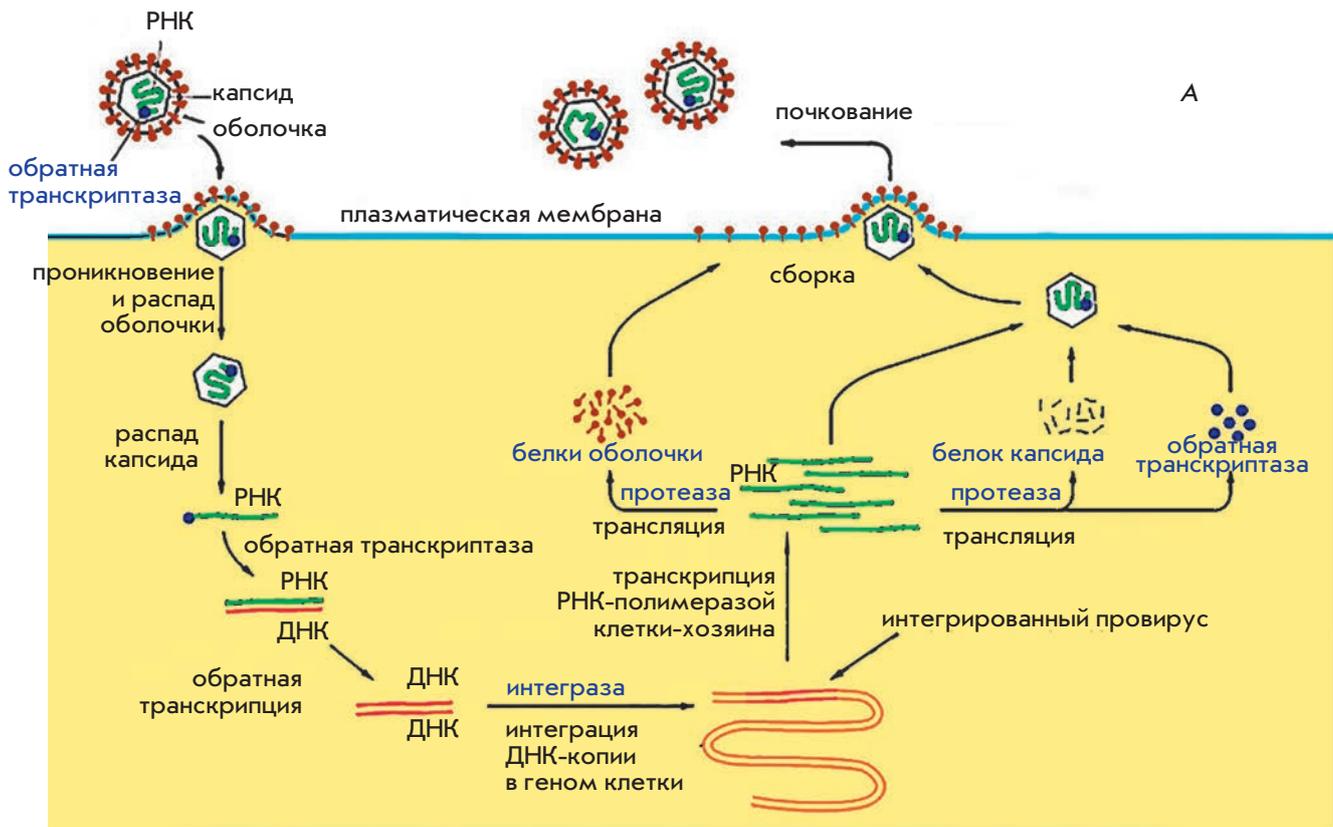


Рис. 1. Жизненный цикл (А) и строение генома ВИЧ-1 (Б)

используют CCR5 (R5-штаммы) [4, 5]. Мутации в гене CXCR4, приводящие к устойчивости клеток к заражению, в настоящее время не обнаружены.

В результате слияния клеточной и вирусной мембраны капсид попадает в цитоплазму и разрушается. За этим следует обратная транскрипция – синтез ДНК-копии на матрице вирусной геномной РНК, которая сопровождается деградацией РНК и синтезом второй цепи ДНК. Все три стадии осуществляет один фермент – РНК-зависимая ДНК-полимераза, вхо-

дящая в состав вирусного нуклеокапсида. Конечный продукт полимеразной реакции – двухцепочечный ДНК-провирус – содержит все вирусные гены и фланкирован длинными 3'- и 5'-концевыми повторами (long terminal repeat, LTR). В состав LTR входят регуляторные элементы, в том числе промотор и энхансеры, выполняющие важные функции в ходе жизненного цикла ретровируса.

ДНК-провирус встраивается в геном зараженной клетки, что необходимо для последующей репли-

кации вирусного генома и постоянной экспрессии в зараженных клетках. В интеграции участвует прединтеграционный комплекс (PIC), состоящий из вирусной интегразы, ОТ и ряда клеточных белков [6]. С момента интеграции встроенный ДНК-провирус ведет себя как часть клеточного генома, являясь самостоятельной транскрипционной единицей. Последующую транскрипцию интегрированного провируса, а также процессинг и сплайсинг новосинтезированной вирусной РНК осуществляют клеточные ферменты. Синтезированная вирусная РНК подвергается альтернативному сплайсингу. С дважды сплайсированной РНК транслируются вспомогательные белки ВИЧ-1 – Tat, Rev, Vpr, Vpr, Vif (рис. 1Б). Со сплайсированной 1 раз РНК синтезируются регуляторный белок Nef и предшественник белка оболочки Env, необходимые на поздних стадиях жизненного цикла вируса. Несплайсированная вирусная РНК включается в капсиды вновь образующихся вирусных частиц, а также служит матрицей для синтеза белков-предшественников Gag и Gag/Pol, кодируемых генами *gag* (структурные белки – матриксный MA (p17), капсидный CA (p24) и нуклеокапсидный NC (p7) и *pol* (вирусные ферменты – обратная транскриптаза (p66/51), интеграза (p32) и протеаза (p10)). Изначально вирус формируется как неинфекционный незрелый вирион, который отпочковывается от мембраны инфицированной клетки. После отпочковывания происходит созревание вируса, в процессе которого белки-предшественники расщепляются вирусной протеазой, а продукты расщепления занимают свое функциональное положение внутри вирусной частицы [7].

Ингибиторы обратной транскриптазы

Большинство используемых лекарственных средств действует на один из ферментов ВИЧ-1: обратную транскриптазу, интегразу или протеазу (табл. 1). Ингибиторы ОТ можно условно разделить на две группы: нуклеозидные и нуклеотидные (НИОТ), и нунуклеозидные (ННИОТ). Аналоги нуклеозидов и нуклеотидов представляют наиболее раннюю группу ингибиторов репликации ВИЧ, одобренных для клинического применения [8] (рис. 2). Эти соединения представляют собой предшественники субстратов фермента, а не активную форму ингибитора. Проникая в клетку, они превращаются (посредством фосфорилирования клеточными киназами) в аналоги нуклеозидтрифосфатов, которые выступают в качестве субстратов при синтезе провирусной кДНК. Встраивание НИОТ в растущую цепь кДНК приводит к терминации обратной транскрипции из-за отсутствия 3'-гидроксильной группы. Таким образом

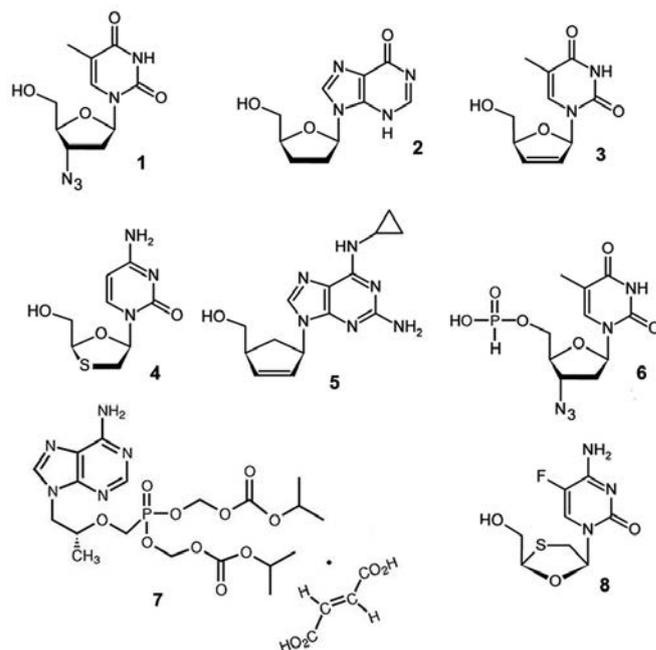


Рис. 2. Нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1. Нумерация соответствует табл. 1

НИОТ блокируют репликацию ВИЧ-1 на ранней стадии жизненного цикла [9–11].

Первым ингибитором этого класса был азидотимидин (Зидовудин) (1). Этот препарат был синтезирован в 1964 году и в течение нескольких лет испытывался как экспериментальный клеточный цитотоксин. После клинических испытаний, проведенных в 1985 году, было показано, что он подавляет как инфекционные, так и цитопатические свойства ВИЧ-1 [12]. К 2015 году FDA было одобрено клиническое использование семи препаратов. Один препарат – Никавир (6), созданный академиком А.А. Краевским и сотрудниками в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, разрешен к применению в 1999 году и широко применяется в России и странах СНГ. Каждый из нуклеозидных аналогов специфично конкурирует с одним из клеточных нуклеозидтрифосфатов: AZT, Никавир (6) и ставудин (d4T) (3) – с dTTP, эмтрицитабин (FTC) (8) и ламивудин (3TC) (4) – с dCTP, диданозин (ddI) (2) и тенофовир (TDF) (7) – с dATP, а абакавир (ABC) (5) – с dGTP [13–17].

Некоторые НИОТ обладают высокой стабильностью внутри клетки, что позволяет осуществлять длительное ингибирование вируса [8].

Нуклеотидные ингибиторы, в отличие от нуклеозидных, уже фосфорилированы, и после проникновения в клетку им требуется на одну стадию фосфорилирования меньше. Как и нуклеозидные ингибиторы,

Таблица 1. Анти-ВИЧ-препараты, разрешенные к применению*

Русское название	Латинское название	Коммерческое название	Одобрено FDA
Нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ, NRTI)			
Зидовудин (1)	Zidovudine (azidothymidine, AZT, ZDV)	Retrovir	19/03/1987
Диданозин (2)	Didanosine (dideoxyinosine, ddI)	Videx	09/10/1991
	Delayed-release didanosine, enteric-coated didanosine, ddI EC)	Videx EC	31/10/2000
Ставудин (3)	Stavudine (d4T)	Zerit	24/06/1994
Ламивудин (4)	Lamivudine (3TC)	EpiVir	17/11/1995
Абакавир (5)	Abacavir (ABC)	Ziagen	17/12/1998
Фосфазид (6)	Азидотимидин Н-фосфонат	Никавир	05/10/1999**
Тенофовир (7)	Tenofovir disoproxil fumarate (tenofovir DF, TDF)	Viread	26/10/2001
Эмтрицитабин (8)	Emtricitabine (FTC)	Emtriva	02/07/2003
Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ, NNRTI)			
Невирапин** (9)	Nevirapine (NVP)	Viramune	21/06/1996
Невирапин XR*** (10)	Extended-release nevirapine (NVP XR)	Viramune XR	25/03/2011
Делавирдин (11)	Delavirdine (delavirdinemesylate, DLV)	Rescriptor	04/04/1997
Эфавиренз (12)	Efavirenz (EFV)	Sustiva	17/09/1998
Этравирин (13)	Etravirine (ETR)	Intelence	18/01/2008
Рилпивирин (14)	Rilpivirine (RPV)	Edurant	20/05/2011
Ингибиторы протеазы (ИП, PI)			
Саквинавир (15)	Saquinavir (SQV)	Invirase	06/12/1995
Ритонавир (16)	Ritonavir (RTV)	Norvir	01/03/1996
Индинавир (17)	Indinavir (IDV)	Crixivan	13/03/1996
Нелфинавир (18)	Nelfinavir (NFV)	Viracept	14/03/1997
Атазанавир (19)	Atazanavir (ATV)	Reyataz	20/06/2003
Фосампренавир (20)	Fosamprenavir (FOS-APV, FPV)	Lexiva	20/10/2003
Типранавир (21)	Tipranavir (TPV)	Aptivus	22/06/2005
Дарунавир (22)	Darunavir (DRV)	Prezista	23/06/2006
Ингибиторы интегразы (INI)			
Ралтегравир (23)	Raltegravir (RAL)	Isentress	12/10/2007
Долутегравир (24)	Dolutegravir (DTG)	Tivicay	13/08/2013
Элвитегравир (25)	Elvitegravir (EVG)	Vitekta	24/09/2014
Прочие			
Энфувиртид**** (26)	Enfuvirtide (T-20)	Fuzeon	13/03/2003
Маравирук***** (27)	Maraviroc (MVC)	Selzentry	06/08/2007
Кобицистат***** (28)	Cobicistat, Tybost (COBI)	Tybost	24/09/2014

*Порядковые номера соединений соответствуют номерам на рисунках.

**Одобен к применению в Российской Федерации.

***Невирапин с пролонгированным сроком действия.

****Ингибитор слияния.

*****Ингибитор взаимодействия вирус-корцептор.

*****Фармакокинетический усилитель действия атазанавира (19) или дарунавира (22).

нуклеотидные аналоги работают как терминаторы растущей цепи ДНК. Фосфонатная группа, которую они содержат, не может отщепляться клеточными гидролазами, а это значительно затрудняет выщепление встроившихся в растущую цепь ДНК нуклеотидных аналогов 3'-5'-экзонуклеазами по сравнению

с нуклеозидными. Единственный нуклеотидный ингибитор, применяемый в анти-ВИЧ-терапии, – тенофовир (7) [1].

Дизайн и синтез новых нуклеозидных и нуклеотидных аналогов – предмет работы многих исследователей, разрабатывающих препараты против

ВИЧ-1. Новые нуклеозидные аналоги необходимы, потому что в ОТ ВИЧ-1 возникают точечные мутации, сообщающие вирусу лекарственную устойчивость. Клинические исследования показали, что у инфицированных ВИЧ-1, получавших только АЗТ в течение полугода, заметно снижалась чувствительность к препарату [18]. Существуют штаммы вируса, полностью резистентные к действию АЗТ и других нуклеозидных аналогов [19–21].

Известны два варианта механизма, вызывающего устойчивость ОТ к нуклеозидным ингибиторам. Первый – уменьшение сродства к искусственным субстратам относительно природных субстратов. Второй – увеличение уровня фосфоролитического выщепления встроенного в цепь терминатора [22, 23]. ОТ ВИЧ-1 несмотря на то, что не обладает 3'-экзонуклеазной активностью, способна катализировать реакцию пирофосфоролиза, обратную реакции полимеризации [24].

Ненуклеозидные ингибиторы ОТ (рис. 3) – это неконкурентные ингибиторы, которые связываются в так называемом гидрофобном кармане вблизи каталитического центра фермента. В силу своей гидрофобности ННИОТ способны попадать в клетку и не требуют никаких дополнительных реакций [25]. Одобрено клиническое применение пяти препаратов этой группы: невирапина (**10**), делавирдина (**11**), эфавиренза (**12**), этравирина (**13**) и рилпивирина (**14**). Первым препаратом этой группы, утвержденным в качестве лекарственного средства в 1996 году, стал

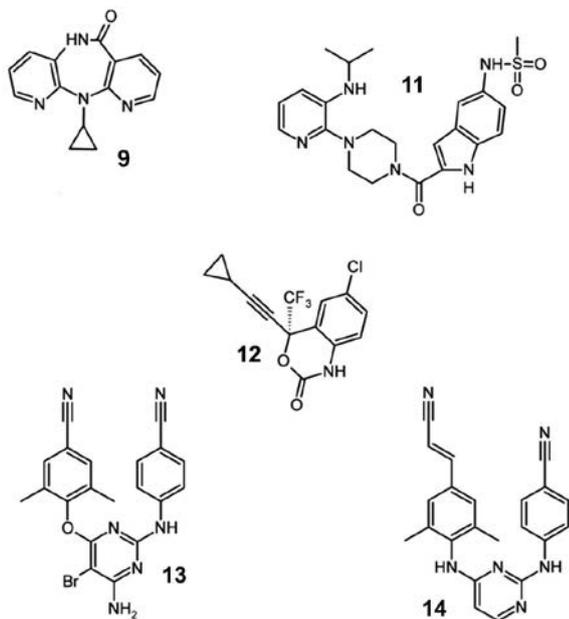


Рис. 3. Ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы ВИЧ-1

невирапин [26]. Сейчас этот препарат редко назначают, поскольку широко распространены мутантные формы ВИЧ-1, устойчивые к действию невирапина. Из препаратов этой группы первичным пациентам в настоящее время наиболее часто назначают эфавиренз [27].

ННИОТ имеют различную химическую структуру, сходно только их действие на фермент. Ингибиторы этой группы специфичны к ОТ ВИЧ-1 и не активны в отношении других ретровирусов.

Изначально полагали, что ННИОТ связываются только с фермент-субстратным комплексом [28]. Позже показали, что ННИОТ связываются с ОТ независимо от субстрата [29, 30], однако некоторые из них обладают повышенным сродством к ферменту в присутствии субстрата [31]. При этом ННИОТ не только не препятствуют связыванию субстрата в активном центре, но даже способствуют ему [32, 33]. Эта особенность позволяет использовать ННИОТ совместно с НИОТ. Показано, что ННИОТ также способны подавлять активность РНКазы Н в составе ОТ [34].

Большинство мутаций, придающих устойчивость к ННИОТ, находятся в сайте связывания ННИОТ. Всего обнаружено более 40 мутаций, которые *in vivo* и *in vitro* делают ОТ устойчивой к ННИОТ. Однако, если такие давно используемые препараты, как невирапин, неэффективны против мутантного фермента, то новые препараты, так называемые ННИОТ второго поколения, этравирин или рилпивирин, обладают достаточной ингибиторной активностью против мутантных форм ОТ [35].

Ингибиторы протеазы ВИЧ-1

Второе место по клиническому использованию после ингибиторов ОТ занимают ингибиторы протеазы (рис. 4). Большинство этих соединений представляют

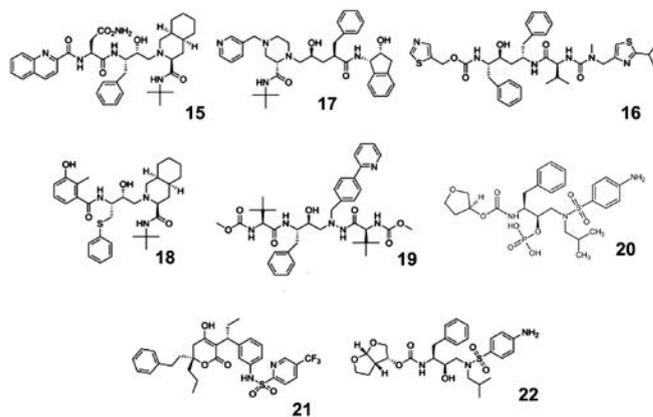


Рис. 4. Ингибиторы протеазы ВИЧ-1

собой пептидомиметики, которые действуют по одному и тому же принципу, связываясь с активным центром фермента. В отличие от природной мишени, ингибиторы не подвержены протеолитическому расщеплению, поскольку вместо пептидных связей $[-NH-CO-]$ содержат гидроксиэтиленовые $[-CH_2-CH(OH)-]$. Связываясь с ферментом в его активном центре, они конкурируют с природными субстратами протеазы и препятствуют ее функционированию, что приводит к резкому снижению протеолитического процессинга вирусных белков [36–38]. Первым из ингибиторов этой группы стал саквинавир (15) [39]. В настоящее время используются восемь ингибиторов протеазы, это самая многочисленная группа одобренных ингибиторов ВИЧ-1 (15–22). Механизм, вызывающий устойчивость ВИЧ-1 к действию ингибиторов протеазы, заключается в замене аминокислотного остатка в вирусной протеазе, что приводит к снижению сродства к ингибитору, в то время как природные субстраты продолжают взаимодействовать с лекарственно-устойчивой протеазой [40]. Изменение сродства к природным субстратам также ухудшает эффективность самой протеазы. Как следствие, в лекарственно-устойчивых формах вируса возникают компенсаторные мутации, направленные на реорганизацию эффективности фермента, не влияющие непосредственно на устойчивость к ингибитору [41].

Ингибиторы интегразы ВИЧ-1

Активная разработка ингибиторов этой группы началась с 2000 года, когда было показано, что дикетонные органические кислоты, например препарат L-731,988, ингибируют интеграцию и репликацию ВИЧ-1 в культуре клеток, в частности, стадию встраивания ДНК-провируса в клеточную геномную ДНК [42]. Это стало первым указанием на то, что ингибиторы интегразы могут стать потенциальными противовирусными препаратами. Первым ингибитором интегразы, одобренным в 2007 году в качестве лекарственного средства, был ралтегравир (Isentress®) (23). Ралтегравир показал очень высокую эффективность и быстро стал одним из самых часто используемых препаратов [43–45]. Сейчас используются три препарата этой группы: ралтегравир, долутегравир (24) и элвитегравир (25) (рис. 5), которые связываются с комплексом интеграции и препятствуют встраиванию ДНК-провируса в геномную ДНК.

Ингибиторы проникновения вируса в клетку

Помимо ингибиторов ферментов ВИЧ-1, разрабатываются ингибиторы, действующие на других стадиях жизненного цикла вируса. Ингибиторы проникновения вируса в клетку, применяемые

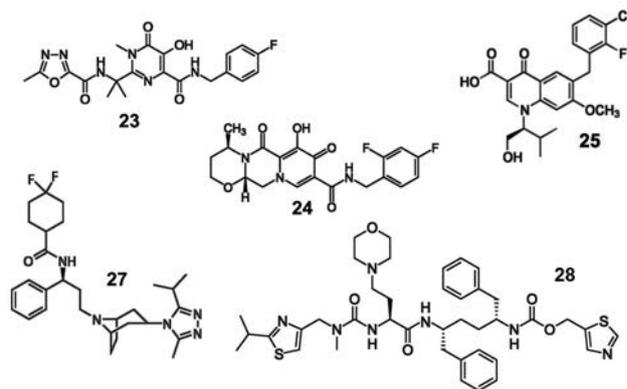


Рис. 5. Прочие ингибиторы жизненного цикла ВИЧ

при ВИЧ-инфекции, можно разделить на два вида: ингибиторы слияния мембран вируса и клетки и ингибиторы связывания белков оболочки вируса с рецепторами.

В настоящее время известен только один ингибитор слияния, одобренный в качестве лекарственного средства – энфувиртид (Fuzeon®) (26) (рис. 6). Это синтетический полипептид, состоящий из 36 аминокислотных остатков, последовательность которых гомологична участку трансмембранного гликопротеина оболочки ВИЧ-1 gp41, состоящему из гептадных повторов, потому энфувиртид способен с ним взаимодействовать [46, 47]. Вследствие этого взаимодействия изменяется конформация gp41, что предотвращает слияние вируса с клеткой. Энфувиртид – единственный синтетический полимер из всех одобренных препаратов против ВИЧ-1, что обуславливает его высокую стоимость. Энфувиртид выпускается в виде инъекционной формы, он вводится дважды в день, что затрудняет его использование.

Ингибиторы связывания белков оболочки ВИЧ-1 с рецепторами должны взаимодействовать с одним из корецепторов, CCR5 или CXCR4, с которыми взаимодействует частица ВИЧ-1 при контакте с клеткой. В настоящее время эта группа представлена только препаратом маравирик (Selzentry®) (27) (рис. 5), который взаимодействует с корецептором CCR5 [48]. Разрабатываются и другие ингибиторы этой группы. Главный недостаток ингибиторов CCR5 – неспособность воздействовать на X4-штаммы ВИЧ-1, которые используют корецептор CXCR4 [1].

В качестве потенциальных антивирусных препаратов рассматриваются полисахариды из морских водорослей, а также производные хитозана. Эти соединения, действующие на стадии проникновения вируса в клетку, показали свою эффективность против

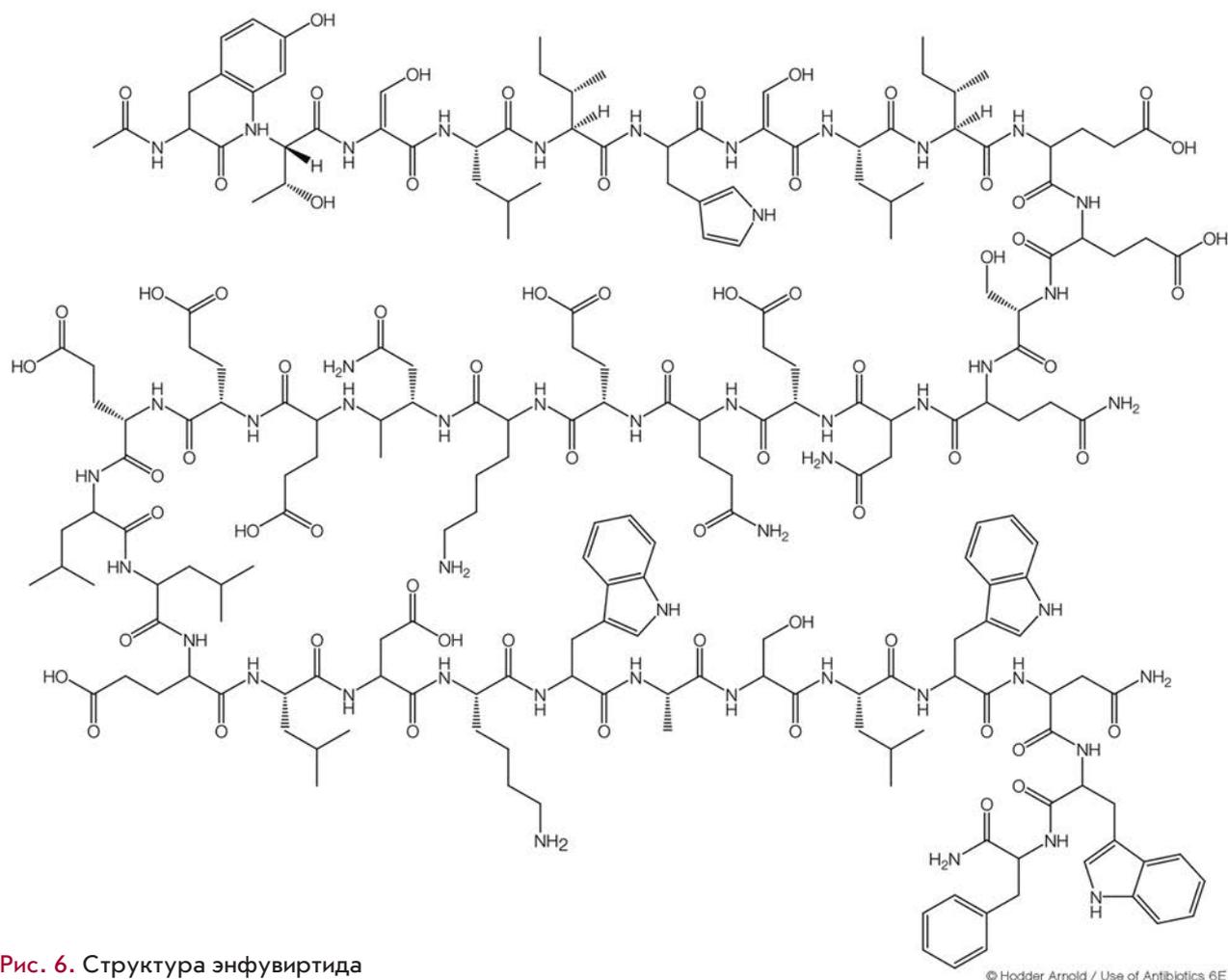


Рис. 6. Структура энфувиртида

ВИЧ-1 и других ретровирусов *in vitro*, но они не приняты в настоящее время в качестве лекарственных средств, поскольку не обладают гомогенным составом и четко определяемой структурой [49]. Сульфатированные полисахариды по своей структуре близки к гепарансульфатам – первичным неспецифическим клеточным рецепторам, с которыми взаимодействует ВИЧ-1. Предположительно, они связываются с белком оболочки ВИЧ-1 и препятствуют его взаимодействию с рецепторами на поверхности клетки. Как правило, полисахариды с высокой молекулярной массой и степенью сульфатирования обладают более выраженной противовирусной активностью [50].

К клиническому применению разрешен еще один препарат – кобицистат (28). В отличие от перечисленных выше соединений, кобицистат не является ингибитором какой-либо стадии жизненного цикла ВИЧ-1. Кобицистат действует как фармакокинетический усилитель (энхансер) действия атазанавира или да-

рунавира, он используется в качестве добавки к коктейлям, применяемым в терапии ВИЧ-инфекции.

Высокоактивная антиретровирусная терапия

В терапии ВИЧ-инфекции обычно используют сочетание разных групп ингибиторов. Сначала это были нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы в сочетании с нуклеозидными ингибиторами обратной транскриптазы и ингибиторами протеазы. Этот метод получил название высокоактивной антиретровирусной терапии (ВААРТ). Комбинация трех или более ингибиторов позволяет снизить дозу каждого из них, увеличивает эффективность благодаря одновременному воздействию на несколько стадий жизненного цикла ВИЧ-1 и уменьшает вероятность возникновения новых форм вируса с лекарственной устойчивостью. Применение в коктейле двух типов ингибиторов одного фермента – ОТ – объясняется направленностью этих ингибиторов на разные функциональные участки фермента, что предопределя-

Таблица 2. Комбинации препаратов (коктейли), применяемые в комплексной терапии ВИЧ-инфекции

Состав	Коммерческое название	Одобрено FDA
Ламивудин/Зидовудин (3TC / ZDV)	Combivir	27/9/1997
Абакавир/Ламивудин/ Зидовудин (ABC / 3TC / ZDV)	Trizivir	14/11/ 2000
Абакавир/Ламивудин (ABC/3TC)	Epzicom	2/8/2004
Эмтрицитабин / Тенофовир (FTC / TDF)	Truvada	2/8/2004
Эфавиренз/Эмтрицитабин/Тенофовир (EFV / FTC / TDF)	Atripla	12/6/2006
Эмтрицитабин/Рилпивирин/Тенофовир (FTC / RPV / TDF)	Complera	10/8/2011
Элвитеграви́р/Кобицистат/Эмтрицитабин/Тенофовир (QUAD, EVG / COBI / FTC / TDF)	Stribild	27/8/2012
Абакавир/Долутеграви́р/ Ламивудин (ABC/DTG/3TC)	Triumeq	22/8/ 2014
Атазана́вир/Кобицистат (ATV / COBI)	Evotaz	29/1/2015
Даруна́вир/Кобицистат (DRV / COBI)	Prezcobix	29/1/2015
Элвитеграви́р/Кобицистат/Эмтрицита́бин/Тенофови́р алафена́мид (EVG / COBI / FTC / TAF)	Genvoya	5/11/2015

ет усиленное блокирование его функции. В табл. 2 приведены разрешенные коктейли анти-ВИЧ-препаратов, применяемых при ВААРТ.

ДРУГИЕ ПОДХОДЫ К ЛЕЧЕНИЮ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

За последние 25 лет внимание исследователей было сосредоточено в основном на развитии и оптимизации препаратов, направленных на подавление репликации ВИЧ-1. Применяемая антивирусная терапия, в том числе ВААРТ, имеет свои ограничения. Пациенты вынуждены принимать препараты в течение всей жизни, при этом появляются новые мутантные формы вируса, обладающие устойчивостью к широкому спектру лекарственных препаратов. При длительной терапии возможно развитие накопительного токсического эффекта применяемых препаратов. Многие специалисты сходятся во мнении, что нужен новый подход, при котором постоянной ремиссии можно добиться при более щадящем вмешательстве. Кроме того, ингибиторы жизненного цикла подавляют ВИЧ-1 только в клетках, в которых происходит активное размножение вируса, но они не действуют на вирус, находящийся в латентном состоянии. Копии вирусного генома встраиваются в геном Т-клеток памяти (CD4⁺ Т-клетки) и остаются невидимыми для иммунной системы [51, 52]. Индукция транскрипции в таких клетках приводит к образованию инфекционных вирусных частиц [53].

В качестве альтернативного варианта рассматривается создание вакцины против ВИЧ-1. Первая вакцина была разработана в начале 2000-х, однако, эффект вакцинации был намного ниже эффекта классических анти-ВИЧ-препаратов [54, 55]. В настоящее время проводятся клинические испытания активности так называемых нейтрализующих антител

широкого спектра. Результаты предварительных исследований позволяют предположить, что нейтрализующие антитела могут стать перспективным анти-ВИЧ-препаратом [56, 57].

В настоящее время изучается возможность воздействия на вирус, находящийся в латентном состоянии. Существуют два варианта стратегии, названные стерилизующим и функциональным лечением. Под стерилизующим лечением понимается полное очищение организма от вирусного генома путем уничтожения клеток, несущих интегрированный в их геном провирус; под функциональным – полное подавление активности вируса в организме, включающее блокирование реактивации провируса, находящегося в латентном состоянии.

Один из вариантов стерилизующей терапии – пересадка костного мозга от доноров, устойчивых к ВИЧ-инфекции (например, несущих в своем геноме мутантный ген одного из корецепторов ВИЧ-1, Δ32 CCR5). В 2009 году показали, что таким методом можно полностью излечить человека от ВИЧ-инфекции, т.е. удалить из организма все копии вирусного генома. Этот случай получил название «берлинский пациент» [58]. Пациент прошел радиационную терапию и пересадку костного мозга от донора с Δ32 CCR5, в дальнейшем после отмены анти-ВИЧ-терапии вирус в его организме не обнаруживался. Вначале этот случай вызвал большой оптимизм у медиков, однако к настоящему времени есть примеры, когда данный подход не оказал ожидаемого эффекта, потому поиски других методов терапии продолжаются.

Выведение провируса из латентного состояния

Один из вариантов стерилизующей терапии – «включение» провирусов, находящихся в латентном

состоянии. Лекарственные препараты, способные выводить провирус из латентного состояния, теоретически могут последовательно индуцировать транскрипцию генома ВИЧ-1, синтез вирусных белков и появление инфекционных частиц ВИЧ-1, что приведет к гибели инфицированной клетки и уменьшит количество копий латентной формы ВИЧ-1 в геноме человека. Этот подход получил название «shock and kill». Предполагается, что клетки, несущие копии вирусного генома, либо погибнут в результате цитопатического действия вируса, либо будут уничтожены в результате действия иммунной системы. При использовании этого подхода необходима поддерживающая терапия ингибиторами ВИЧ-1, чтобы предотвратить распространение реактивированного вируса.

В качестве возможных препаратов изучали вориностат – ингибитор гистондеацетилазы, используемый в терапии опухолей [59]. На клетках, полученных от больных, и в дальнейших клинических испытаниях показано, что ингибитор может индуцировать транскрипцию вирусных генов у части пациентов. В то же время вориностат обладает цитотоксичностью, а поскольку он эффективен не во всех случаях, то широкое клиническое применение этого препарата в настоящее время проблематично. Проводятся клинические испытания и других ингибиторов гистондеацетилазы [60, 61].

Этот подход имеет не менее двух недостатков. Первый – возможность побочных эффектов в виде неспецифической индукции транскрипции генов хозяйской клетки. Второй – невозможно предсказать, погибнут ли все клетки с индуцированным провирусом. Есть данные, что иммунная система распознает не все подобные клетки [62]. Для развития этого подхода необходимо дополнительно разработать метод эффективного уничтожения клеток, несущих в себе активированный провирус.

Параллельно с изучением возможности «стерилизации» организма от всех копий провируса ведутся работы по поиску функционального лечения, не требующего полного удаления всех копий вирусного генома, но эффективно подавляющего его потенциальную активность, чтобы не требовалось постоянно применять ингибиторы жизненного цикла ВИЧ-1.

Ингибирование транскрипции интегрированного провируса

Одной из возможных терапевтических мишеней является белок Tat ВИЧ-1 и комплекс Tat/TAR/P-TEFb. Tat – один из регуляторных белков ВИЧ-1, активатор транскрипции. Tat связывается с так называемой областью TAR – участком длиной 60 нуклеотидов, расположенным на 5'-конце растущей цепи РНК, при транскрипции, не влияя на инициа-

цию транскрипции, но увеличивая процессивность РНК-полимеразы и тем самым многократно усиливая транскрипцию. Киназа Р-TEFb, третий компонент комплекса, также может служить мишенью для терапии. Ингибирование формирования и активности этого комплекса будет приводить к снижению уровня транскрипции и препятствовать реактивации провируса [63, 64]. В настоящее время разрабатываются низкомолекулярные ингибиторы, действующие либо на белок Tat, либо на TAR. Для подбора потенциальных низкомолекулярных ингибиторов используется метод компьютерного моделирования.

Последовательность TAR высококонсервативна среди штаммов ВИЧ-1, потому можно подобрать универсальные препараты, взаимодействующие с TAR. Эффективными блокаторами Tat-зависимой транскрипции являются хинолоны [65, 66]. В настоящее время установлен молекулярный механизм связывания с мишенью только некоторых соединений, показавших ингибиторную активность. Например, 6-аминохинолон WM5 блокирует взаимодействие Tat и TAR, специфически связываясь с TAR. В то же время некоторые производные хинолонов ингибируют Tat-зависимую транскрипцию, но при этом не выявлено их взаимодействия с комплексом TAR/Tat [67].

Существует ряд низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с белком Tat и блокирующим его связывание с TAR. Эти препараты еще не используются в анти-ВИЧ-терапии. В настоящее время один из них, блокатор Tat триптолид, проходит клинические испытания. Триптолид – природное соединение, выделенное из растения *Tripterygium wilfordii*. Показано, что триптолид способствует быстрой дегградации Tat в клетках, препятствуя таким образом Tat-зависимой транскрипции [68].

Редактирование генома

Совершенно новый вариант анти-ВИЧ-1-терапии – генная терапия, включающая редактирование интегрированного провируса с блокированием его дальнейшего функционирования. В 2013 году метод CRISPR/Cas9 использовали на модельных клетках линий HEK293 и HeLa, несущих в геноме экспрессирующую кассету, содержащую ген, кодирующий GFP, и последовательность, кодирующую белок Tat ВИЧ-1, под контролем LTR ВИЧ-1. Показано, что в результате активности системы CRISPR/Cas9, направленной на редактирование последовательности LTR, в клетках линии HEK293 снижается уровень экспрессии GFP. Аналогичные результаты получены и на модельных клетках линии Jurkat, несущих имитацию латентной формы провируса в геноме, что указывает на возможность использования

системы CRISPR/Cas9 для предотвращения репликации латентной формы вируса.

В этой работе показано, что последовательность TAR может использоваться в качестве мишени для редактирования генома системой CRISPR/Cas9 [69]. Другой вероятной мишенью является корцептор ВИЧ-1 CCR5 [70–72].

Однако перед применением этой системы в клинической практике необходимо разработать эффективную систему доставки, а также провести серию доклинических испытаний. Можно утверждать, что этот метод обладает большим потенциалом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антивирусная терапия с использованием ингибиторов ВИЧ-1 остается в настоящее время единственным активно применяемым методом. Использование

в рамках ВААРТ комбинации препаратов, действие которых направлено на подавление разных стадий жизненного цикла ВИЧ-1, позволяет минимизировать недостатки этого подхода, поскольку при ВААРТ снижена вероятность селективного отбора лекарственно-устойчивых форм вируса и требуются меньшие дозы всех препаратов, что уменьшает возможность развития накопительного токсического эффекта. Разрабатываемые новые варианты терапии нуждаются в дальнейшем изучении и проведении клинических испытаний, однако они представляются перспективными для использования в будущем. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных
исследований (грант № 16-34-00989 мол_a).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Clercq E. // Rev. Med. Virol. 2009. V. 19. P. 287–299.
- Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. // Science. 1988. V. 242. № 4882. P. 1171–1173.
- Clapham P.R., McKnight A. // Br. Med. Bull. 2001. V. 58. P. 43–59.
- Benkirane M., Jin D.Y., Chun R.F., Koup R.A., Jeang K.T. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30603–30606.
- Wilkinson D.A., Operskalski E.A., Busch M.P., Mosley J.W., Koup R.A. // J. Infect. Dis. 1998. V. 178. P. 1163–1166.
- Depienne C., Mousnier A., Leh H., Le Rouzic E., Dormont D., Benichou S., Dargemont C. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 18102–18107.
- Ganser-Pornillos B.K., Yeager M., Sundquist W. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. P. 203–217.
- Cihlar T., Ray A.S. // Antiviral Res. 2010. V. 85. P. 39–58.
- Lavie A., Schlichting I., Vetter I.R., Konrad M., Reinstein J., Goody R.S. // Nat. Med. 1997. V. 3. P. 922–924.
- Lavie A., Vetter I.R., Konrad M., Goody R.S., Reinstein J., Schlichting I. // Nat. Struct. Biol. 1997. V. 4. P. 601–604.
- Schneider B., Xu Y. W., Sellam O., Sarfati R., Janin J., Veron M., Deville-Bonne D. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 19. P. 11491–11497.
- Nakashima H., Matsui T., Harada S., Kobayashi N., Matsuda A., Ueda T., Yamamoto N. // Antimicrob. Agents Chemother. 1986. V. 30. № 6. P. 933–937.
- Doong S.L., Tsai C.H., Schinazi R.F., Liotta D.C., Cheng Y.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 19. P. 8495–8499.
- Furman P.A., Davis M., Liotta D.C., Paff M., Frick L.W., Nelson D.J., Dornsife R.E., Wurster J.A., Wilson L.J., Fyfe J.A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. № 12. P. 2686–2692.
- Hoong L.K., Strange L.E., Liotta D.C., Koszalka G.W., Burns C.L., Schinazi R.F. // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 5563–5565.
- Schinazi R.F., McMillan A., Cannon D., Mathis R., Lloyd R.M., Peck A., Sommadossi J.P., St Clair M., Wilson J., Furman P.A., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. № 11. P. 2423–2431.
- Schinazi R.F., Boudinot F.D., Ibrahim S.S., Manning C., McClure H.M., Liotta D.C. // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. V. 36. P. 2432–2438.
- Hooker D.J., Tachedjian G., Solomon A.E., Gurusinge A.D., Land S., Birch C., Anderson J.L., Roy B.M., Arnold E., Deacon N.J. // J. Virol. 1996. V. 70. № 11. P. 8010–8018.
- Cruchaga C., Anso E., Rouzaut A., Martinez-Irujo J.J. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 38. P. 27744–27752.
- Coffin J.M. // Science. 1995. V. 267. № 5197. P. 483–489.
- Larder B.A., Darby G., Richman D.D. // Science. 1989. V. 243. № 4899. P. 1731–1734.
- Goldschmidt V., Marquet R. // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2004. V. 36. № 9. P. 1687–1705.
- Deval J., Courcambeck J., Selmi B., Boretto J., Canard B. // Curr. Drug Metab. 2004. V. 5. № 4. P. 305–316.
- Naeger L.K., Margot N.A., Miller M.D. // Antimicrob. Agents Chemother. 2002. V. 46. № 7. P. 2179–2184.
- de Béthune M. // Antiviral Res. 2010. V. 85. P. 75–90.
- Grob P.M., Wu J.C., Cohen K.A., Ingraham R.H., Shih C.K., Hargrave K.D., McTague T.L., Merluzzi V.J. // AIDS Res. Hum. Retroviruses. 1992. V. 8. № 2. P. 145–152.
- De Clercq E. // Chem. Biodivers. 2004. V. 1. № 1. P. 44–64.
- Debyser Z., Pauwels R., Andries K., Desmyter J., Kukla M., Janssen P.A., De Clercq E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 4. P. 1451–1455.
- Althaus I.W., Chou J.J., Gonzales A.J., Deibel M.R., Chou K.C., Kezdy F.J., Romero D.L., Palmer J.R., Thomas R.C., Aristoff P.A., et al. // Biochemistry. 1993. V. 32. № 26. P. 6548–6554.
- Ren J., Milton J., Weaver K.L., Short S.A., Stuart D.I., Stammers D.K. // Structure. 2000. V. 8. № 10. P. 1089–1094.
- Fletcher R.S., Syed K., Mithani S., Dmitrienko G.I., Parniak M.A. // Biochemistry. 1995. V. 34. № 13. P. 4346–4353.
- Rittinger K., Divita G., Goody R.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. № 17. P. 8046–8049.
- Zhou Z., Madrid M., Evansek J.D., Madura J.D. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. № 49. P. 17253–17260.
- Hang J.Q., Li Y., Yang Y., Cammack N., Mirzadegan T., Klumpp K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. V. 352. № 2. P. 341–350.
- Janssen P.A.J., Lewi P.J., Arnold E., Daeyaert F., de Jonge M., Heeres J., Koymans L., Vinkers M., Guillemont J., Pasquier E., et al. // J. Med. Chem. 2005. V. 48. № 6. P. 1901–1909.

36. Madruga J.V., Cahn P., Grinsztejn B., Haubrich R., Lalezari J., Mills A., Pialoux G., Wilkin T., Peeters M., Vingerhoets J., et al. // *Lancet*. 2007. V. 370. № 9581. P. 29–38.
37. Lazzarin A., Campbell T., Clotet B., Johnson M., Katlama C., Moll A., Towner W., Trottier B., Peeters M., Vingerhoets J., et al. // *Lancet*. 2007. V. 370. № 9581. P. 39–48.
38. Pauwels R. // *Antiviral Res.* 2006. V. 71. № 2–3. P. 77–89.
39. Roberts N.A., Martin J.A., Kinchington D., Broadhurst A.V., Craig J.C., Duncan I.B., Galpin S.A., Handa B.K., Kay J., Kröhn A., et al. // *Science*. 1990. V. 248. № 4953. P. 358–361.
40. Clavel F., Hance A.J. // *N. Engl. J. Med.* 2004. V. 350. № 10. P. 1023–1035.
41. Wensing A.M.J., van Maarseveen N.M., Nijhuis M. // *Antiviral Res.* 2010. V. 85. P. 59–74.
42. Hazuda D.J., Felock P., Witmer M., Wolfe A., Stillmock K., Grobler J.A., Espeseth A., Gabryelski L., Schleif W., Blau C., et al. // *Science*. 2000. V. 287. № 5453. P. 646–650.
43. Grinsztejn B., Nguyen B.Y., Katlama C., Gatell J.M., Lazzarin A., Vittecoq D., Gonzalez C.J., Chen J., Harvey C.M., Isaacs R.D., et al. // *Lancet*. 2007. V. 369. № 9569. P. 1261–1269.
44. Steigbigel R.T., Cooper D.A., Kumar P.N., Eron J.E., Schechter M., Markowitz M., Loutfy M.R., Lennox J.L., Gatell J.M., Rockstroh J.K., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 339–354.
45. Cooper D.A., Steigbigel R.T., Gatell J.M., Rockstroh J.K., Katlama C., Yeni P., Lazzarin A., Clotet B., Kumar P.N., Eron J.E., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 359. № 4. P. 355–365.
46. Matthews T., Salgo M., Greenberg M., Chung J., DeMasi R., Bolognesi D. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. № 3. P. 215–225.
47. Wild C., Greenwell T., Matthews T. // *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1993. V. 9. № 11. P. 1051–1053.
48. Perros M. // *Adv. Antiviral Drug Design*. 2007. V. 5. P. 185–212.
49. Baba M., Snoeck R., Pauwels R., De Clercq E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988. V. 32. № 11. P. 1742–1745.
50. Prokofjeva M.M., Imbs T.I., Shevchenko N.M., Spirin P.V., Horn S., Fehse B., Zvyagintseva T.N., Prassolov V.S. // *Marine Drugs*. 2013. V. 11. № 8. P. 3000–3014.
51. Siliciano J.D., Kajdas J., Finzi D., Quinn T.C., Chadwick K., Margolick J.B., Kovacs C., Gange S.J., Siliciano R.F. // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 727–728.
52. Adams M., Sharmeen L., Kimpton J., Romeo J.M., Garcia J.V., Peterlin B.M., Groudine M., Emerman M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 9. P. 3862–3866.
53. Chun T.W., Stuyver L., Mizell S.B., Ehler L.A., Mican J.A., Baseler M., Lloyd A.L., Nowak M.A., Fauci A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 24. P. 13193–13197.
54. Autran B., Carcelain G., Combadiere B., Debre P. // *Science*. 2004. V. 305. № 5681. P. 205–208.
55. Carcelain G., Autran B. // *Immunol Rev.* 2013. V. 254. № 1. P. 355–371.
56. Shingai M., Donau O.K., Plishka R.J., Buckler-White A., Mascola J.R., Nabel G.J., Nason M.C., Montefiori D., Moldt B., Pognard P., et al. // *J. Exp. Med.* 2014. V. 211. № 10. P. 2061–2074.
57. Caskey M., Klein F., Lorenzi J.C., Seaman M.S., West A.P. Jr., Buckley N., Kremer G., Nogueira L., Braunschweig M., Scheid J.F., et al. // *Nature*. 2015. V. 522. № 7557. P. 487–491.
58. Hutter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S., Mussig A., Allers K., Schneider T., Hofmann J., Kücherer C., Blau O., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360. № 7. P. 692–698.
59. Archin N.M., Liberty A.L., Kashuba A.D., Choudhary S.K., Kuruc J.D., Crooks A.M., Parker D.C., Anderson E.M., Kearney M.F., Strain M.C., et al. // *Nature*. 2012. V. 487. P. 482–485.
60. Rasmussen T.A., Tolstrup M., Brinkmann C.R., Olesen R., Erikstrup C., Solomon A., Winckelmann A., Palmer S., Dinarello C., Buzon M., et al. // *Lancet HIV*. 2014. V. 1. № 1. P. e13–21.
61. Sogaard O.S., Graversen M.E., Leth S., Olesen R., Brinkmann C.R., Nissen S.K., Kjaer A.S., Schleimann M.H., Denton P.W., Hey-Cunningham W.J., et al. // *PLoS Pathog.* 2015. V. 11. № 9. P. e1005142.
62. Shan L., Deng K., Shroff N.S., Durand C.M., Rabi S.A., Yang H.C., Zhang H., Margolick J.B., Blankson J.N., Siliciano R.F. // *Immunity*. 2012. V. 36. № 3. P. 491–501.
63. Jones L.E., Perelson A.S. // *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2007. V. 45. № 5. P. 483–493.
64. Sklar P.A., Ward D.J., Baker R.K., Wood K.C., Gafoor Z., Alzola C.F., Moorman A.C., Holmberg S.D. // *AIDS*. 2002. V. 16. № 15. P. 2035–2041.
65. Cecchetti V., Parolin C., Moro S., Pecere T., Filipponi E., Calistri A., Tabarrini O., Gatto B., Palumbo M., Fravolini A., et al. // *J. Med. Chem.* 2000. V. 43. № 20. P. 3799–3802.
66. Parolin C., Gatto B., Del Vecchio C., Pecere T., Tramontano E., Cecchetti V., Fravolini A., Masiero S., Palumbo M., Palu G. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 3. P. 889–896.
67. Tabarrini O., Stevens M., Cecchetti V., Sabatini S., Dell’Uomo M., Manfroni G., Palumbo M., Pannecouque C., De Clercq E., Fravolini A. // *J. Med. Chem.* 2004. V. 47. № 22. P. 5567–5578.
68. Richter S.N., Palu G. // *Curr. Med. Chem.* 2006. V. 13. № 11. P. 1305–1315.
69. Ebina H., Misawa N., Kanemura Y., Koyanagi Y. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2510.
70. Tebas P., Stein D., Tang W.W., Frank I., Wang S.Q., Lee G., Spratt S.K., Surosky R.T., Giedlin M.A., Nichol G., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 370. № 10. P. 901–910.
71. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.S. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 3. P. 230–232.
72. Wang W., Ye C., Liu J., Zhang D., Kimata J.T., Zhou P. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 12. P. e115987.

УДК 577.1:577.336

Синтетические флуорофоры для визуализации биомолекул в живых системах

В. И. Мартынов*, А. А. Пахомов, Н. В. Попова, И. Е. Деев, А. Г. Петренко

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

*E-mail: vimart@list.ru

Поступила в редакцию 12.12.2015

Принята к печати 26.04.2016

РЕФЕРАТ В последнее десятилетие прогресс в методах визуализации живых систем с помощью флуоресцентных маркеров был в основном связан с обнаружением различных вариантов цветных флуоресцентных белков. Применение этих белков имеет свои ограничения. В ряде случаев предпочтительно использовать флуоресцентные зонды на основе небольших органических молекул. В обзоре рассмотрен арсенал синтетических низкомолекулярных флуорофоров, который перекрывает практически весь спектр от УФ до видимой и ближней инфракрасной области. Приведены данные по сайт-направленным реакциям включения синтетических флуорофоров в целевые клеточные белки. Обсуждается применение низкомолекулярных флуорофоров для решения различных биологических задач, в частности, для определения локальных концентраций ионов и pH в живых системах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА измерение концентрации ионов, измерение локального pH, сайт-направленная реакция, флуорофор, флуоресцентная микроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦКБ – целевой клеточный белок; ФБ – флуоресцентный белок; АГТ – O⁶-алкилгуанинтрансфераза; еДГФР – дигидрофолатредуктаза; ТМП – триметоприм; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндола; NBD – 4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол; дансилхлорид – (5-(диметиламино)нафталин-1-сульфонилхлорид); EDANS – 5-((2-аминоэтил)амино)нафталин-1-сульфоновая кислота; FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии; SRh 101 – сульфородамин 101; BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3a,4a-диаза-s-индацен; FITC – флуоресцеинизотиоцианат; λ_{ex} – максимум возбуждения; λ_{em} – максимум эмиссии; ϵ – коэффициент экстинкции; Φ – квантовый выход.

ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные маркеры, основанные на флуоресценции, давно используются как инструмент для визуализации биомолекул *in vitro*. Флуоресцентное мечение с помощью синтетического флуорофора было впервые описано в 1942 году, когда с использованием флуоресцеинизотиоцианата (FITC) получили меченые антитела против пневмококков [1]. Вплоть до 1980-х годов флуоресцентное мечение применялось в основном для анализа фиксированных биологических образцов. За последнее двадцатилетие разработан ряд методов, позволяющих включать флуоресцентные метки в живые объекты [2], в частности, в виде генетически кодируемых химер целевых клеточных белков (ЦКБ) с GFP-подобными флуоресцентными белками (ФБ) [3–5]. Однако в ряде случаев для анализа живых систем необходимы низкомолекулярные флуоресцентные зонды [6, 7] и на-

правленная модификация ими ЦКБ [8, 9]. Основное преимущество этих флуорофоров – их небольшой размер и доступность соединений с заданными химическими и фотофизическими свойствами.

Возможность применения каждого конкретного флуорофора определяется его химическими (реакционная способность, растворимость, липофильность, pK_a , стабильность) и фотофизическими (максимум возбуждения (λ_{ex}), максимум эмиссии (λ_{em}), коэффициент экстинкции (ϵ), квантовый выход (Φ), время жизни в возбужденном состоянии, фотостабильность) свойствами. Наиболее универсальный параметр, определяющий чувствительность метода для различных флуорофоров, – произведение коэффициента экстинкции и квантового выхода ($\epsilon \times \Phi$). Эта величина прямо пропорциональна яркости и учитывает количество поглощенного света и эффективность эмиссии флуорофора.

СВОЙСТВА СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ

Флуорофоры с эмиссией флуоресценции в УФ- и синей области спектра

Флуорофоры с эмиссией в УФ-области спектра не так часто применяются для мечения объектов живых систем, поскольку УФ-свет для них токсичен. Кроме того, флуоресцентные сигналы этих меток сложно отличить от автофлуоресценции самой клетки. Классический пример флуорофоров с эмиссией в ближней УФ-области спектра – производные пирена (рис. 1), которые характеризуются $\lambda_{ex} = 340$ нм, $\lambda_{em} = 376$ нм, высокими значениями квантового выхода $\Phi = 0.75$, химической устойчивостью и большими временами жизни флуоресценции, что позволяет молекулам флуорофора образовывать эксимеры с батохромным сдвигом в спектрах эмиссии. Эти свойства пиренов используются для мониторинга конформационных изменений в структуре белков [10], а также для определения концентрации ионов некоторых металлов [11, 12]. Производные пирена, такие, как 8-гидрокси-1,3,6-пирентрисульфонат (пиранин, рис. 1), применяют в качестве рН-индикаторов, а также сенсоров ионов Cu^+ [13]. Производное 8-О-карбоксиметилпиранин имеет $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 401.5/428.5 нм и $\epsilon = 2.5 \times 10^4 M^{-1}cm^{-1}$ (405 нм). Этот флуорофор может использоваться в качестве яркой, фотостабильной метки, излучающей в фиолетовой области спектра, для многоцветного мечения клеточных объектов [14].

Флуоресцентные маркеры, основанные на производных кумарина, широко используются в качестве хемосенсоров и в мечении биомолекул [15, 16]. Введение заместителя в 7-й позиции кумарина позволяет получить флуорофоры с эмиссией в видимой области спектра, например, 7-гидрокси-4-метилкумарин (рис. 2). Этот флуорофор имеет $\lambda_{ex} = 360$ нм, $\lambda_{em} = 450$ нм, $\epsilon = 1.7 \times 10^3 M^{-1}cm^{-1}$ и $\Phi = 0.63$. Производные 7-гидроксикумарина служат внутриклеточным флуоресцентным сенсором фосфатазной активности, а его смешанные карбонаты используют для определения липазной и эстеразной активностей [17, 18]. Родственное соединение

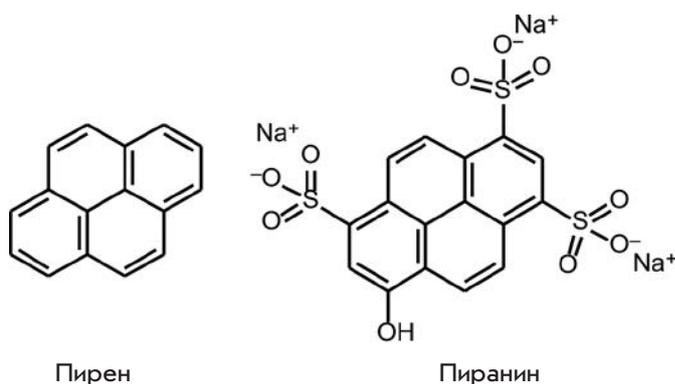


Рис. 1. Флуорофоры на основе конденсированных ароматических соединений с эмиссией в УФ- и синей области спектра



7-гидрокси-4-метилкумарин 7-амино-4-метилкумарин

Рис. 2. Флуорофоры на основе производных кумарина

7-амино-4-метилкумарин (рис. 2) проявляет такие же спектральные свойства, как и гидрокси-производное при значениях рН выше 5.

Производное индола 4',6'-диамидино-2-фенилиндол (DAPI; рис. 3) впервые синтезировали в 1971 году в лаборатории Отто Данна в поисках лекарств против трипаносомоза. Это соединение оказалось неудачным в качестве лекарственного средства, но обладало способностью связываться с ДНК [19]. Поскольку связывание DAPI с ДНК сопровождается значительным увеличением флуоресценции в синей области спектра (в связанном с ДНК виде $\lambda_{em} = 461$ нм), этот маркер широко используется для мечения ДНК в живой клетке [20]. Недавно показали, что при освещении УФ-светом либо лазером с длиной волны 405 нм DAPI претерпевает фотопревращение [21, 22]. При возбуждении фотоконвертированной формы DAPI с помощью аргонового лазера при 458 нм мак-

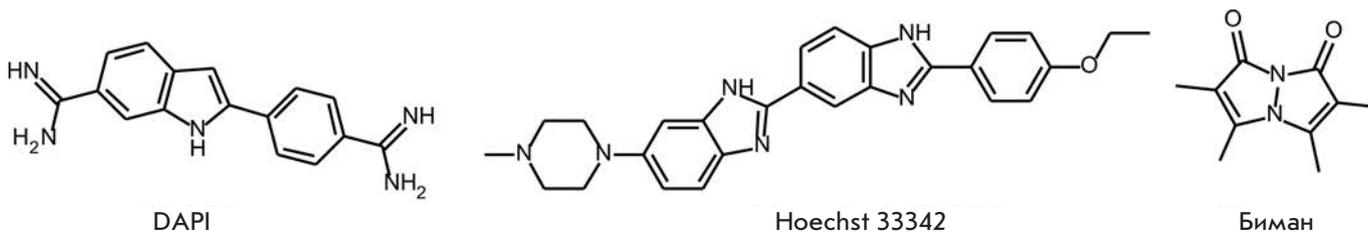


Рис. 3. Синтетические флуорофоры с эмиссией в сине-циановой области спектра

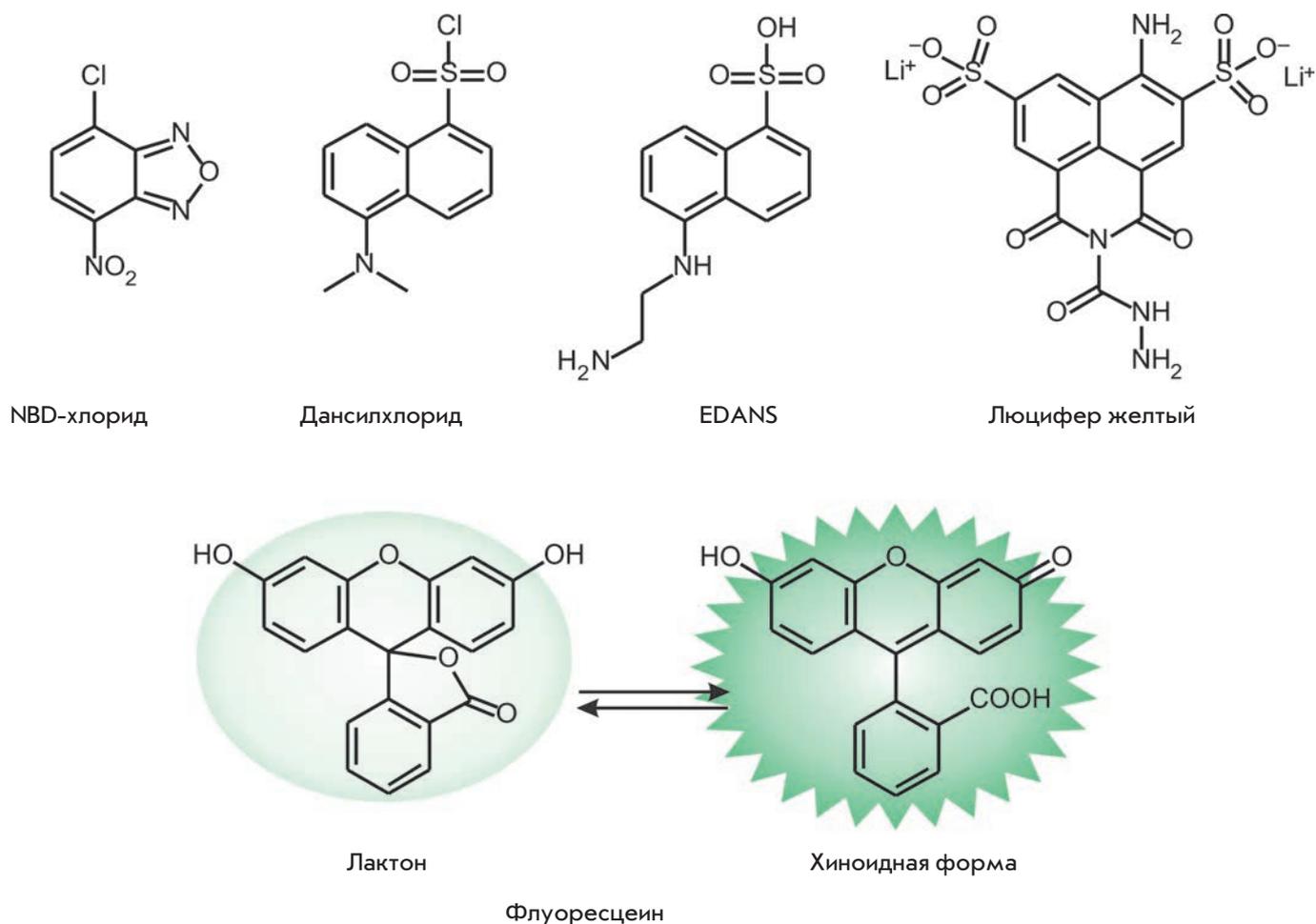


Рис. 4. Флуорофоры с эмиссией в зелено-желтой области спектра

симум эмиссии флуорофора сдвигается в зеленую область спектра (505 нм). Кроме того, фотоконвертированная зеленая форма флуорофора обесцвечивается при возбуждении синим цветом [22]. Это свойство использовано в локализационной микроскопии единичных молекул (метод SMLM субдифракционной микроскопии) ДНК, что позволило реконструировать точную карту распределения этих молекул в ядрах клеток и в хромосомах в процессе митоза [20].

Флуоресцирующие производные дибензимидазола были впервые получены и применены химической компанией Hoechst AG для флуоресцентной микроскопии. Соединение Hoechst 33342 (рис. 3) флуоресцирует в цианово-синей области спектра и имеет максимум эмиссии при 461 нм. Оно связывается с ДНК, хорошо проникает через клеточную мембрану и пригодно для экспериментов в живой клетке [20].

Биман, 1,5-диазабицикло[3.3.0]окта-3,6-диен-2,8-дион (рис. 3), имеет $\lambda_{ex} = 390$ нм, $\lambda_{em} = 482$ нм и $\Phi = 0.3$. Флуоресценция бимана тушится в присут-

ствии триптофана и тирозина, причем степень тушения зависит от расстояния между этими остатками ($\leq 10-15$ нм). Это свойство флуорофора использовали для определения конформационных изменений ферментов в реальном времени при связывании субстрата [23, 24].

Флуорофоры с эмиссией в зелено-желтой области спектра

NBD (4-нитробензо-2-окса-1,3-диазол) и его производные обладают эмиссией в зеленой области спектра. NBD-хлорид (рис. 4) реагирует по амино- и тиоловым группам. Соединения NBD-хлорида с первичными аминами обладают максимумами возбуждения и эмиссии $\lambda_{ex} = 465$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм ($\epsilon = 2.2 \times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ и $\Phi = 0.3$). Другое производное NBD, селективно взаимодействующее с цистеином, успешно использовали в качестве флуоресцентного сенсора Cys в клетках HeLa [25]. Чувствительность производных NBD к микроокружению оказалась



Рис. 5. Синтетические флуорофоры на основе производных ксантена

важной при получении липидных маркеров [26, 27] или новых субстратов киназ [28]. На основе NBD созданы сенсоры Cu^{2+} и S^{2-} , позволяющие определять концентрацию этих ионов в живой клетке [29].

NBD-SCN использовали для детекции цистеина и гомоцистеина. Замена тиоцианатной группы на цистеин или гомоцистеин приводит к 470- и 745-кратному увеличению интенсивности флуоресценции NBD при 550 нм соответственно [30]. Кроме того, NBD-SCN обладает достаточно высокой мембранопроницаемостью и может применяться для визуализации концентрационных изменений цистеина и гомоцистеина в живой клетке [30].

В число наиболее часто используемых флуорофоров с эмиссией в зеленой спектральной области входят производные нафталина. Эта группа меток включает в себя реагирующий по аминогруппам дансилхлорид и EDANS (рис. 4). Производные этого соединения имеют $\lambda_{\text{ex}} = 336$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм, $\epsilon = 6.1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.27$. Флуоресцентные маркеры на основе EDANS в настоящее время применяют в экспериментах *in vivo* [31]. Еще один флуорофор – 4-амино-3,6-дисульфонилнафталимид, характеризуется эмиссией флуоресценции в желтой области спектра. Карбогидразид этого соединения под названием Люцифер желтый ($\lambda_{\text{ex}} = 428$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 534$ нм, рис. 4) применяется в качестве полярной метки и в экспериментах при двухфотонном возбуждении [32].

Флуорофор флуоресцеин (рис. 4) обладает необычными свойствами: в водных растворах он может существовать в семи прототропных формах, включая наиболее биологически значимые моноанионную и дианионную, которые взаимопревращаются с $pK_a \sim 6.4$ [33]. Дианион представляет собой форму с наибольшей флуоресценцией ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 514$ нм, $\epsilon = 9.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.95$). pH-чувствительность производных флуоресцеина была использована для получения флуоресцентных pH-индикаторов [34, 35]. На основе этих производных

получены сенсоры ионов различных металлов, например, Fluo-3 для измерения концентрации ионов кальция в живых клетках [36, 37]. Флуоресцеин существует в двух равновесных формах – в виде лактона и в хиноидной форме (рис. 4). Ацилирование или алкилирование фенольных групп приводит к фиксации молекулы в виде нефлуоресцентного лактона, что может быть использовано для получения флуорогенных субстратов ряда ферментов [38, 39]. Флуорофоры на основе флуоресцеина обладают и существенными недостатками. У них высокая скорость фотообесцвечивания, их широкая полоса эмиссии ограничивает применение этих флуорофоров в многоцветном мечении клеточных объектов, также они обладают выраженной тенденцией к самогашению при высоких плотностях включения метки в ЦКБ.

Еще одна группа синтетических флуорофоров с эмиссией в зеленой области основана на производных родамина. Введение различных заместителей в структуру родамина позволяет настраивать его спектральные характеристики. Наиболее характерный пример – родамин 110 (рис. 5) ($\lambda_{\text{ex}} = 497$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 520$ нм, $\epsilon = 7.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.88$ [40]). Введение заместителей в виде четырехчленных азетиридиновых колец по двум атомам азота значительно увеличивает квантовый выход и яркость флуорофора [41], в то время как введение четырех метильных групп по атомам N, N' приводит к смещению максимумов возбуждения и эмиссии в более длинноволновую область ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 548/572 нм), но снижает квантовый выход флуорофора ($\Phi = 0.41$) в водных растворах [42]. Родамины, содержащие вместо аминогрупп жесткие циклические системы, имеют более высокие квантовые выходы и спектры, сдвинутые в более длинноволновую область. В частности, сульфородамин 101 (Texas Red) (рис. 5) и его производные – одни из наиболее часто применяемых в точной биологии [43, 44], используются также в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической

терапии [45]. Родаминовые метки вместе с флуоресцеином входят в состав FRET-пар [46, 47]. При замещении обеих аминогрупп родамина можно получить его нефлуоресцирующее производное. Это свойство используется в синтезе фотоактивируемых аналогов родамина [48] и для получения флуорогенных субстратов при изучении механизмов ферментативного катализа. Производные родамина 110 использовали в качестве субстратов для определения активности различных ферментов [49]. Гибридные флуорофоры, состоящие из квантовой точки и родамина, соединенных полипептидом, расщепляемым каспазой-1, использовали в тестах на апоптоз [50]. Производные родамина применяют также при конструировании индикаторов pH и ионов некоторых металлов [51, 52].

Соединения под общим торговым названием Alexa Fluor объединяют большую группу гидрофильных отрицательно заряженных меток, представляющих собой сульфированные производные флуорофоров различных типов, таких, как флуоресцеин, кумарин, цианин или родамин. Хорошо известный Alexa Fluor 488 является производным родамина и обладает свойствами, во многом схожими с FITC ($\lambda_{\text{ex}} = 493$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 519$ нм). Однако в отличие от FITC, Alexa Fluor 488 более фотостабилен, обладает большей яркостью и меньшей pH-чувствительностью. В сравнительных экспериментах по специфическому мечению модифицированных гистонов оптимальные результаты показали Fab-фрагменты, меченные Alexa Fluor 488 [53]. Alexa Fluor 488 может служить флуорофором-донором для изучения структуры различных клеточных рецепторов с использованием эффекта FRET [54].

Флуорофоры с эмиссией в красной, дальнекрасной и ближней инфракрасной области спектра

Флуорофоры с эмиссией флуоресценции в дальнекрасной и ближней инфракрасной области спектра представляют наибольший интерес, поскольку свет, возбуждающий флуоресценцию этих флуорофоров, не токсичен для живых систем. Кроме того, инфракрасные лучи способны проникать в живые ткани на существенно большие расстояния, чем более коротковолновые. Также на визуализацию биомолекул в живых системах с помощью дальнекрасных и инфракрасных флуорофоров фоновая автофлуоресценция практически не влияет. К сожалению, большинство известных синтетических флуорофоров этой группы страдают существенным недостатком – низким квантовым выходом флуоресценции в водных растворах. Среди флуорофоров этой группы особого внимания заслуживают производные флуоресцеина и родамина, в которых ксантеновые структуры модифицированы за счет добавления

ароматических колец. Эти заместители вызывают значительный батохромный сдвиг в спектрах флуоресценции. Одно из таких производных – нафтофлуоресцеин (рис. 5) – в щелочных условиях флуоресцирует в значительно более длинноволновой спектральной области ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 595/660$ нм). Однако все преимущества этой дальнекрасной флуоресцентной метки нивелируются более низким коэффициентом экстинкции ($\epsilon = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и квантовым выходом ($\Phi = 0.14$). Производные этого ряда успешно использовали в качестве различных сенсоров в живых клетках [55, 56].

Для получения более длинноволновых производных родамина синтезированы его аналоги, в которых атом кислорода между двумя ароматическими циклами заменен на атомы кремния (Si-родамин), германия (Ge-родамин) или олова (Sn-родамин) [57]. Полученные производные сохраняют важные характеристики самого родамина, такие, как высокий квантовый выход в водных растворах, устойчивость к фотообесцвечиванию и хорошую растворимость в воде. При введении дополнительных ароматических заместителей в Si-родамин получены три новых соединения SiR680, SiR700 и SiR720 с флуоресценцией в ближнем инфракрасном диапазоне (670–740 нм). Показано, что SiR680 и SiR700 обладают достаточно высокими квантовыми выходами в водных растворах ($\Phi = 0.35$ и 0.12 соответственно) [58]. Активированные сукцинимидные производные SiR700 использовали *in vivo* для визуализации развития опухолей [58, 59].

Замечательными фотофизическими свойствами обладают ксантеновые метки, структура которых расширена одним ароматическим кольцом. В отличие от симметричных флуоресцеинов и родаминов, резонансные формы этих меток неэквивалентны друг другу и поэтому различаются спектральными свойствами. Таким образом, асимметрия этих меток может использоваться для создания ратиометрических флуоресцентных индикаторов. По соотношению (ratio) интенсивностей флуоресценции различных форм таких индикаторов можно точно определять внутриклеточную концентрацию различных ионов. Флуорофоры на основе семинафтофлуоресцеинового ядра служат pH-сенсорами и индикаторами других ионов. Семинафтоксантены на основе родолового ядра также используются как pH-индикаторы. Один из примеров – ратиометрический pH-сенсор, семинафтородафлуор (рис. 5) [60, 61]. Это соединение имеет $\lambda_{\text{ex}} = 573$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 631$ нм, $\epsilon = 4.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.092$ при повышенных значениях pH.

Резорурфин (рис. 6) используется, в частности, для детекции эндогенной фосфатазной активности в живых клетках в реальном времени [62]. При pH более 7.5 резорурфин существует в виде аниона

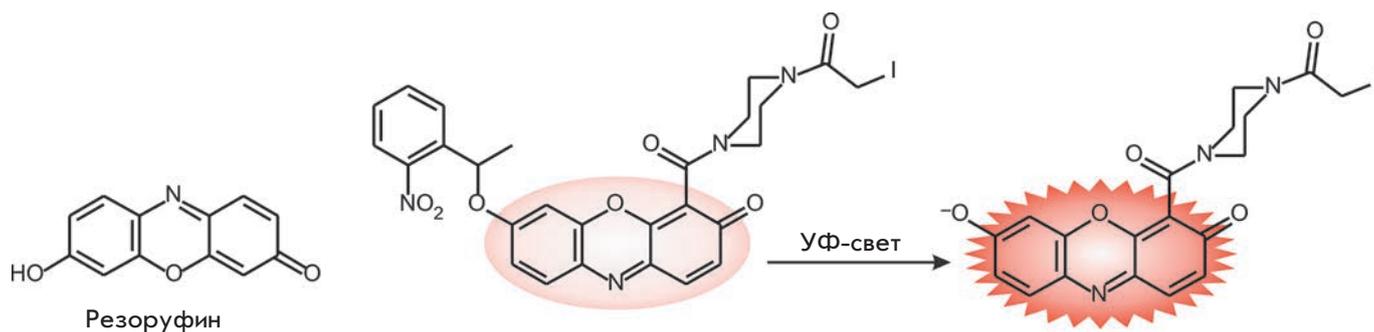


Рис. 6. Резорурфин и его фотоактивируемое *o*-нитробензильное производное

с эмиссией флуоресценции в красной области спектра ($\lambda_{\text{ex}} = 572$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 585$ нм, $\epsilon = 5.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.74$). При понижении pH интенсивность флуоресценции этой метки значительно снижается.

Некоторые синтетические флуорофоры могут быть модифицированы таким образом, что их флуоресценция «включается» только после активации светом определенной длины волны. Эти фотоактивируемые, или скрытые, флуорофоры используются для визуализации процессов в динамике, где требуется активация небольших популяций флуоресцентных маркеров, с разрешением во времени и пространстве. Такие флуорогенные маркеры получают, в частности, с помощью реакций флуорофора с *o*-нитробензилбромидом. Молекула может быть активирована при облучении светом 365 нм, при этом *o*-нитробензильная группа отщепляется с высвобождением активного флуорофора (рис. 6). Используя метод фотоактивации метки, конъюгированной с тубулином, впервые было показано активное передвижение микротрубочек в процессе митоза и изучена динамика актиновых микрофиламентов [63]. Получен ряд фотоактивируемых аналогов кумарина, способных проникать в клетку [64, 65]. После проникновения внутрь клетки небольшая популяция молекул кумарина была активирована и использовалась как флуоресцентный репортер для наблюдения за миграцией молекул через щелевые контакты [65].

Соединения на основе бордифтордипиррометена, широко известные под названием BODIPY, служат основой для создания флуоресцентных маркеров [66, 67], в том числе для мечения биомолекул в живых клетках [68]. Они характеризуются высокой фото-стабильностью и квантовым выходом, нейтральным зарядом и узкими полосами поглощения и эмиссии. Метки этого ряда можно настроить на нужную длину волны с помощью определенных заместителей [69]. Однако широкое использование этих замечательных флуорофоров ограничено их плохой растворимостью

в воде. Некоторые флуорофоры ряда BODIPY (рис. 7) обладают спектральными свойствами, сходными с флуоресцеином, например BODIPY FL ($\lambda_{\text{ex}} = 505$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 511$ нм, $\epsilon = 9.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $\Phi = 0.94$). Введение дополнительных ароматических заместителей в молекулу BODIPY FL (рис. 7) сдвигает эмиссию в красную и дальнекрасную область (BODIPY TR, BODIPY 630/650 и BODIPY 650/665).

Большая часть меток, полученных на основе BODIPY, относятся к стабильным флуоресцентным маркерам. Помимо этого, получены флуорофоры с оптическими свойствами, изменяемыми при фотоактивации или присоединении к биологически важным молекулам [70, 71]. Нейтрально заряженный BODIPY способен проникать через клеточную мембрану. BODIPY и некоторые его производные обладают значительной липофильностью и, как следствие, накапливаются в основном в мембранах субклеточных структур [72]. Поэтому для визуализации биомолекул, локализованных в цитозоле, необходимо иметь модифицированные производные BODIPY, содержащие гидрофильные заместители.

BODIPY и его производные имеют небольшой сдвиг Стокса, что является причиной самотушения этих маркеров при большой плотности мечения биомолекулы. Это свойство используется для создания флуорогенных субстратов протеиназ, интенсивность флуоресценции которых возрастает при протеолизе белков, меченных этой меткой с большой плотностью [73].

Карбоцианиновые метки (цианины) представляют собой соединения с полиметиновыми цепями различной длины с нечетным числом атомов углерода, расположенных между двумя атомами азота ($\text{R}_2\text{N}-(\text{CH}=\text{CH})_n-\text{CH}=\text{N}^+\text{R}_2$) [70] (рис. 8). Структура этих соединений очень похожа на структуру хромофора зрительного пигмента родопсина [74]. Это свойство недавно использовали для получения конструкции, кодирующей специфический белок, связывающий

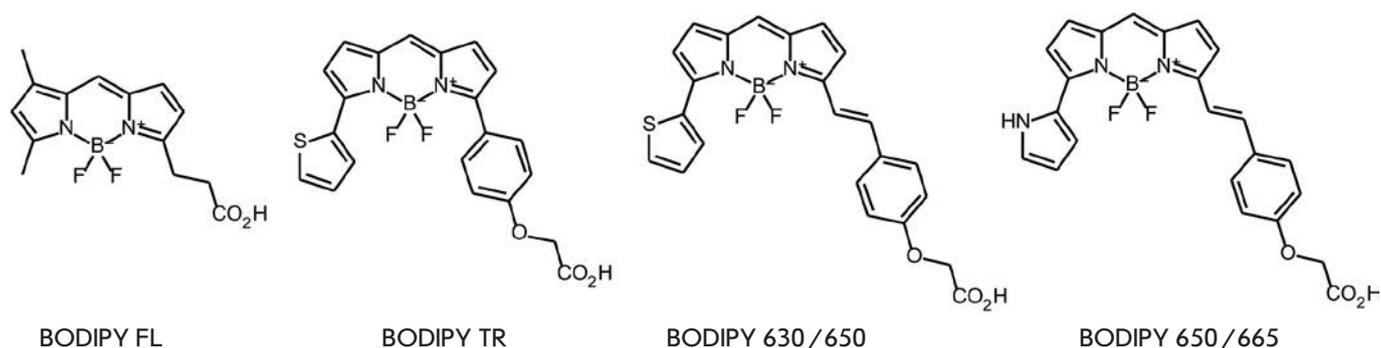


Рис. 7. Флуорофоры на основе производных BODIPY

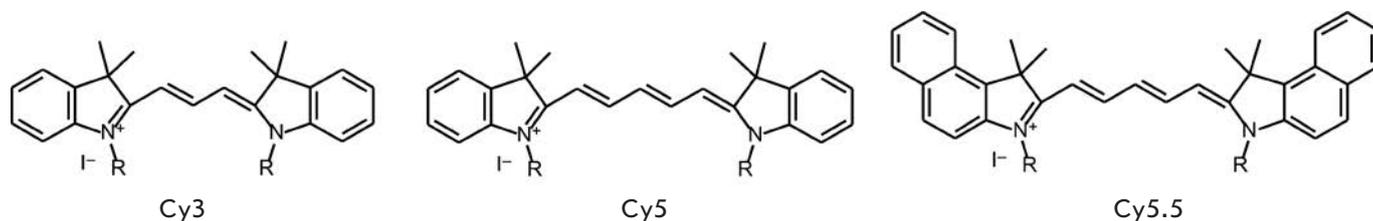


Рис. 8. Производные цианиновых красителей Cy3, Cy5 и Cy5.5

ретиновую кислоту (CRABPII), способный образовывать комплекс с флуорогенным производным цианиновой метки. Этот комплекс, в отличие от исходного профлуорофора, обладает яркой флуоресценцией в дальнекрасной области спектра и высоким квантовым выходом [75]. Гемидицианиновыми называют метки, у которых только один концевой атом азота включен в ароматический гетероцикл. Гемидицианины используют в качестве ратиометрических флуоресцентных сенсоров pH в экспериментах *in vivo* [76]. Цианиновые метки, у которых несущие заряд концевые атомы непосредственно связаны с метиновой цепью, называются стрептоцианиновыми. Стрептоцианиновые метки использовали в качестве индикатора активности супероксиддисмутазы [77].

Карбоцианиновым соединениям присвоены названия, соответствующие количеству атомов углерода между дигидроиндольными составляющими молекулы. Cy3 (рис. 8) по спектральным характеристикам сопоставимо с тетраметилродамином ($\lambda_{\text{ex}} = 554$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 568$ нм). У Cy5 спектры сдвинуты в длинноволновую область ($\lambda_{\text{ex}} = 652$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 672$ нм), а у более протяженных конструкций, таких, как Cy7, наблюдается эмиссия флуоресценции в ближнем инфракрасном диапазоне ($\lambda_{\text{ex}} = 755$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 788$ нм). Цианины имеют высокие значения коэффициента экстинкции (до $300\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и хорошо растворимы в воде. Поглощение и эмиссию можно сдвигать в более длинноволновую область либо за счет увеличения

протяженности полиметиновой цепи, либо за счет ароматической части концевых гетероциклических фрагментов. Удлинение полиметиновой цепи на два атома углерода сдвигает максимум поглощения на ~ 100 нм, в то время как добавление бензольного кольца к концевому индольному остатку приводит к сдвигу поглощения примерно на 30 нм [78]. Такие структурные модификации, как в последнем случае, обозначают индексом «.5», например, Cy5.5.

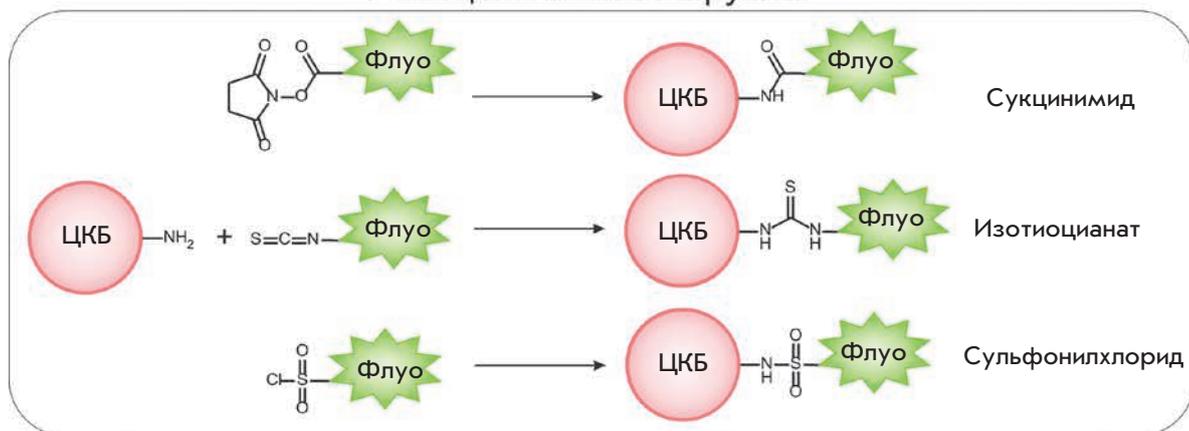
n-Нитробензоильное производное гептацианинового флуорофора с эмиссией в ближнем инфракрасном диапазоне использовали как ратиометрический сенсор цистеина в митохондриях при окислительном стрессе. Показана возможность применения этого флуорофора в живых мышцах в качестве сенсора уровня Cys [79] и глутатиона в живых клетках [80].

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЕ РЕАКЦИИ ВКЛЮЧЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ В ЦКБ

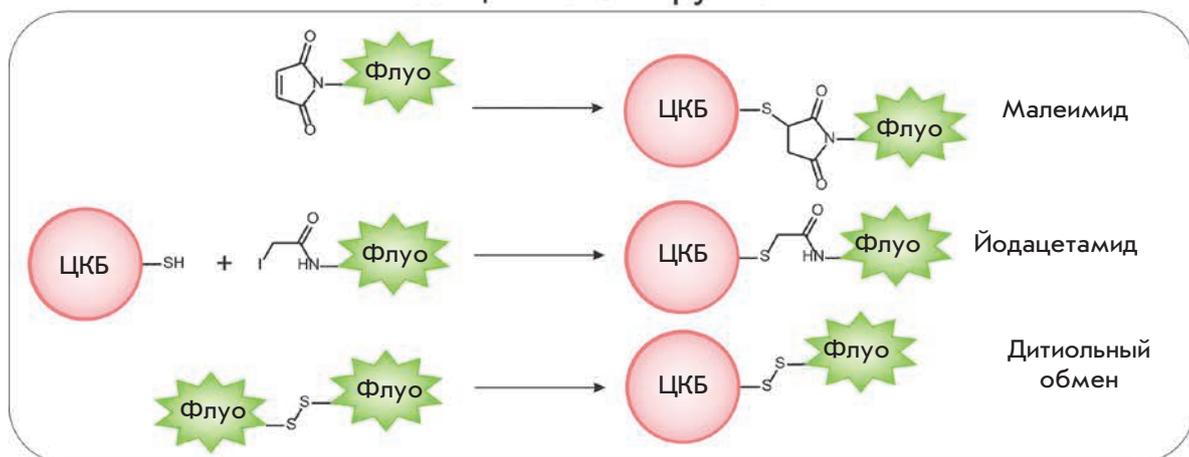
Реакции ковалентного связывания

В настоящее время для связывания синтетических флуорофоров с функциональными группами биомолекул используют различные химические реакции [81]. Наиболее часто применяется сукцинимидный эфир (рис. 9), который после реакции с первичными и вторичными аминогруппами образует стабильную амидную связь, также используется изотиоцианат. Флуорофоры, модифицированные йодацетамидом,

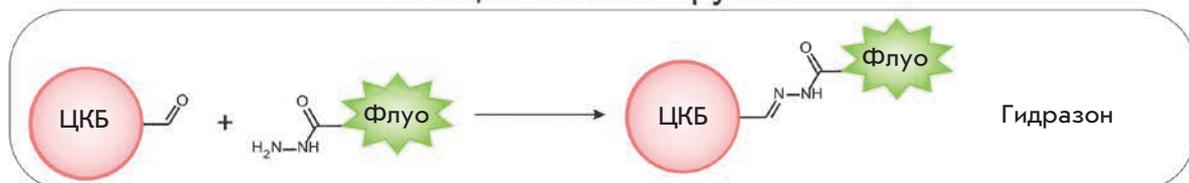
Реакции по аминогруппе



Реакции по SH-группе



Реакция по оксо-группе



Реакции с азидом

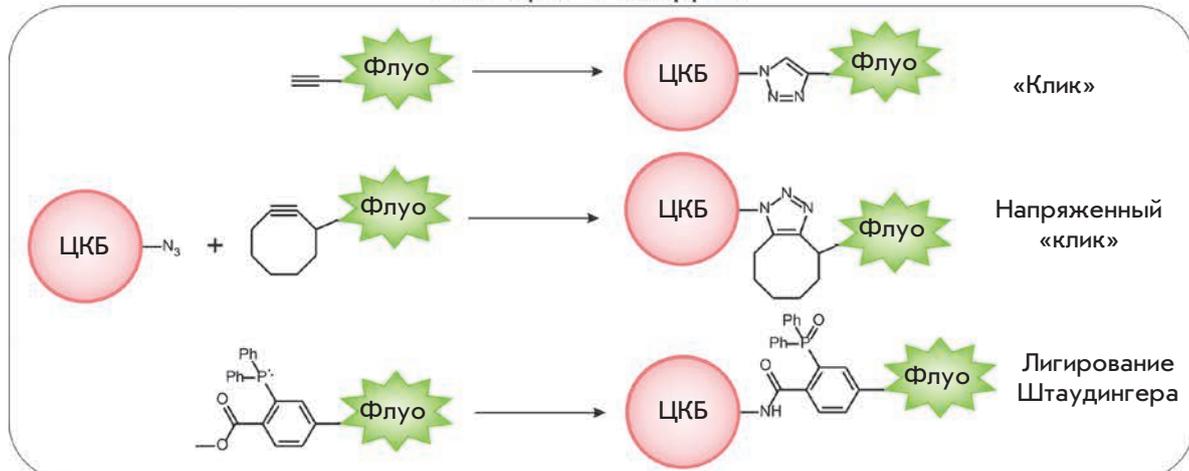


Рис. 9. Реакции с образованием ковалентной связи с биомолекулами

малеимидом или дитиолами, применяют для мечения по сульфгидрильным группам.

Особое внимание привлекает метод биоортогонального конъюгирования [82] и так называемая «клик»-химия [83–85]. В этом случае химические группы, вступающие в реакцию конъюгирования с биомолекулой, не реагируют с другими функциональными группами. Включение этих химических групп в молекулу происходит либо за счет метаболического аппарата клетки [86, 87], либо за счет ферментативной активности ЦКБ [88, 89]. Всем требованиям биоортогональной химической группы удовлетворяет азидная группировка, так как ей свойственна высокая реакционная способность при селективности реакций, устойчивости в водной среде и низкой реакционной способности по отношению к функциональным группам биологических молекул. Введение небольшой азидной группы приводит лишь к незначительным структурным пертурбациям биомолекулы. Включенная в клеточный объект биоортогональная метка может ковалентно связываться с флуорофором за счет высокоселективных химических «клик»-реакций, классическим примером которых служит циклоприсоединение азидов к алкинам (рис. 9), катализируемое одновалентной медью [90, 91]. Однако катализируемые медью реакции могут применяться в основном в опытах *in vitro*, поскольку в живых системах катализатор должен доставляться к месту реакции. Кроме того, медь в концентрациях, используемых для мечения, токсична. Бертоцци и соавт. [92] разработали метод модификации, в котором алкин включен в состав напряженного восьмичленного кольца (рис. 9). В этой системе алкин проявляет повышенную реакционную способность и не требует катализатора. Позднее получили дифторциклооктины [93] с гораздо более высокой реакционной способностью, позволяющей применять «клик»-химию для меченных азидом биомолекул в живых организмах [94]. Еще один пример биоортогональной реакции, используемой для мечения *in vivo*, – реакция лигирования по Штаудингеру (рис. 9) [95, 96].

Реакции с образованием сульфидов и металл-хелатных комплексов флуорофора с ЦКБ

Один из перспективных методов конъюгации синтетических флуорофоров с ЦКБ – введение с помощью генетических манипуляций небольшой последовательности аминокислот в целевой белок. Эта последовательность должна иметь достаточно высокое сродство к выбранному флуоресцентному маркеру. Например, последовательность Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys, благодаря вставке -Pro-Gly-, образует структуру, подобную шпильке [97]. Четыре

остатка цистеина, таким образом, образуют кластер, имеющий высокое сродство к органическим соединениям мышьяка [98]. В частности, дважды замещенное мышьяком производное флуоресцеина F1AsH ($\lambda_{\text{ex}} = 508$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 528$ нм) образует с такой тетрацистеиновой последовательностью комплекс с константой диссоциации в пикомольном интервале (рис. 10А) [8, 99]. Кроме того, F1AsH обладает ярко-зеленой флуоресценцией только в связанном с тетрацистеиновой последовательностью виде, что существенно снижает фоновую флуоресценцию. Кроме F1AsH, существует ReAsH ($\lambda_{\text{ex}} = 593$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 608$ нм), маркер на основе резорурфина (рис. 10А), который обладает флуоресценцией в красной области спектра [8, 100].

Следует отметить, что F1AsH и ReAsH проникают через мембрану, что облегчает их введение в клетку. Их недостаток – побочные реакции с монотиолами, однако неспецифическое связывание может быть подавлено избытком дитиотреитола. Мечение с помощью F1AsH и ReAsH затруднено также в окислительных условиях вследствие окислительных реакций последовательности тетра-Cys.

В еще одном методе включения флуорофора в ЦКБ используются координационные соединения с металлами [101]. Комплексообразователем здесь служит полигистидиновая последовательность $(\text{His})_n$, где $n \geq 6$, которая образует комплексы с нитрилтриацетатом никеля (Ni^{2+} -НТА) (рис. 10Б). Для специфического мечения белков с поли-His-последовательностью синтезированы производные цианиновых меток с ковалентно присоединенными одним или двумя Ni^{2+} -НТА. Двухзамещенные производные Су3 и Су5 показали более высокую аффинность по сравнению с однозамещенными и использовались в экспериментах FRET для определения расстояний при образовании комплекса ДНК с поли-His-меченым белком [102].

Ключевой недостаток системы поли-His/ Ni^{2+} -НТА для *in vivo* экспериментов – низкая аффинность связывания (значения K_d в пределах 1–20 мкМ), что негативно сказывается на стабильном включении метки и, в конечном итоге, на визуализации ЦКБ. Пиелер и соавт. синтезировали производные флуоресцеина с ковалентно связанными 1–4 остатками НТА и охарактеризовали их взаимодействие с поли-His-последовательностью (His6 и His10). Стабильность связывания мультивалентных хелатирующих групп возрастала более чем на 4 порядка и достигала субнанолярного уровня в сравнении с моно-НТА [103].

Еще одно серьезное препятствие для применения Ni^{2+} -НТА-комплекса *in vivo* – плохое прохождение через клеточную мембрану. Для доставки Ni^{2+} -НТА внутрь клетки Тампе и соавт. использовали мембранотранслоцирующий ТАТ-пептид

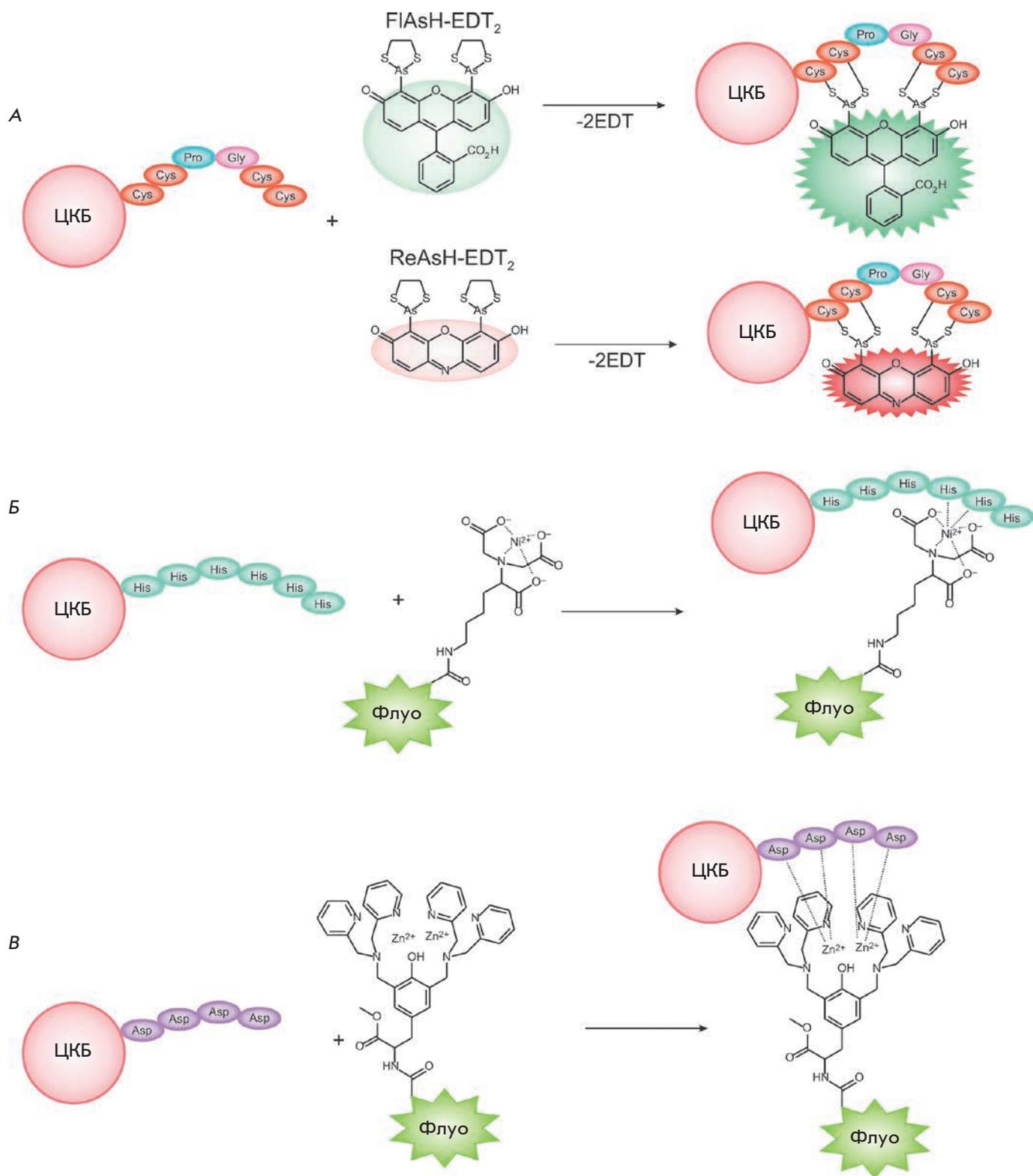


Рис. 10. Реакции с образованием сульфидов и металл-хелатных комплексов флуорофора с целевым клеточным белком (ЦКБ), содержащим тетра-Cys (А), гекса-His (Б) и тетра-Asp (В) аминокислотные последовательности

(49RKKRRQRRR57) [104]. Полученный комплекс trisNTA/His6-TAT49–57 использовали в качестве переносчика флуоресцентно меченного NTA в клетку – в цитозоль и ядро, далее trisNTA преимущественно связывался уже с His10-меченым внутриклеточным белком. При этом транслоцирующий His6-TAT49–57 пептид высвобождался, поскольку имел большую аффинность связывания ($K_d = 0.1$ нМ) с His10 [103].

Другой подход к получению мембранопроницаемых конструкций применили Сан и соавт. [105]. Они синтезировали соединение, в котором NTA ковалентно связан с флуорофором и арилазидом (Ni^{2+} -NTA-AC). Ni^{2+} -NTA-AC прекрасно проходил через клеточную мембрану и связывался с внутриклеточными белками, несущими поли-His-последовательность. После активации светом арилазид ковалентно связывался с ЦКБ, что приводило к 13-кратному увеличению флуоресценции и образованию устойчивой связи с флуоресцентной меткой.

Помимо тетрацистеиновой и поли-His-последовательностей для мечения ЦКБ использовали также поли-Asp ((Asp₄)_n, где $n = 1-3$). Хамачи и соавт. синтезировали многоядерные комплексы Zn^{2+} , меченные флуоресцеином (на *рис. 10B* показан двухъядерный комплекс Zn^{2+}) [106]. Увеличение аффинности в этом случае наблюдалось при большей длине цепи поли-Asp. С помощью тетраядерных комплексов Zn^{2+} проведено флуоресцентное мечение мускаринового ацетилхолинового рецептора, при котором сохранялась его исходная активность.

Сайт-направленное мечение с помощью ферментативных реакций

Еще один метод включения флуорофора в ЦКБ основан на ферментативных реакциях. В этих технологиях используются так называемые методы SNAP-tag [107], CLIP-tag [108], HALO-tag [109] и TMP-tag [110–112].

В методе SNAP-tag O^6 -алкилгуанинтрансфераза (АГТ, *рис. 11A*) используется в качестве белка слияния с ЦКБ. АГТ имеет молекулярную массу 20 кДа, она переносит алкильные группы с O^6 алкилированного остатка гуанина на остаток цистеина в активном центре фермента (см. обзор [113]). Показано, что при инкубации клеток, экспрессирующих АГТ-ЦКБ, с O^6 -бензилгуаниновым субстратом, в котором бензильная группа в пара-положении несет флуорофор, происходит флуоресцентное мечение АГТ-ЦКБ по цистеину в активном центре АГТ [9]. Получены также мутантные формы АГТ, которые катализируют реакцию переноса алкил-радикала на АГТ-ЦКБ в 50 раз быстрее, чем фермент дикого типа [107]. В настоящее время технология SNAP-tag наиболее

часто используется для мечения внутри- и внеклеточных белков.

Метод CLIP-tag похож на SNAP-tag, в нем используется мутантная форма АГТ, субстратами которой являются флуоресцентные аналоги O^2 -бензилцитозина (*рис. 11B*) [108]. Несмотря на сходство этих технологий, SNAP-tag и CLIP-tag имеют различную субстратную специфичность и могут применяться для визуализации одновременно нескольких клеточных объектов.

В методе HALO-tag белком слияния служит генно-инженерный вариант фермента галоалкандегалогеназы, которая вступает в специфическую реакцию с галогензамещенными алканами, ковалентно связанными с флуорофором (*рис. 11B*) [114, 115]. Эта реакция, в которой образуется ковалентная связь между ферментом и флуоресцентно меченым алканом, высокоспецифична и позволяет быстро вводить метку в белки *in vitro* и *in vivo* (10^3-10^6 М⁻¹ с⁻¹) в физиологических условиях, причем, что важно, эта реакция необратима.

Стоит отметить, что во всех перечисленных методах для достижения высокого контраста требуется тщательная отмывка непрореагировавшей метки. Для устранения этого недостатка были синтезированы флуорогенные субстраты для SNAP-tag, которые содержат ферментативно удаляемый тушитель флуоресценции (*рис. 11A*). В результате ферментативной реакции с SNAP-tag химическая группа-тушитель отщепляется, что дает почти 50-кратное увеличение интенсивности флуоресценции. Преимущество таких «no wash» флуорофоров показано с помощью пространственно-временной динамики рецепторов эпидермального фактора роста в процессе миграции клеток [116].

Альтернативную систему представляет собой TMP-tag, в котором в качестве фермента, соединенного с ЦКБ, используется мутант дигидрофолатредуктазы (eДГФР L28C) из *Escherichia coli* (мол. масса ~18 кДа). В результате ферментативной реакции флуоресцентно меченный 2,4-диамино-5-(3,4,5-триметоксибензил) пиримидин (триметоприм, или TMP) связывается с eДГФР-ЦКБ (*рис. 11Г*), экспрессируемой в животных клетках. Система имеет достаточно низкие значения фоновой флуоресценции и быструю кинетику [111]. Для дальнейшего снижения фоновой флуоресценции, обусловленной несвязавшейся или неспецифически связавшейся флуоресцентной меткой, получено нефлуоресцирующее TMP-производное, содержащее флуорофор и его тушитель. В процессе ферментативной реакции TMP-лиганд связывается с eДГФР-ЦКБ, при этом тушитель удаляется. Эффективность данного метода показана при мечении гистонов в ядрах клеток НЕК 293Т [117].

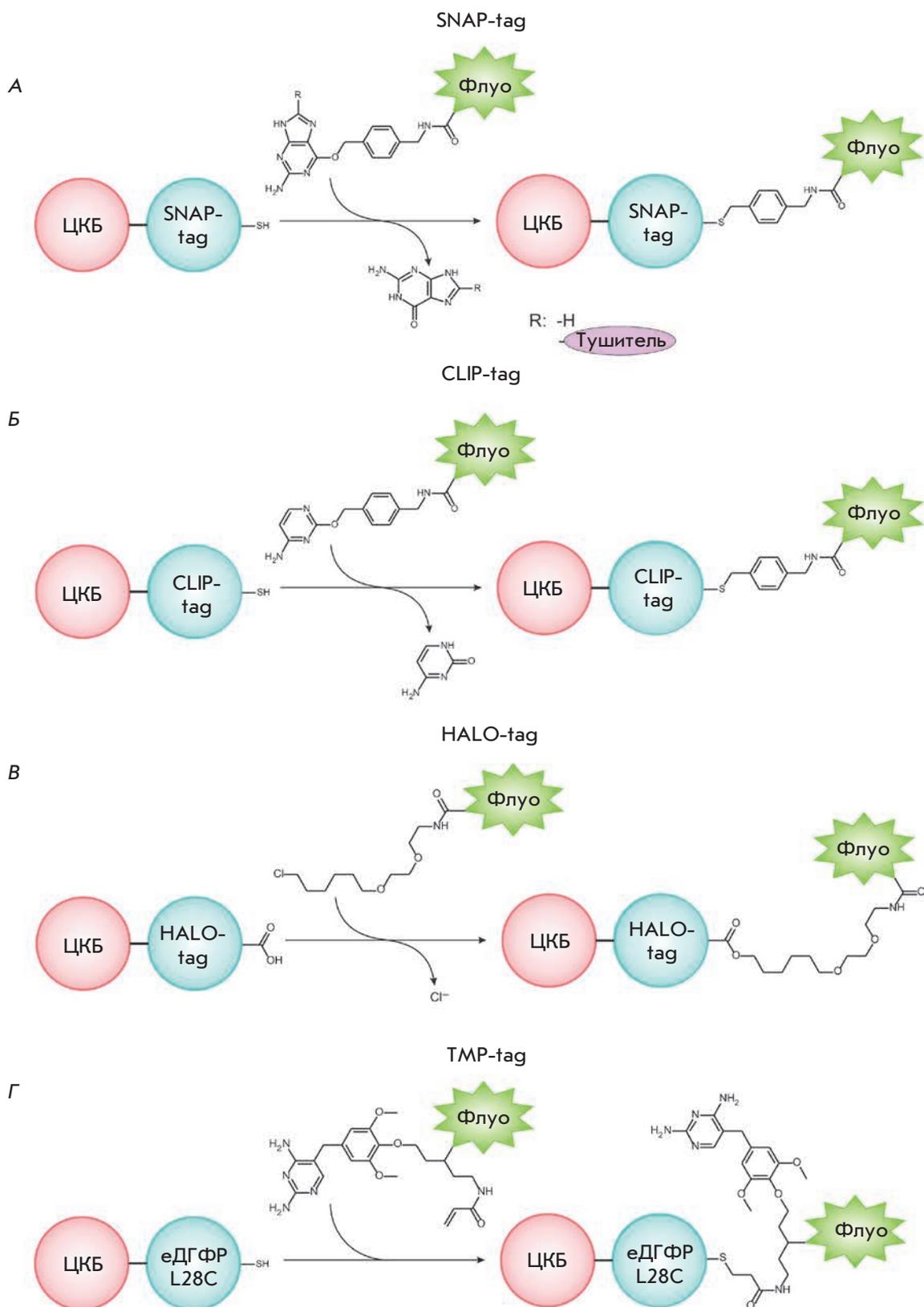


Рис. 11. Ферментативные методы мечения ЦКБ с использованием SNAP-tag (А), CLIP-tag (Б), HALO-tag (В) и TMP-tag (Г)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы методы визуализации биомолекул в живых системах с помощью синтетических флуорофоров претерпели значительные изменения, последовательно преодолевая различные экспериментальные и концептуальные ограничения, что, в первую очередь, касается сайт-направленных реакций, позволяющих вводить флуоресцентную метку в ЦКБ. На основе новых фотопереключаемых флуорофоров стремительно развивались современные технологии, такие, как субдифракционная микроскопия, позволяющая визуализировать клеточные объекты с разрешением в нанометровом диапазоне.

Метод биоортогонального мечения позволил вводить в ЦКБ синтетические флуорофоры, которые по своим размерам значительно меньше ФБ. Этот метод также предоставляет возможность мечения внутренних сайтов ЦКБ, в отличие от N- и C-концевых областей при использовании ФБ. Кроме того, спектральные свойства синтетических флуорофоров подвергаются более легкой настройке по сравнению с ФБ. Также с помощью синтетических флуорофоров возможно осуществлять мечение небелковых объектов (нуклеотидов, липидов, гликанов, метаболитов и т.п.).

Хотя конструкции, применяемые в ферментативных методах введения флуорофора (SNAP-tag, CLIP-tag, HALO-tag и TMP-tag), сопоставимы по размеру с ФБ, эти методы позволяют вводить любые небольшие молекулы в ЦКБ. Ферментативные методы включения флуорофоров в ЦКБ в последние годы все чаще привлекаются для решения сложных

задач современной биологии и медицины. Следует отметить, что описано использование этих технологий в трансгенных животных [118].

В настоящее время метод с образованием металл-хелатных комплексов и сульфидов также часто используется для флуоресцентного мечения *in vivo*. В отличие от предыдущих, в нем используется небольшой пептидный фрагмент, слитый с ЦКБ. Со времени появления первой публикации, в которой описано использование FAsH, созданы новые флуорофоры с большей аффинностью связывания и большей яркостью флуоресценции. На основе металл-хелатных технологий получены также ЦКБ, меченные фотопереключаемыми флуоресцентными метками.

Учитывая множество прикладных задач, существующих в визуализации биомолекул в живых системах, маловероятным представляется создание единого универсального флуорофора, удовлетворяющего всем возможным требованиям. Кроме того, исследование сложных систем с несколькими целевыми объектами требует применения одновременно нескольких различных флуорофоров. В этой связи дальнейший прогресс в этой области целиком зависит от синтеза новых флуорофоров, удовлетворяющих таким требованиям флуоресцентной микроскопии, как высокая фотостабильность, низкая фототоксичность при длительной визуализации объекта, а также возможность мечения множественных объектов в живых системах. ●

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N., Berliner E. // *J. Immunol.* 1942. V. 45. P. 159–170.
- Sung M.H., McNally J.G. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2011. V. 3. № 2. P. 167–182.
- Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. № 3. P. 1103–1163.
- Day R.N., Davidson M.W. // *Chem. Soc. Rev.* 2009. V. 38. № 10. P. 2887–2921.
- Pakhomov A.A., Martynov V.I. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 8. P. 755–764.
- Terai T., Nagano T. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008. V. 12. № 5. P. 515–521.
- Lavis L.D., Raines R.T. // *ACS Chem. Biol.* 2014. V. 9. № 4. P. 855–866.
- Adams S.R., Campbell R.E., Gross L.A., Martin B.R., Walkup G.K., Yao Y., Llopis J., Tsien R.Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 21. P. 6063–6076.
- Keppler A., Gendreizig S., Gronemeyer T., Pick H., Vogel H., Johnsson K. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 1. P. 86–89.
- Bains G., Patel A.B., Narayanaswami V. // *Molecules.* 2011. V. 16. № 9. P. 7909–7935.
- Wu Y., Li C., Li Y., Li D., Li Z. // *Sens. Actuator B-Chem.* 2016. V. 222. P. 1226–1232.
- Pinheiro D., de Castro C.S., de Melo J.S.S., Oliveira E., Nunez C., Fernandez-Lodeiro A., Capelo J.L., Lodeiro C. // *Dyes Pigment.* 2014. V. 110. P. 152–158.
- Saha T., Sengupta A., Hazra P., Talukdar P. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. V. 13. № 10. P. 1427–1433.
- Legenzov E.A., Dirda N.D., Hagen B.M., Kao J.P. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0133518.
- Hara D., Komatsu H., Son A., Nishimoto S., Tanabe K. // *Bioconjug. Chem.* 2015. V. 26. № 4. P. 645–649.
- Han S., Zhang F.F., Qian H.Y., Chen L.L., Pu J.B., Xie X., Chen J.Z. // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. V. 93. P. 16–32.
- Mizukami S., Watanabe S., Kikuchi K. // *Chembiochem.* 2009. V. 10. № 9. P. 1465–1468.
- Zadlo A., Koszelewski D., Borys F., Ostaszewski R. // *Chembiochem.* 2015. V. 16. № 4. P. 677–682.
- Morikawa K., Yanagida M. // *J. Biochem.* 1981. V. 89. № 2. P. 693–696.
- Szczurek A.T., Prakash K., Lee H.K., Zurek-Biesiada D.J., Best G., Hagmann M., Dobrucki J.W., Cremer C., Birk U. // *Nucleus.* 2014. V. 5. № 4. P. 331–340.
- Piterburg M., Panet H., Weiss A. // *J. Microsc.* 2012. V. 246. № 1. P. 89–95.
- Zurek-Biesiada D., Kedracka-Krok S., Dobrucki J.W. // *Cytometry A.* 2013. V. 83. № 5. P. 441–451.

23. Brunette A.M., Farrens D.L. // *Biochemistry*. 2014. V. 53. № 40. P. 6290–6301.
24. Smirnova I., Kasho V., Kaback H.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 23. P. 8440–8445.
25. Wang J.M., Liao Y., Shao S.J. // *Chem. Lett*. 2015. V. 44. № 10. P. 1437–1439.
26. Makiyama T., Nakamura H., Nagasaka N., Yamashita H., Honda T., Yamaguchi N., Nishida A., Murayama T. // *Traffic*. 2015. V. 16. № 5. P. 476–492.
27. Gaibelet G., Allart S., Terce F., Azalbert V., Bertrand-Michel J., Hamdi S., Collet X., Orlowski S. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 4. e0121563.
28. Lima S., Milstien S., Spiegel S. // *J. Lipid Res*. 2014. V. 55. № 7. P. 1525–1530.
29. Meng Q., Shi Y., Wang C., Jia H., Gao X., Zhang R., Wang Y., Zhang Z. // *Org. Biomol. Chem*. 2015. V. 13. № 10. P. 2918–2926.
30. Chen Y.H., Tsai J.C., Cheng T.H., Yuan S.S., Wang Y.M. // *Biosens. Bioelectron*. 2014. V. 56. P. 117–123.
31. Urru S.A.M., Veglianese P., De Luigi A., Fumagalli E., Erba E., Diaza R.G., Carra A., Davoli E., Borsello T., Forloni G., et al. // *J. Med. Chem*. 2010. V. 53. № 20. P. 7452–7460.
32. Kristoffersen A.S., Erga S.R., Hamre B., Frette O. // *J. Fluoresc*. 2014. V. 24. № 4. P. 1015–1024.
33. Lavis L.D., Rutkoski T.J., Raines R.T. // *Anal. Chem*. 2007. V. 79. № 17. P. 6775–6782.
34. Meier R.J., Simburger J.M., Soukka T., Schaferling M. // *Chem. Commun*. 2015. V. 51. № 28. P. 6145–6148.
35. Lopez S.G., Crovetto L., Alvarez-Pez J.M., Talavera E.M., San Roman E. // *Photochem. Photobiol. Sci*. 2014. V. 13. № 9. P. 1311–1320.
36. Minta A., Kao J.P., Tsien R.Y. // *J. Biol. Chem*. 1989. V. 264. № 14. P. 8171–8178.
37. Cheng Z.Y., Wang X.P., Schmid K.L., Han X.G. // *Neuroscience*. 2014. V. 280. P. 254–261.
38. Zaikova T.O., Rukavishnikov A.V., Birrell G.B., Griffith O.H., Keana J.F. // *Bioconjug. Chem*. 2001. V. 12. № 2. P. 307–313.
39. Smith E.L., Bertozzi C.R., Beatty K.E. // *ChemBiochem*. 2014. V. 15. № 8. P. 1101–1105.
40. Grimm J.B., Sung A.J., Legant W.R., Hulamm P., Matlosz S.M., Betzig E., Lavis L.D. // *ACS Chem. Biol*. 2013. V. 8. № 6. P. 1303–1310.
41. Grimm J.B., English B.P., Chen J., Slaughter J.P., Zhang Z., Revyakin A., Patel R., Macklin J.J., Normanno D., Singer R.H., et al. // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 3. P. 244–250.
42. Vogel M., Rettig W., Sens R., Drexhage K.H. // *Chem. Phys. Lett*. 1988. V. 147. № 5. P. 452–460.
43. Hill R.A., Grutzendler J. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 11. P. 1081–1082.
44. Schnell C., Shahmoradi A., Wichert S.P., Mayerl S., Hagos Y., Heuer H., Rossner M.J., Hulsman S. // *Brain Struct. Funct*. 2015. V. 220. № 1. P. 193–203.
45. Kryman M.W., Davies K.S., Linder M.K., Ohulchanskyy T.Y., Detty M.R. // *Bioorg. Med. Chem*. 2015. V. 23. № 15. P. 4501–4507.
46. Fudala R., Mummert M.E., Gryczynski Z., Gryczynski I. // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2011. V. 104. № 3. P. 473–477.
47. Chib R., Raut S., Fudala R., Chang A., Mummert M., Rich R., Gryczynski Z., Gryczynski I. // *Curr. Pharm. Biotechnol*. 2013. V. 14. № 4. P. 470–474.
48. Gee K.R., Weinberg E.S., Kozlowski D.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2001. V. 11. № 16. P. 2181–2183.
49. Sueyoshi K., Nogawa Y., Sugawara K., Endo T., Hisamoto H. // *Anal. Sci*. 2015. V. 31. P. 1155–1161.
50. Moquin A., Hutter E., Choi A.O., Khatchadourian A., Castonguay A., Winnik F.M., Maysinger D. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 11. P. 9585–9598.
51. Huang Q., Zhang Q., Wang E., Zhou Y., Qiao H., Pang L., Yu F. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2016. V. 152. P. 70–76.
52. Wang E., Zhou Y., Huang Q., Pang L., Qiao H., Yu F., Gao B., Zhang J., Min Y., Ma T. // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc*. 2016. V. 152. P. 327–335.
53. Hayashi-Takanaka Y., Stasevich T.J., Kurumizaka H., Nozaki N., Kimura H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 9. e106271
54. Mahalingam M., Girgenrath T., Svensson B., Thomas D.D., Cornea R.L., Fessenden J.D. // *Structure*. 2014. V. 22. № 9. P. 1322–1332.
55. Xue S., Ding S., Zhai Q., Zhang H., Feng G. // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 68. P. 316–321.
56. Albers A.E., Dickinson B.C., Miller E.W., Chang C.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2008. V. 18. № 22. P. 5948–5950.
57. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Terai T., Nagano T. // *ACS Chem. Biol*. 2011. V. 6. № 6. P. 600–608.
58. Koide Y., Urano Y., Hanaoka K., Piao W., Kusakabe M., Saito N., Terai T., Okabe T., Nagano T. // *J. Am. Chem. Soc*. 2012. V. 134. № 11. P. 5029–5031.
59. McCann T.E., Kosaka N., Koide Y., Mitsunaga M., Choyke P.L., Nagano T., Urano Y., Kobayashi H. // *Bioconjug. Chem*. 2011. V. 22. № 12. P. 2531–2538.
60. Rathje R.L., Fang H., Bachman J.L., Anggono V., Gether U., Haganir R.L., Madsen K.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 35. P. 14426–14431.
61. Capellini V.K., Restini C.B., Bendhack L.M., Evora P.R., Celotto A.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. e62887.
62. Zhang H., Xu C., Liu J., Li X., Guo L. // *Chem. Commun*. 2015. V. 51. № 32. P. 7031–7034.
63. Theriot J.A., Mitchison T.J. // *Nature*. 1991. V. 352. № 6331. P. 126–131.
64. Zhao Y., Zheng Q., Dakin K., Xu K., Martinez M.L., Li W.H. // *J. Am. Chem. Soc*. 2004. V. 126. № 14. P. 4653–4663.
65. Guo Y.M., Chen S., Shetty P., Zheng G., Lin R., Li W.H. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 9. P. 835–841.
66. Loudet A., Burgess K. // *Chem. Rev*. 2007. V. 107. № 11. P. 4891–4932.
67. Boens N., Leen V., Dehaen W. // *Chem. Soc. Rev*. 2012. V. 41. № 3. P. 1130–1172.
68. Kowada T., Maeda H., Kikuchi K. // *Chem. Soc. Rev*. 2015. V. 44. № 14. P. 4953–4972.
69. Le Guennic B., Jacquemin D. // *Acc. Chem. Res*. 2015. V. 48. № 3. P. 530–537.
70. Zhang Y., Swaminathan S., Tang S.C., Garcia-Amoros J., Boulina M., Captain B., Baker J.D., Raymo F.M. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. № 14. P. 4709–4719.
71. Yang C.D., Gong D.Y., Wang X.D., Iqbal A., Deng M., Guo Y.L., Tang X.L., Liu W.S., Qin W.W. // *Sens. Actuator B-Chem*. 2016. V. 224. P. 110–117.
72. Uppal T., Hu X., Fronczek F.R., Maschek S., Bobadova-Parvanova P., Vicente M.G. // *Chemistry*. 2012. V. 18. № 13. P. 3893–3905.
73. Jones L.J., Upson R.H., Haugland R.P., PanchukVoloshina N., Zhou M.J., Haugland R.P. // *Anal. Biochem*. 1997. V. 251. № 2. P. 144–152.
74. Abdulaev N.G., Artamonov I.D., Bogachuk A.S., Feigina M.Y., Kostina M.B., Kudelin A.B., Martynov V.I., Miroshnikov A.I., Zolotarev A.S., Ovchinnikov Y.A. // *Biochem. Int*. 1982. V. 5. № 6. P. 693–703.
75. Yapici I., Lee K.S., Berbasova T., Nosrati M., Jia X., Vasileiou C., Wang W., Santos E.M., Geiger J.H., Borhan B. // *J. Am. Chem. Soc*. 2015. V. 137. № 3. P. 1073–1080.
76. Li Y., Wang Y., Yang S., Zhao Y., Yuan L., Zheng J., Yang R. // *Anal. Chem*. 2015. V. 87. № 4. P. 2495–2503.

77. Vinatier V., Guieu V., Madaule Y., Maturano M., Payrastré C., Hoffmann P. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 405. № 2. P. 255–259.
78. Mujumdar S.R., Mujumdar R.B., Grant C.M., Waggoner A.S. // *Bioconjug. Chem.* 1996. V. 7. № 3. P. 356–362.
79. Yin K., Yu F., Zhang W., Chen L. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 74. P. 156–164.
80. Yin J., Kwon Y., Kim D., Lee D., Kim G., Hu Y., Ryu J.H., Yoon J. // *Nat. Protoc.* 2015. V. 10. № 11. P. 1742–1754.
81. Kalia J., Raines R.T. // *Curr. Org. Chem.* 2010. V. 14. № 2. P. 138–147.
82. Hao Z., Hong S., Chen X., Chen P.R. // *Acc. Chem. Res.* 2011. V. 44. № 9. P. 742–751.
83. Best M.D. // *Biochemistry.* 2009. V. 48. № 28. P. 6571–6584.
84. Kurpiers T., Mootz H.D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2009. V. 48. № 10. P. 1729–1731.
85. Kolb H.C., Finn M.G., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001. V. 40. № 11. P. 2004–2021.
86. Kiick K.L., Saxon E., Tirrell D.A., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 1. P. 19–24.
87. Kho Y., Kim S.C., Jiang C., Barma D., Kwon S.W., Cheng J., Jaunbergs J., Weinbaum C., Tamanoi F., Falck J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 34. P. 12479–12484.
88. Speers A.E., Adam G.C., Cravatt B.F. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 16. P. 4686–4687.
89. Speers A.E., Cravatt B.F. // *Chem. Biol.* 2004. V. 11. № 4. P. 535–546.
90. Rostovtsev V.V., Green L.G., Fokin V.V., Sharpless K.B. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2002. V. 41. № 14. P. 2596–2599.
91. Tornøe C.W., Christensen C., Meldal M. // *J. Org. Chem.* 2002. V. 67. № 9. P. 3057–3064.
92. Agard N.J., Prescher J.A., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 46. P. 15046–15047.
93. Codelli J.A., Baskin J.M., Agard N.J., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 34. P. 11486–11493.
94. Baskin J.M., Prescher J.A., Laughlin S.T., Agard N.J., Chang P.V., Miller I.A., Lo A., Codelli J.A., Bertozzi C.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 43. P. 16793–16797.
95. Saxon E., Bertozzi C.R. // *Science.* 2000. V. 287. № 5460. P. 2007–2010.
96. Kohn M., Breinbauer R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004. V. 43. № 24. P. 3106–3116.
97. Madani F., Lind J., Damberg P., Adams S.R., Tsien R.Y., Graslund A.O. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 13. P. 4613–4615.
98. Pomorski A., Krezel A. // *Chembiochem.* 2011. V. 12. № 8. P. 1152–1167.
99. Griffin B.A., Adams S.R., Tsien R.Y. // *Science.* 1998. V. 281. № 5374. P. 269–272.
100. Chen B., Liu Q., Popowich A., Shen S., Yan X., Zhang Q., Li X.F., Weinfeld M., Cullen W.R., Le X.C. // *Metallomics.* 2015. V. 7. № 1. P. 39–55.
101. Uchinomiya S., Ojida A., Hamachi I. // *Inorg. Chem.* 2014. V. 53. № 4. P. 1816–1823.
102. Kapanidis A.N., Ebricht Y.W., Ebricht R.H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. № 48. P. 12123–12125.
103. Lata S., Reichel A., Brock R., Tampe R., Piehler J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. № 29. P. 10205–10215.
104. Wieneke R., Laboria N., Rajan M., Kollmannsperger A., Natale F., Cardoso M.C., Tampe R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2014. V. 136. № 40. P. 13975–13978.
105. Lai Y.T., Chang Y.Y., Hu L., Yang Y., Chao A., Du Z.Y., Tanner J.A., Chye M.L., Qian C., Ng K.M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 10. P. 2948–2953.
106. Ojida A., Honda K., Shinmi D., Kiyonaka S., Mori Y., Hamachi I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. № 32. P. 10452–10459.
107. Keppler A., Pick H., Arrivoli C., Vogel H., Johnsson K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 27. P. 9955–9959.
108. Gautier A., Juillerat A., Heinis C., Correa I.R., Jr., Kindermann M., Beaufils F., Johnsson K. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. № 2. P. 128–136.
109. Los G.V., Encell L.P., McDougall M.G., Hartzell D.D., Karassina N., Zimprich C., Wood M.G., Learish R., Ohana R.F., Urh M., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2008. V. 3. № 6. P. 373–382.
110. Miller L.W., Cai Y., Sheetz M.P., Cornish V.W. // *Nat. Methods.* 2005. V. 2. № 4. P. 255–257.
111. Gallagher S.S., Sable J.E., Sheetz M.P., Cornish V.W. // *ACS Chem. Biol.* 2009. V. 4. № 7. P. 547–556.
112. Wang T.Y., Friedman L.J., Gelles J., Min W., Hoskins A.A., Cornish V.W. // *Biophys. J.* 2014. V. 106. № 1. P. 272–278.
113. Correa I.R., Jr. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. V. 20. P. 36–45.
114. Benink H.A., Urh M. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1266. P. 119–128.
115. England C.G., Luo H., Cai W. // *Bioconjug. Chem.* 2015. V. 26. № 6. P. 975–986.
116. Komatsu T., Johnsson K., Okuno H., Bito H., Inoue T., Nagano T., Urano Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. V. 133. № 17. P. 6745–6751.
117. Jing C.R., Cornish V.W. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 8. P. 1704–1712.
118. Yang G., de Castro Reis F., Sundukova M., Pimpinella S., Asaro A., Castaldi L., Batti L., Bilbao D., Reymond L., Johnsson K., et al. // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 2. P. 137–139.

УДК 612.744.14

От медленных к быстрым. Гипогравитационная перестройка миозинового фенотипа мышечных волокон

Б. С. Шенкман

Государственный научный центр РФ – Институт медико-биологических проблем РАН,
123007, Москва, Хорошевское шоссе, 76А

E-mail: bshenkman@mail.ru

Поступила в редакцию 10.11.2015

Принята к печати 11.03.2016

РЕФЕРАТ Скелетные мышцы образованы волокнами разного типа, которые располагаются мозаичным образом и различаются функциональными свойствами. «Медленные» волокна отличаются высокой степенью устойчивости к утомлению и большой продолжительностью сокращения, но пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. «Быстрые» волокна обладают высокой скоростью и силой сокращения, но высокой утомляемостью. В последние десятилетия стало известно, что все эти свойства определяются преобладанием той или иной изоформы тяжелых цепей миозина (ТЦМ), т.е. миозиновым фенотипом. При гравитационной разгрузке в космическом полете и моделируемой микрогравитации в экспериментальных условиях на Земле часть медленных волокон превращается в быстрые за счет изменений интенсивности экспрессии соответствующих генов в постуральной камбаловидной мышце *m. soleus*. В обзоре рассмотрены феноменология и механизмы изменений миозинового фенотипа в условиях гравитационной разгрузки, а также гипотезы об изменении нейрональных механизмов контроля мышечных волокон и молекулярных механизмах регуляции экспрессии миозиновых генов, таких, как ингибирование сигнального пути кальцинейрин/NFATc1, эпигеномные изменения, работа специфических микроРНК. В заключительной части обзора обсуждается адаптивное значение процессов трансформации миозинового фенотипа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гравитационная разгрузка, изоформы тяжелых цепей миозина, миозиновый фенотип, регуляция экспрессии миозиновых генов, скелетная мышца, типы мышечных волокон.

Светлой памяти Ксении Бессарионовны Шаповаловой, вместе с которой автор исследовал стрипоаллидарный контроль миозинового фенотипа

ВВЕДЕНИЕ. МИОЗИНОВЫЙ ФЕНОТИП

Типы волокон скелетных мышц исследуются физиологами с 1873 года [1], когда было установлено, что в состав мышц входят волокна с различными функциональными свойствами, которые располагаются мозаичным образом. «Медленные» волокна характеризуются высокой устойчивостью к утомлению и большей продолжительностью сокращения, но пониженной максимальной силой и скоростью сокращения. «Быстрые» волокна обладают высокой скоростью и большой силой сокращения, но быстрой утомляемостью. В последние десятилетия стало известно, что эти свойства определяются преобладающей изоформой тяжелых цепей миозина (ТЦМ). Известно четыре изоформы и соответственно четыре типа волокон: I – «медленный»; IIА – «быстрый»;

IIд/х – «быстрый» и самый «быстрый» – IIВ, представленный только в мышцах мелких млекопитающих [2] (рис. 1, таблица). Изоформы миозина, преобладающие в волокне, определяют его миозиновый фенотип, а соотношение волокон различного типа составляет композицию мышцы или ее миозиновый фенотип. Помимо волокон, в которых доминирует какой-либо определенный тип изоформ ТЦМ, в мышцах присутствуют волокна, содержащие две (или больше) разные изоформы ТЦМ. Такие волокна называют гибридными. Экспрессия каждой из изоформ миозина детерминирована иннервацией волокон. Волокна, иннервированные одним мотонейроном, составляют двигательную единицу и в подавляющем большинстве случаев характеризуются единым миозиновым фенотипом [3]. Позно-тонические, или постуральные мышцы, имеющие высокий тонус и поддерживающие позу организма в условиях нормального гравитационного поля, содержат наибольшее количество волокон медленного типа I. Согласно современным представ-

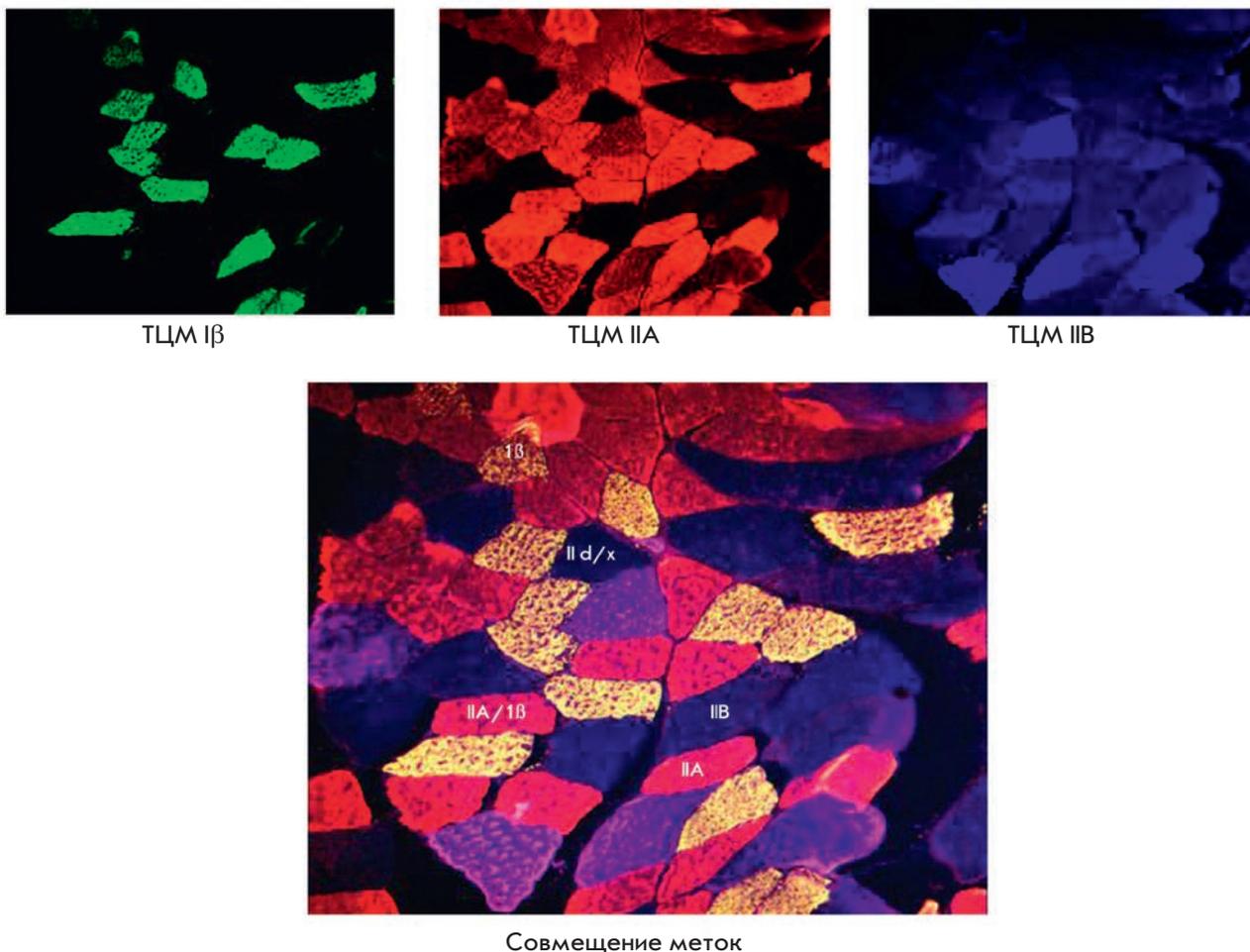


Рис. 1. Иммуноцитохимическое выявление мышечных волокон, экспрессирующих изоформы ТЦМ Iβ, ТЦМ IIА, ТЦМ IIВ, на поперечном срезе *m. plantaris* крысы методом тройного мечения. Показаны волокна основных типов, а также гибридные волокна

Изоформы ТЦМ и типы мышечных волокон млекопитающих

Изоформа ТЦМ	β	α	Iβ	IIА	II d/x	IIВ
Орган	Миокард		Скелетная мышца			
Видовая специфика	Все виды млекопитающих				Мелкие млекопитающие	
Скорость сокращения	→					
Устойчивость к утомлению	←					

лениям мотонейрон, управляя волокнами с помощью паттерна импульсации (10 Гц для «медленных» и 50–60 Гц для «быстрых» двигательных единиц) и секреции соответствующих нейротрофических агентов, влияет на экспрессию миозиновых генов, т.е. на миозиновый фенотип волокна [3, 4].

Миозиновый фенотип весьма стабилен, однако существуют воздействия, способные существенно изменить экспрессию миозиновых генов и обусловить тем

самым трансформацию медленных волокон в быстрые или наоборот. Например, низкочастотная электростимуляция в течение нескольких недель приводит к появлению около 30–40% волокон медленного типа в преимущественно «быстрых» мышцах [4]. Такой же эффект в «быстрой» мышце голени *m. plantaris* наблюдается у животного с удаленной или тенотомированной трехглавой мышцей голени, т.е. с так называемой компенсаторной перегрузкой [4]. Во всех этих

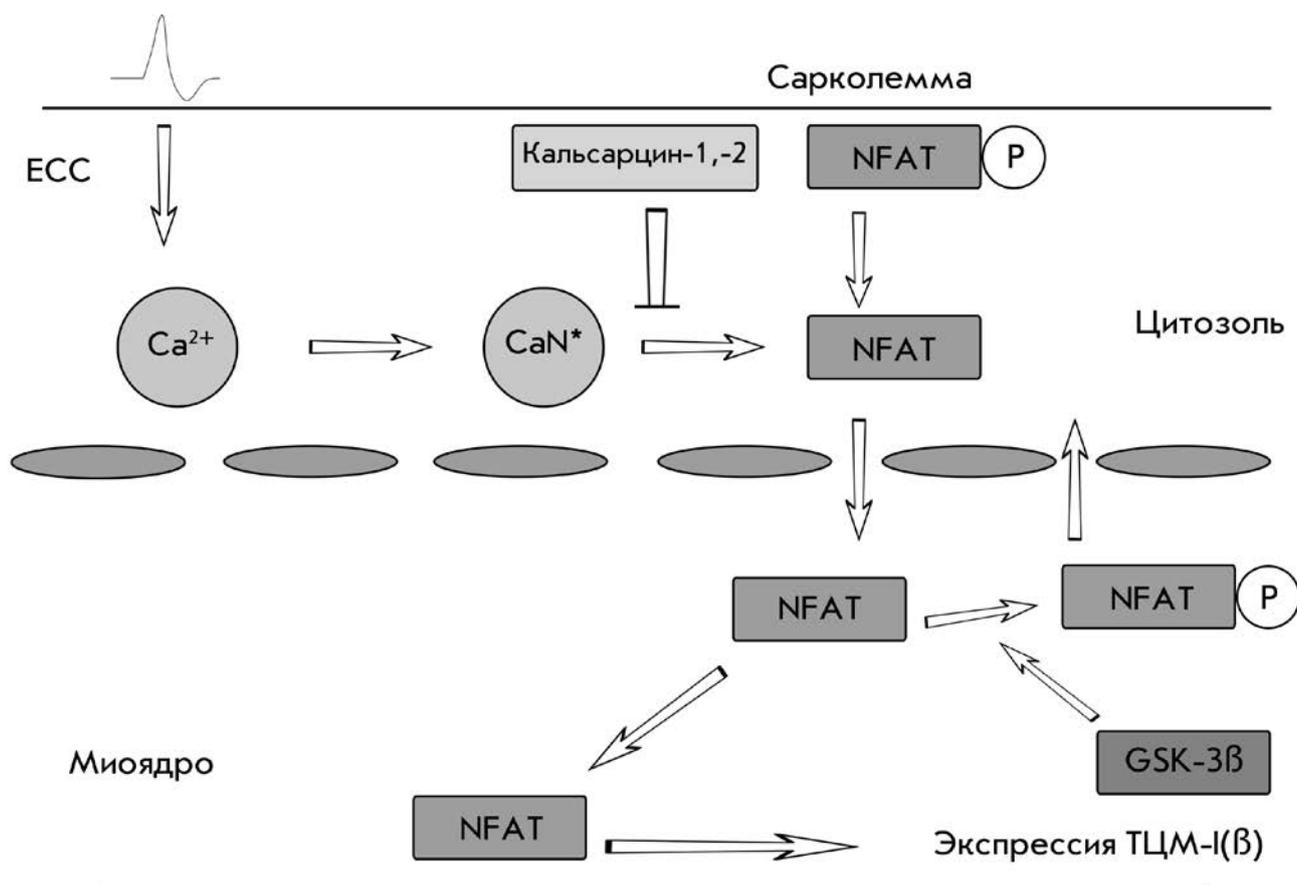


Рис. 2. Схема функционирования сигнального пути кальцинейрин/NFATc1. (По Liu и соавт. [16] с модификациями). ECC – электромеханическое сопряжение, CaN – кальцинейрин. Пояснения в тексте

случаях ведущую роль в изменении миозинового фенотипа приписывают изменению паттерна сократительной активности мышцы в результате изменения характера импульсации мотонейрона (или в случае прямой электростимуляции – ее паттерну).

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА, ЗАВИСЯЩИЕ ОТ МЫШЕЧНОЙ АКТИВНОСТИ

Хроническая активность «медленных» волокон сопровождается двумя феноменами: постоянно повышенным уровнем ионов кальция в миоплазме и сниженным уровнем макроэргических фосфатов [4–6]. Поэтому поиск сигнальных механизмов, регулирующих экспрессию генов ТЦМ, сводился к выявлению путей, зависящих от концентрации ионов кальция и макроэргических фосфатов. Наиболее важным сигнальным каскадом, влияющим на экспрессию «медленных» изоформ ТЦМ (а также регулирующим экспрессию многих других генов), считают путь кальцинейрин/NFAT. Кальцинейрин – это белок,

локализованный в Z-диске саркомера. При взаимодействии с комплексом кальций-кальмодулин он проявляет фосфатазную активность и дефосфорилирует NFATc1 (ядерный фактор активированных T-клеток), который получает возможность проникновения в миоядра [6, 7] (рис. 2). В ядре этот фактор либо накапливается в гетерохроматине (откуда постепенно переносится в эухроматин) [8], либо непосредственно взаимодействует с MEF-2, транскрипционным фактором, специфически связывающим промотор гена медленных ТЦМ. Таким образом запускается интенсивная транскрипция гена «медленных» ТЦМ [7, 8]. Реакция дефосфорилирования NFAT ингибируется белками Z-диска кальсарцинами-1 и -2, которые функционируют в медленных и быстрых волокнах соответственно. При нокауте генов этих белков наблюдается значительное перераспределение миозинового фенотипа в медленную сторону [9, 10] (рис. 2). Экспрессия генов кальсарцина (особенно кальсарцина-2) подавляется при двойном нокауте E3-убиквитинлигаз MuRf-1 и MuRf-2 [11].

Можно предположить, что экспрессия кальсарцина-2 стимулируется присутствием в ядре убиквитинлигаз семейства MuRf. Показано, что при изменении состояния титина/тайтина/коннектина киназный домен титина, локализованный в районе М-диска, освобождает/дефосфорилирует MuRf-2, что приводит к его импорту в миоядра [12]. Не исключено, что изменение титина приводит в конечном счете к повышению экспрессии кальсарцина-2, способствует стабилизации быстрого миозинового фенотипа и предотвращает любую трансформацию в медленную сторону. Однако повышенной экспрессии гена кальсарцина недостаточно для полного ингибирования фосфатазной активности кальцинейрина. Известно, что кальсарцин-2 может быть иммобилизован на цитоскелетных компонентах Z-диска – α -актинах-2 и -3, причем иммобилизация на α -актине-2 оказывается более устойчивой [13]. Поэтому в отсутствие гена α -актина-3 или при его дефиците кальсарцин устойчиво иммобилизуется, и в волокне реализуется медленный фенотип (рис. 3).

Дефосфорилирование сигнального белка GSK-3 β (киназа гликогенсинтазы) способствует экспорту NFAT из ядра и сдвигает равновесие в сторону «быстрых» изоформ [14] (рис. 2). При этом ингибирующая активность GSK-3 β может супрессироваться оксидом азота через cGMP-путь [15].

Другой механизм регуляции миозинового фенотипа, также кальций-зависимый, реализуется через киназную активность кальций-кальмодулин-киназы (CaMK). При активации комплексом кальций-кальмодулин этот фермент фосфорилирует гистондеацетилазу 4 (HDAC4), не позволяя ей войти в пространство миоядра [16]. При низкой концентрации комплекса кальций-кальмодулин и соответственно низкой киназной активности CaMK HDAC4 оказывается недофосфорилированной, и часть ее молекул проникает в миоядра [17]. В миоядрах HDAC4 деацетирует не только гистон H3, но и транскрипционный фактор MEF-2, взаимодействующий с промотором гена *myf7* (т.е. гена ТЦМ I β) [17]. Это приводит к снижению как общей транскрипционной активности генома, так и экспрессии ТЦМ I β (рис. 4). Интересно, что и в этом случае существует «сдерживающий» механизм: HDAC4 может быть убиквитинирована и разрушена. При этом сохраняется медленный характер миозинового фенотипа [18].

Соотношение фосфорилированных и нефосфорилированных макроэргических фосфатов, другой физиологический триггер сигнальных процессов, регулирует активность AMP-зависимой протеинкиназы (АМПК), контролирующей основные пути энергетического метаболизма мышечного волокна [19]. Кроме того, АМПК фосфорилирует гистонде-

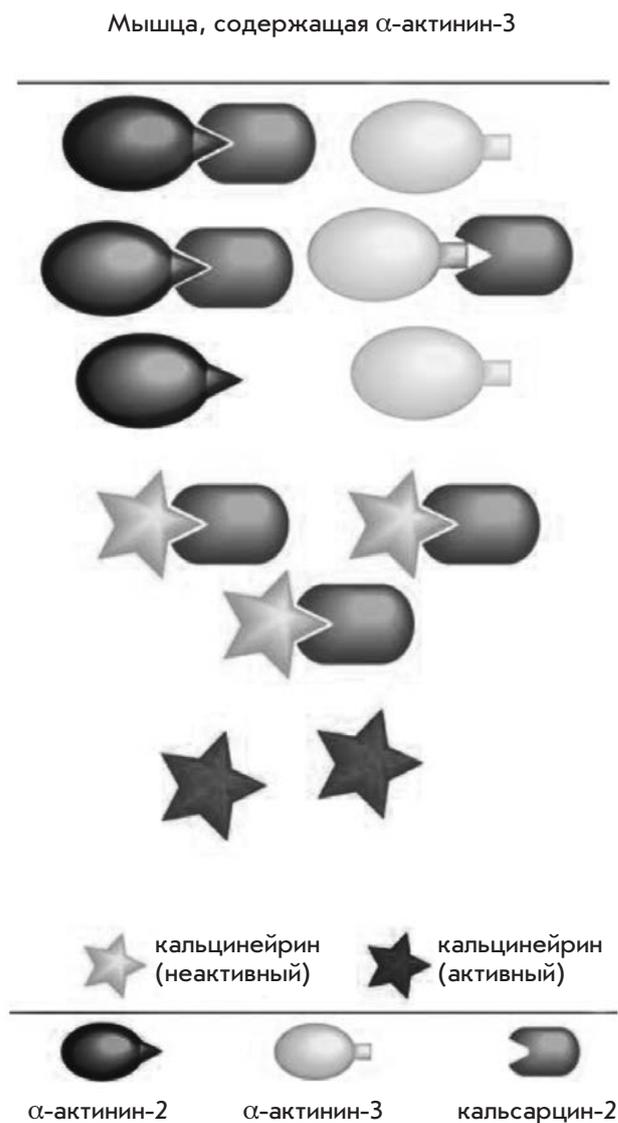


Рис. 3. Схема депонирования кальсарцина в структуре α -актина-2 и -3. (По Seto и соавт. в модификации [13]). Пояснения в тексте

ацетилазы HDAC4 и 5, что существенно облегчает экспрессию «медленной» изоформы ТЦМ и ряда генов, контролирующих регуляторные белки окислительного метаболизма [20, 21]. При этом активность АМПК может модулироваться (стимулироваться) оксидом азота [22].

Еще один механизм модуляции миозинового фенотипа обеспечивает регуляцию экспрессии гена ТЦМ I β (ген *myh7*) по типу положительной обратной связи с участием микроРНК. Кроме основного гена ТЦМ I β (ген *myh7*), геном млекопитающих содержит ген *myh7b* (*myh14*), который экспрессируется в скелет-

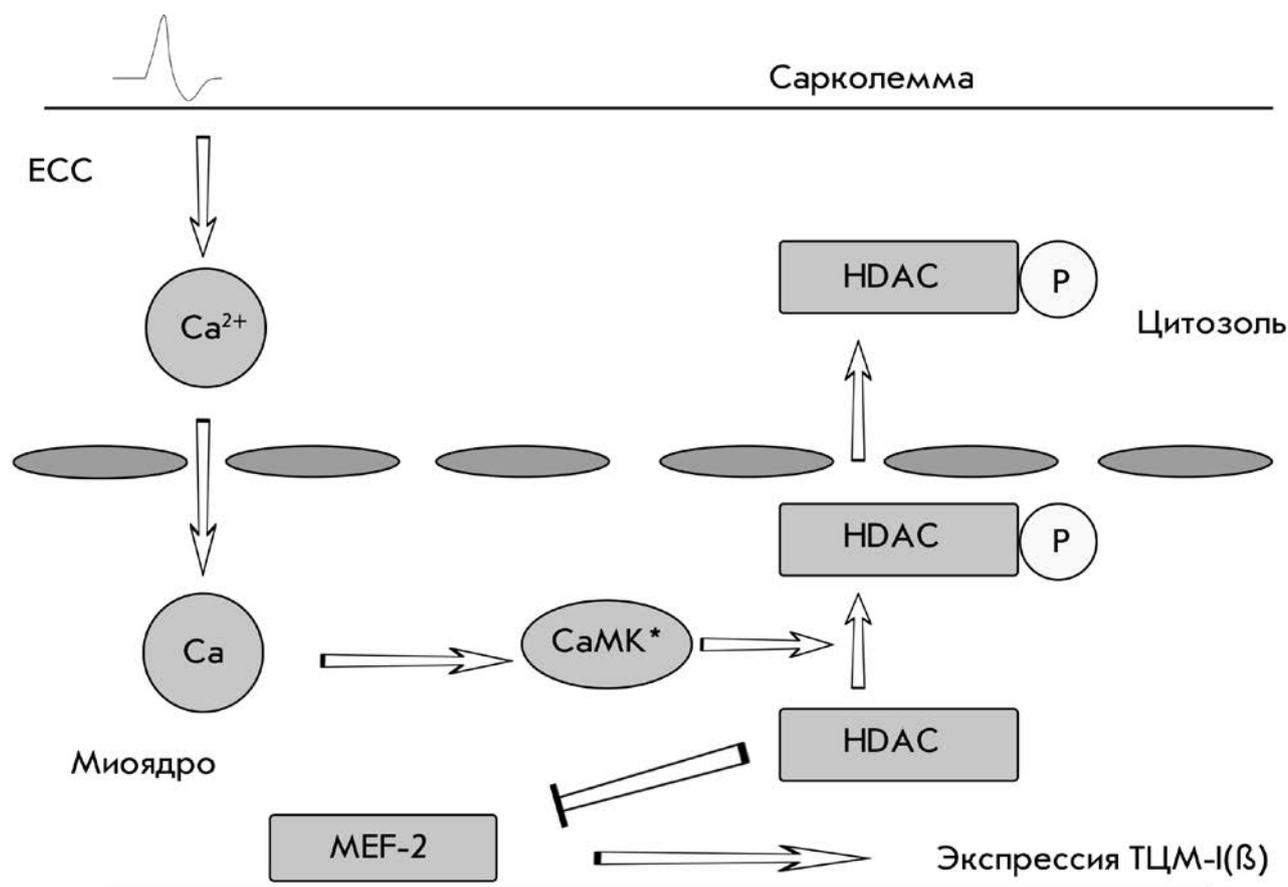


Рис. 4. Схема функционирования сигнального пути кальций-кальмодулин-киназа/гистондеацетилаза 4/5 (по Liu и соавт. [17] с модификациями). HDAC – гистондеацетилаза, CaMK – кальций-кальмодулин-киназа, MEF-2 – транскрипционный фактор (myocyte enhancement factor)

ной мышце взрослых млекопитающих в виде мРНК; на уровне белка этот ген экспрессируется только в экстраокулярной мышце [23]. Однако его интроны кодируют микроРНК miR-499. Экспрессию гена *myh7b* стимулирует miR-208b, кодируемая интроном основного гена медленного миозина *myh7*. В свою очередь, miR-499 препятствует экспрессии специфических блокаторов промотора гена *myh7* (Sox6, Pur-β и Thrap1) [24] (рис. 5). Интересно, что экспрессия гена *myh7b* стимулируется при сверхэкспрессии MEF-2 (основного транскрипционного стимулятора ТЦМ Iβ) [25]. Это предполагает, что при повышении концентрации комплекса кальций/кальмодулин MEF-2, который может дефосфорилироваться кальцинеирином [26], проникает в ядро и регулирует экспрессию *myh7*. Он одновременно стимулирует синтез miR-499, не допуская блокаду экспрессии ТЦМ Iβ [25]. Таким образом, экспрессия miR-499 и miR-208b обеспечивает беспрепятственный синтез медленного миозина при наличии соответствующего физиологического стимула (ионов кальция).

МИОЗИНОВЫЙ ФЕНОТИП В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

Изменения миозинового фенотипа волокон при гравитационной разгрузке зарегистрированы во многих лабораториях, в частности, обнаружено, что в *m. soleus* задних конечностей крыс при вывешивании (рис. 6) увеличивается содержание (%) волокон типа II и уменьшается доля волокон типа I [27–30].

После семидневного космического полета наблюдали сдвиг соотношения типов волокон от «медленных» к «быстрым» в *m. soleus* и *m. extensor digitorum longus* крыс [31, 32]. В 12,5–14-дневном полете обнаружено снижение на 20–25% содержания волокон типа I в *m. soleus* и *m. adductor longus* [33, 34]. Нами впервые выявлено увеличение относительного содержания волокон типа II в *m. soleus* и *m. vastus lateralis* у обезьян после 12,5-суточного космического полета на биоспутнике «КОСМОС-2229» [35]. В тех случаях, когда сдвиг соотношения волокон не удавалось обнаружить с помощью окраски на миофибриллярную АТФ-азу, как правило, наблюдалось увеличение ко-

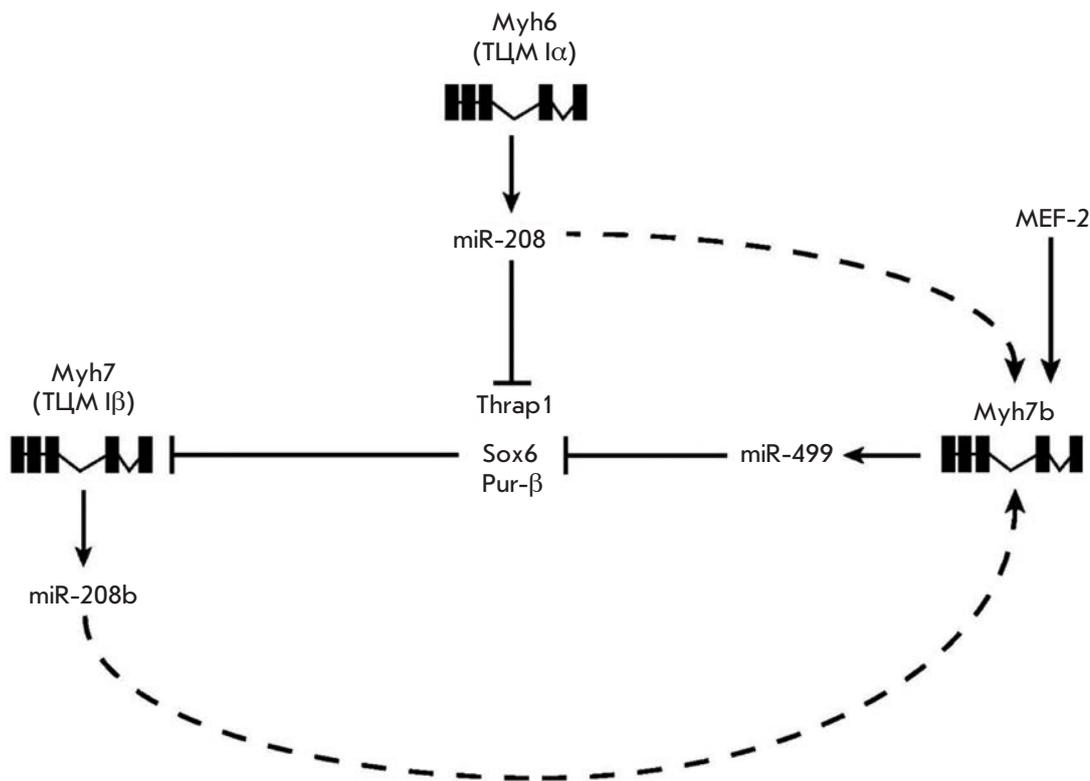


Рис. 5. Участие микроРНК в регуляции экспрессии ТЦМ Iβ (по McCarthy и соавт. [25]). Пояснения в тексте

личества волокон, реагирующих с антителами против «быстрого» миозина, и уменьшение содержания волокон, реагирующих с антителами против «медленного» миозина [36–41]. С помощью электрофореза в опытах с вывешиванием обнаружено появление новой изоформы тяжелых цепей миозина – 2d, или 2x [40]. Неоднократно при вывешивании или после космического полета выявляли увеличение доли волокон, содержащих как «медленные», так и «быстрые» формы тяжелых цепей миозина [37, 41]. Уменьшение доли волокон, экспрессирующих «медленную» изоформу ТЦМ, и увеличение доли волокон, экспрессирующих «быстрые» изоформы, наблюдали и в пробах *m. soleus*, взятых у астронавтов после 6-месячного полета [42]. Сдвиг соотношения изоформ ТЦМ в «быструю» сторону обнаружен в *m. vastus lateralis* у астронавтов после 11-суточного полета при помощи электрофоретического анализа [43]. В нашей лаборатории уменьшение доли волокон с ТЦМ «медленного» типа в *m. soleus* наблюдали уже после 7-суточной экспозиции в условиях «сухой» иммерсии [44, 45]. Интересно, что выраженность трансформации миозинового фенотипа в быструю сторону, как правило, не превышает 15–20% волокон, тогда как другие эффекты мышечной разгрузки затрагивают большинство волокон данной мышцы. Этот факт заставляет предположить, что окончательная стабилизация бы-

строого фенотипа в условиях разгрузки достигается лишь в части трансформированных волокон.

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИОЗИНОВОГО ФЕНОТИПА В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

Ряд наблюдений свидетельствует о том, что устранение опорной афферентации является основным механизмом, приводящим к «отключению» электрической активности двигательных единиц постуральной мышцы в условиях гравитационной разгрузки (для обзора см. [44]). Применение механической стимуляции опорных зон стопы в этих условиях позволяет поддерживать нормальный уровень электрической активности постуральной мышцы. Интересно, что применение механической стимуляции опорных зон стопы на фоне экспозиции в условиях «сухой» иммерсии позволило избежать снижения доли «медленных» волокон [44, 45]. При вывешивании крыс, у которых подошва одной из задних ног взаимодействовала с искусственной опорой, в *m. soleus* этой ноги, в отличие от контралатеральной конечности, не наблюдалась трансформация миозинового фенотипа в быструю сторону [46]. Низкочастотная хроническая электростимуляция *m. soleus* крысы на фоне традиционной модели вывешивания также позволяет предотвратить трансформацию мио-

зинового фенотипа [47, 48]. Такие же эффекты наблюдали и при хроническом растяжении мышцы или при использовании резистивных упражнений на фоне гравитационной разгрузки (вывешивание или 84-суточная гипокинезия) [49–51]. Результаты этих работ свидетельствуют о том, что низкоинтенсивная мышечная активность и резистивные воздействия предотвращают изменение миозинового фенотипа. На основе приведенных наблюдений можно предположить, что сдвиг миозинового фенотипа при гравитационной разгрузке обусловлен, в том числе, изменениями нейронального контроля активности двигательных единиц. Действительно, в экспериментах с трехсуточной сухой иммерсией у человека обнаружена инактивация двигательных единиц медленного типа [52]. Эти результаты подтверждены в экспериментах с регистрацией электрической активности *m. soleus* и быстрых синергистов у *Macaca mulatta* в космическом полете [53] и при вывешивании крыс, а также их экспозиции в условиях полета по параболе Кеплера [54]. Можно предположить, что именно «отключение» медленных двигательных единиц приводит к изменению миозинового фенотипа во всех перечисленных случаях. Подтверждением этой гипотезы могут служить результаты, полученные на модели «спинальной изоляции», при которой перерезают все афферентные и нисходящие входы в поясничный отдел спинного мозга при интактных моторных окончаниях. В этих экспериментах при полном «отключении» спинальных мотонейронов наблюдается сдвиг миозинового фенотипа в «быструю» сторону [55]. Повышение устойчивости позных синергий у животных с помощью хронической подачи карбохолина в структуры стриопаллидума в условиях вывешивания сопровождалось даже увеличением доли волокон медленного типа в *m. soleus* [56]. Отключение афферентной активности *m. tibialis anterior*, антагонисте *m. soleus*, на фоне вывешивания с помощью тенотомии позволяло предотвратить увеличение доли волокон быстрого типа в камбаловидной мышце крысы [57]. Можно себе представить, что при гравитационной разгрузке активация *m. tibialis anterior* [58] или уменьшение интенсивности возбуждающих стриопаллидарных влияний [56] обуславливают снижение импульсной активности «медленных» двигательных единиц *m. soleus* и тем самым приводят к изменению миозинового фенотипа ее волокон.

Другой гипотетический нейрофизиологический механизм инактивации двигательных единиц *m. soleus* в условиях микрогравитации обсуждается в связи с изучением мышечных эффектов вестибулярной деафферентации животных. С этой целью были проведены опыты с деафферентацией вестибулярных



Рис. 6. Метод вывешивания крыс по Ильину–Новикову в модификации Morey-Holtom

рецепторов с помощью инъекции арсенилата [59]. После месячной адаптации крыс к вестибулярной деафферентации в *m. soleus* наблюдали уменьшение доли волокон, экспрессирующих ТЦМ Iβ, и площади их поперечного сечения, а также увеличение доли волокон, экспрессирующих быстрые изоформы ТЦМ. Привлекает внимание внешнее сходство обнаруженного феномена и трансформации миозинового фенотипа в космическом полете. Они указывают на возможность того, что функциональные изменения вестибулярного аппарата в условиях невесомости могут способствовать изменению характера экспрессии миозиновых изоформ. Эта точка зрения достаточно уязвима. Во-первых, трансформация миозинового фенотипа в медленную сторону наблюдается и в наземных моделях невесомости, когда функция вестибулярного аппарата изменена незначительно (см. выше). Во-вторых, аналогичные исследования, проведенные с использованием хирургической вестибулярной деафферентации (лабиринтэктомии), привели к изменениям противоположной направленности в *m. soleus* животных. Обнаружен сдвиг миозинового фенотипа *m. soleus* в сторону увеличения доли медленных волокон [60, 61]. К сожалению, приведенными публикациями исчерпываются наши знания о вестибулярных влияниях на миозиновый фенотип постуральной мышцы. Очевидно, вопросов остается гораздо больше, чем ответов. Дальнейшие исследования помогут ликвидировать белые пятна в этой области знания.

ЭКСПРЕССИЯ МИОЗИНОВЫХ ГЕНОВ В УСЛОВИЯХ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ

В начале обзора сказано, что изменения миозинового фенотипа при функциональной разгрузке (disuse)

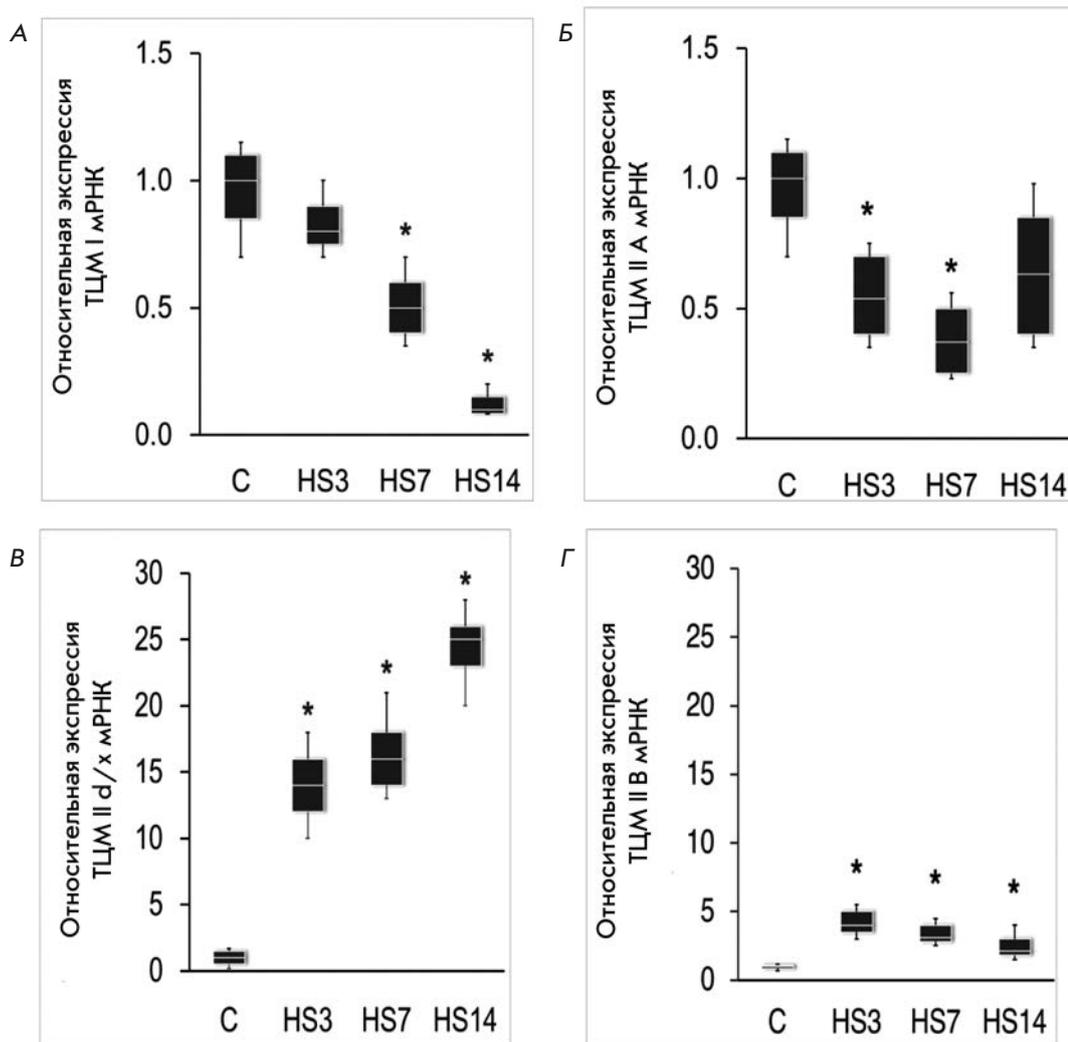


Рис. 7. Динамика экспрессии мРНК изоформ ТЦМ в *m. soleus* крысы в условиях разгрузки (вывешивания) [64] HS3 – 3 суток вывешивания, HS7 – 7 суток вывешивания, HS14 – 14 суток вывешивания. Данные получены методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени

определяются снижением экспрессии гена «медленной» изоформы ТЦМ и увеличением экспрессии генов «быстрых» изоформ ([4] и др.). Интересно проследить за динамикой этого процесса. Stevens и соавт. впервые показали, что уже на 4-е сутки вывешивания у крыс породы Wistar наблюдалось небольшое снижение содержания мРНК ТЦМ I β , которое на 7-е сутки принимает форму тенденции и составляет примерно 20% [62]. Ученым из University of California, Irwin на крысах линии Sprague-Dowley удалось обнаружить статистически значимое снижение мРНК ТЦМ I β уже после 24 ч вывешивания [63]. На крысах Wistar нами выявлено значимое снижение содержания мРНК ТЦМ I β на 7-е сутки вывешивания, однако некоторая тенденция к этому наблюдалась уже на 3-и сутки [64] (рис. 7А). Таким образом, во всех этих работах показано снижение экспрессии мРНК медленной изоформы тяжелых це-

пей миозина, однако скорость этого процесса варьирует в разных исследованиях. Отмечен также ранний и существенный рост содержания в мышце мРНК, кодирующих изоформы тяжелых цепей миозина IIВ и II d/x (рис. 7В,Г). Интересно, что после 3–4 суток вывешивания в пучках отдельных волокон не находят ни одного «чисто» медленного волокна, т.е. в каждом волокне идет постепенное замещение ТЦМ I β изоформами быстрых типов [65]. По нашим данным, динамика содержания мРНК ТЦМ IIА [66] отличается как от динамики мРНК ТЦМ I β , так и ТЦМ II d/x и IIВ. Уже после 3 суток вывешивания содержание мРНК ТЦМ IIА демонстрирует снижение, которое продолжается до 7 суток. Содержание мРНК ТЦМ IIА после 14 суток вывешивания оказывается столь высоким, что не отличается от контрольных значений (рис. 7Б). Итак, изменениям миозинового фенотипа при гравитационной разгрузке предшествует

изменение паттерна экспрессии мРНК, кодирующих соответствующие изоформы ТЦМ, поэтому поиск молекулярных механизмов трансформации миозинового фенотипа в большой степени сводится к изучению механизмов регуляции экспрессии миозиновых генов.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИЗОФОРМ ТЯЖЕЛЫХ ЦЕПЕЙ МИОЗИНА В ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЕ В УСЛОВИЯХ РАЗГРУЗКИ

Механизмы сдвига экспрессии генов изоформ ТЦМ в быструю сторону остаются в значительной степени неизученными. При исследовании роли сигнальной системы кальцинейрин/NFATc1 на фоне гравитационной разгрузки обнаружено, что через 14 суток вывешивания крыс по Morey-Holton наблюдается интенсивный транспорт NFATc1 в ядра волокон *m. soleus* [67]. Однако содержание NFATc1 в миоцитах мышц человека после 60 суток постельной гипокинезии существенно уменьшено [68]. Налицо явное противоречие этих данных между собой. Вопрос об интенсивности импорта NFAT в ядро при разгрузке остается неясным. С использованием циклоспорина А, ингибитора дефосфорилирования NFATc1 [69, 70], в нашей лаборатории и в лаборатории К.М. Baldwin было показано, что экспрессия мРНК ТЦМ медленного типа при действии циклоспорина А, ингибитора кальцинейрина, на фоне вывешивания еще больше снижается. Это указывает на возможную компенсаторную функцию этого сигнального пути при разгрузке. При этом различия между интенсивностью снижения экспрессии мРНК ТЦМ медленного типа при разгрузке и в тех же условиях, но при введении циклоспорина А, невелики, хоть и статистически значимы. Сходство амплитуды изменений в этом эксперименте указывает на то, что снижение экспрессии ТЦМ медленного типа при разгрузке в большой степени обусловлено ингибированием сигнального пути кальцинейрин/NFATc1.

Трансформация в сторону быстрого фенотипа не происходит при вывешивании мышцей с нокаутом по обоим убиквитинлигазам семейства MuRf [71]. Поэтому MuRf-зависимая экспрессия кальсарцина-2, возможно, является важным элементом, обеспечивающим стабилизацию быстрого миозинового фенотипа при действии гипотетических механизмов, компенсаторно направленных на сохранение «медленного» фенотипа. Нами впервые обнаружена специфичная для изоформ динамика экспрессии мРНК кальсарцинов в ходе моделируемой гравитационной разгрузки (рис. 8) [66]. На 3-и сутки вывешивания уровень экспрессии кальсарцина-1 был таким же, как в контроле, затем снижался вплоть до 14 су-

ток. Уровень мРНК кальсарцина-2 уже на 3-и сутки был в 2 раза выше, чем в контроле, и продолжал расти до 14 суток.

С учетом как опубликованных, так и собственных данных можно предположить, что в той части волокон, которая содержит значительную долю быстрых изоформ ТЦМ, повышение экспрессии кальсарцина-2 приводит к предотвращению компенсаторного усиления кальцинейринового пути и тем самым к стабилизации быстрого фенотипа в них. В других волокнах (преимущественно медленных) снижение экспрессии кальсарцина-1 может интенсифицировать кальцинейриновый путь и тем самым стабилизировать их медленный фенотип. Таким образом, к 7-м суткам формируются устойчивые популяции медленных и быстрых волокон при существенном сдвиге в сторону волокон быстрого типа. Кроме того, нам удалось обнаружить статистически значимое увеличение содержания MuRF-1 и MuRF-2 в ядерной фракции гомогената *m. soleus* после 3 суток вывешивания, т.е. именно в тот период времени, когда увеличивается экспрессия кальсарцина-2 [66]. Этот феномен вместе с эффектами нокаута генов *murf* [11] позволяет предположить существование причинно-следственной связи между транслокацией MuRF-1 и MuRF-2 в ядра на начальном этапе разгрузки и усилением экспрессии кальсарцина-2.

Возможно, что в этих процессах важную роль играет «депонирование» кальсарцина в структуре α -актинина-2. В нашей лаборатории обнаружено снижение содержания α -актинина-2 в пробах *soleus* крысы после вывешивания крыс в течение 7 суток [72]. Поэтому можно представить себе освобождение связанного кальсарцина-2 вследствие деградации α -актинина-2 в условиях моделируемой гравитационной разгрузки. Деградацию цитоскелета в условиях разгрузки обычно приписывают кальций-зависимым цистеиновым протеазам – кальпаинам. Поэтому интересно, что при повышенной экспрессии кальпастина, эндогенного ингибитора кальпаинов, у вывешенных мышцей не происходит трансформации миозинового фенотипа в быструю сторону [73]. Отсутствие трансформации у таких мышцей может свидетельствовать о том, что активация кальпаинов может быть одним из факторов, способствующих трансформации миозинового фенотипа при разгрузке. Поскольку активацию кальпаинов при гравитационной разгрузке связывают с накоплением ионов кальция в миоплазме [74–76], то следует ожидать, что блокирование поступления ионов кальция в волокно при использовании нифедипина на фоне гравитационной разгрузки приведет к снижению активности кальпаинов и менее выраженной деградации цитоскелетных белков. При этом дегра-

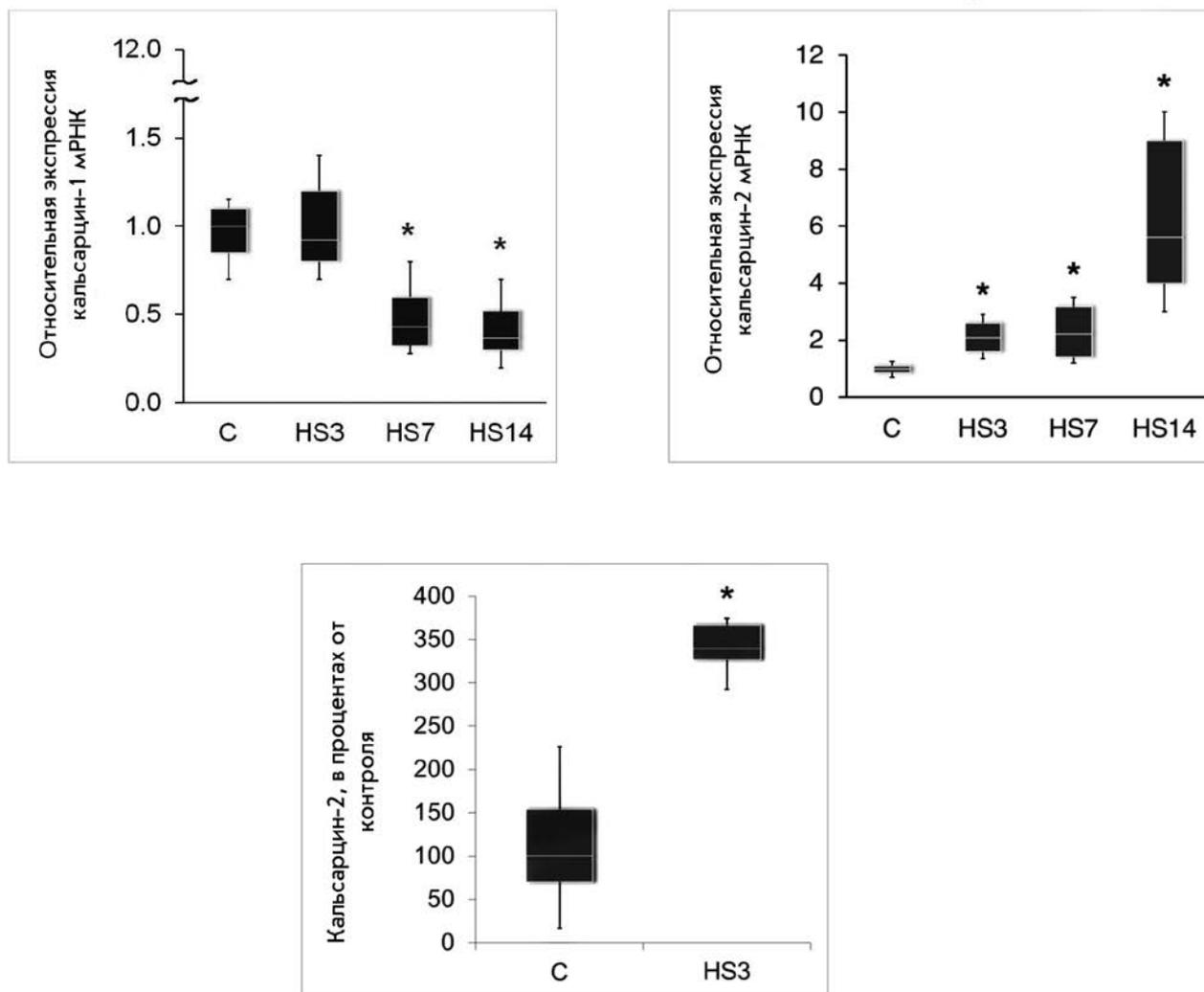


Рис. 8. Экспрессия мРНК и содержание белков семейства кальсарцинов в *m. soleus* крысы в условиях разгрузки (вывешивания) [64]. HS3 – 3 суток вывешивания, HS7 – 7 суток вывешивания, HS14 – 14 суток вывешивания. Данные получены методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени и методом вестерн-блоттинга (третий график)

дация α -актина-2 окажется не столь глубокой, как при вывешивании без дополнительных воздействий, и депо кальсарцина останется полным. В этом случае снижение экспрессии ТЦМ I β будет полностью или частично предотвращено. В подтверждение этой гипотезы нами установлено, что при хроническом введении нифедипина не происходит трансформации мышечных волокон *m. soleus* крысы при вывешивании [77]. Однако механизмы участия кальпаинов в регуляции экспрессии ТЦМ изучены недостаточно.

В 2015 году в опытах с вывешиванием крыс нам удалось наблюдать активацию (т.е. уменьшение негативного фосфорилирования) другого эндогенного ингибитора сигнального пути кальцинейрин/

NFATc1 – киназы гликогенсинтазы GSK-3 β , которая при отсутствии негативного фосфорилирования фосфорилирует NFATc1 и способствует его экспорту из ядра [66]. Активность этого фермента может быть подавлена при высоком содержании оксида азота в волокне, который действует через гуанилатциклазный механизм [78]. Нами ранее было показано, что при гравитационной разгрузке содержание оксида азота в *m. soleus* крысы значительно снижено [79]. При этом введение *L*-аргина, повышающего продукцию оксида азота, предотвращало снижение содержания мРНК ТЦМ I β . По-видимому, снижение содержания оксида азота в волокне в условиях разгрузки можно рассматривать как один из факторов

стабилизации быстрого фенотипа, который действует через GSK-3 β .

Salanova и соавт. [68] связывают снижение интенсивности импорта NFATc1 в миоцита при функциональной разгрузке с действием другого механизма: с уменьшением экспрессии каркасного белка Homer-1, которое наблюдалось в *m. soleus* и *m. vastus lateralis* человека после длительной постельной гипокинезии. В этой работе функция Homer-1 описана как функция каркасного обеспечения сближения и взаимодействия кальцинейрина и NFATc1 в постсинаптической зоне и в зоне Z-диска. Механизмы регуляции экспрессии этого белка не установлены.

О роли соотношения макроэргических фосфатов в контроле миоцинового фенотипа в условиях разгрузки можно судить лишь в том случае, если на том или ином этапе процесса наблюдается значимое изменение этого соотношения. Действительно, в ранних работах группы Ohira обнаружено, что после 10-суточного вывешивания крыс действительно повышается уровень креатинфосфата в *m. soleus* [80]. Оказалось, что снижение уровня фосфорилированных макроэргических фосфатов при введении β -гуанидинпропионовой кислоты предотвращает трансформацию миоцинового фенотипа в быструю сторону у вывешенных животных [81]. Известно, что действие хронического введения β -гуанидинпропионовой кислоты реализуется через АМПК-зависимые сигнальные механизмы [82]. Как меняется активность АМПК в условиях разгрузки не было известно до недавнего времени. Результаты двух работ в этой области явно противоречат друг другу [83, 84]. В нашей лаборатории показано, что при гравитационной разгрузке с использованием классической модели «сухой» иммерсии в течение 3 суток в *m. soleus* человека наблюдается глубокое снижение уровня фосфорилирования АМПК [85]. Предполагают, что основным механизмом влияния АМПК на экспрессию генов является фосфорилирование/дефосфорилирование молекул HDAC. Можно предположить, что их действие (ацетилирование гистона H3 и транскрипционного фактора MEF-2) должно проявляться в условиях моделируемой гравитационной разгрузки. И действительно, при вывешивании крыс повышается ацетилирование гистона H3 в локусе генов «быстрых» изоформ миозина [86]. Совсем недавно обнаружили, что при действии классического ингибитора HDAC на фоне вывешивания крыс в *m. soleus* волокна медленного типа не трансформируются в быстрые [87].

В условиях разгрузки модулируется и механизм микроРНК-зависимой регуляции экспрессии миоцинового гена (см. «Введение»). В камбаловидной мышце крыс при вывешивании снижается экспрессия

микроРНК miR-499 и miR-208b, а значит, возникают условия для работы специфических блокаторов промотора гена *myh7*, т.е. для снижения экспрессии медленного миозина [25]. С этими данными согласуются и результаты группы Tsika, свидетельствующие о повышении экспрессии блокаторов промотора гена *myh7*, Pur- α , Pur- β и SP3 и их связывании со специфическими сайтами на промоторе в условиях вывешивания [88, 89]. Эти процессы могут быть результатом снижения экспрессии гена *myh7b* и miR-499. О физиологических регуляторах специфических блокаторов экспрессии гена *myh7* и регуляторных miR-499 и miR-208b известно мало.

Приведенные в обзоре данные о регуляции экспрессии гена *myh7*, показывают, что, несмотря на изучение молекулярных механизмов, определяющих снижение экспрессии медленной изоформы ТЦМ в условиях гравитационной разгрузки, составить целостную картину о работе этих механизмов пока не удастся. Можно предполагать, что функционирование сложной системы эндогенных ингибиторов сигнального пути кальцинейрин/NFATc1 направлено на преодоление компенсаторных ответов мышцы и стабилизацию быстрого фенотипа. В то же время неизвестно, какие эпигеномные процессы запускают процесс инактивации гена *myh7* и снижения экспрессии медленной изоформы ТЦМ на самой начальной стадии гравитационной разгрузки в течение первых 24 ч.

Еще меньше известно о том, какие механизмы стимулируют работу промоторов генов «быстрых» изоформ ТЦМ. Предполагают, что в отсутствие стимуляторов «медленной» изоформы ТЦМ связывание ДНК с транскрипционным регулятором MyoD усиливает экспрессию генов «быстрого» миозина [90]. При этом у вывешенных животных с нокаутом MyoD не происходит трансформации в быструю сторону [91]. Этот факт позволяет предположить, что MyoD существенно влияет на экспрессию генов быстрых изоформ ТЦМ при гравитационной разгрузке. Интересно, что стимулирующее действие MyoD на экспрессию «быстрых» изоформ миозина ингибируется NFATc1 [92]. Другой механизм реципрокной регуляции характерен для экспрессии ТЦМ IIA, с одной стороны, и IId/x и IIB, с другой. Обнаружено, что при спинальной изоляции экспрессия ТЦМ IIA снижается, а ТЦМ IId/x повышается [93]. Аналогичный феномен мы наблюдали на ранней стадии гравитационной разгрузки в экспериментах с вывешиванием крыс [66]. Установлено, что сразу за геном ТЦМ IIA располагается промотор гена ТЦМ IId/x, транскрипция с которого осуществляется в двух направлениях. Транскрипция со смысловой цепи запускает транскрипцию гена Iix, с ком-

плементарной цепи синтезируется антисмысловая РНК, которая приводит к разрушению мРНК ТЦМ ПА [93]. Таким образом, активация экспрессии гена «быстрой» изоформы миозина вызывает снижение экспрессии гена ТЦМ ПА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Регуляция экспрессии миозиновых генов интенсивно изучается в настоящее время, однако ясное представление о давно известном и неразгаданном до сих пор феномене изменения характера экспрессии этих генов в условиях гравитационной разгрузки отсутствует. Ответы на основные вопросы, касающиеся описываемого феномена, должны быть получены в ближайшем будущем. Адаптивное значение трансформации мышечных волокон в условиях гравитационной разгрузки в многочисленных публикациях, связанных с этой проблемой, не затрагивается. В условиях гипогравитации «отключаются» преимущественно постуральные экстензоры, прежде всего *m. soleus*, а в ней – волокна, экспрессирующие медленную изоформу ТЦМ и, следовательно, реализующие медленный «тонический» режим сократительной активности. Изменение характера постуральных синергий в условиях реальной и моделируемой невесомости приводит к устранению «тонического» компонента двигательной функции. Поэтому сдвиг миозинового фенотипа в быструю сторону может быть составной частью таких адаптивных перестроек двигательного аппарата млекопитающих. Другой взгляд на адаптивное значение сдвига миозинового фенотипа основан на известных различиях трофических механизмов, т.е. механизмов поддержа-

ния структуры и метаболизма мышечных волокон медленного и быстрого типов. В элегантной работе группы Ohira [94] показано, что денервация *m. soleus* у вывешенных крыс не приводит к нарастанию атрофических изменений, т.е. к редукции площади поперечного сечения волокон. При тех же условиях атрофия *m. plantaris* была существенно меньше, чем в *m. soleus*, но была намного более выраженной, если мышца при этом еще и денервировалась. Из этого следует, что нейротрофические неимпульсные влияния в быстром волокне эффективно предотвращают интенсивное развитие атрофических процессов. Эта стратегия не характерна для волокон медленного типа, поддержание структуры которых полностью определяется интенсивностью и длительностью сократительной деятельности. Можно предположить, что трансформация миозинового фенотипа медленных волокон, превращающая их в быстрые, позволяет увеличить количество волокон, сохраняющих объем миофибрилярного аппарата в условиях бездеятельности за счет нейротрофических влияний. ●

*Я чрезвычайно признателен своему учителю
И.Б. Козловской, в совместной работе
и в творческом общении с которой сформировался
мой интерес к обсуждаемой здесь теме.
Хотелось бы также выразить благодарность
С.А. Тыганову за помощь в подготовке рукописи
к печати.*

*Работа поддержана грантом Российского научного
фонда № 14-15-00358.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ranvier L. // CR Acad. Sci. Paris. 1873. V. 77. P. 1030–1034.
- Schiaffino S., Reggiani C. // Physiol. Rev. 2010. V. 91. P. 1447–1531.
- Burke R.E. // J. Physiol. 1967. V. 193. № 1. P. 141–160.
- Pette D. // Skeletal muscle plasticity in health and disease / Eds Bottinelli R., Reggiani C. Springer, 2006. P. 1–27.
- Tavi P., Westerblad H. // J. Physiol. 2011. V. 589. Pt 21. P. 5021–5031.
- Chin E.R. // Exerc. Sport Sci. Rev. 2010. V. 38. № 2. P. 76–85.
- Schiaffino S. // Acta Physiol. (Oxf.). 2010. V. 199. № 4. P. 451–463.
- Shen T., Liu Y., Contreras M., Hernández-Ochoa E.O., Randall W.R., Schneider M.F. // Histochem. Cell Biol. 2010. V. 134. № 4. P. 387–402.
- Frey N., Frank D., Lippl S., Kuhn C., Kögler H., Barrientos T., Rohr C., Will R., Müller O.J., Weiler H., Bassel-Duby R., Katus H.A., Olson E.N. // J. Clin. Invest. 2008. V. 118. P. 3598–3608.
- Frey N., Richardson J.A., Olson E.N. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 14632–14637.
- Moriscot A., Baptista I.L., Bogomolovas J., Krohne C., Hirner S., Granzier H., Labeit S. // J. Struct. Biol. 2010. V. 170. № 2. P. 344–353.
- Lange S., Xiang F., Yakovenko A., Vihola A., Hackman P., Rostkova E., Kristensen J., Brandmeier B., Franzen G., Hedberg B., et al. // Science. 2005. V. 308. P. 1599–1603.
- Seto J.T., Quinlan K.G., Lek M., Zheng X.F., Garton F., MacArthur D.G., Hogarth M.W., Houweling P.J., Gregorevic P., Turner N., Cooney G.J., Yang N., North K.N. // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. № 10. P. 4255–4263.
- Shen T., Cseresnyes Z., Liu Y., Randall W.R., Schneider M.F. // J. Physiol. 2007. V. 579. № 2. P. 535–551.
- Martins K.J., St-Louis M., Murdoch G.K., MacLean I.M., McDonald P., Dixon W.T., Putman C.T., Michel R.N. // J. Physiol. 2012. V. 590. № 6. P. 1427–1442.
- Liu Y., Shen T., Randall W.R., Schneider M.F. // J. Muscle Res. Cell Motility. 2005. V. 26. P. 13–21.
- Liu Y., Randall W.R., Martin F., Schneider M.F. // J. Cell Biol. 2005. V. 168. № 6. P. 887–897.
- Potthoff M.J., Wu H., Arnold M.A., Shelton J.M., Backs J., McAnally J., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. P. 2459–2467.
- Sanchez A.M., Candau R.B., Csibi A., Pagano A.F., Raibon A., Bernardi H. // Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 2012. V. 303. № 5. P. C475–485.
- Röckl K.S., Hirshman M.F., Brandauer J., Fujii N.,

- Witters L.A., Goodyear L.J. // *Diabetes*. 2007. V. 56. № 8. P. 2062–2069.
21. McGee S.L., Hargreaves M. // *Clin. Sci. (London)*. 2010. V. 118. № 8. P. 507–518.
22. Lira V.A., Brown D.L., Lira A.K., Kavazis A.N., Soltow Q.A., Zeanah E.H., Criswell D.S. // *J. Physiol.* 2010. V. 588. № 18. P. 3551–3566.
23. Rossi A.C., Mammucari C., Argentini C., Reggiani C., Schiaffino S. // *J. Physiol.* 2010. V. 588. № 2. P. 353–364.
24. Van Rooij E., Quiat D., Johnson B.A., Sutherland L.B., Qi X., Richardson J.A., Kelm R.J.Jr., Olson E.N. // *Dev. Cell*. 2009. V. 17. P. 662–673.
25. McCarthy J.J., Esser K.A., Peterson C.A., Dupont-Versteegden E.E. // *Physiol. Genomics*. 2009. V. 39. № 3. P. 219–226.
26. Dunn S.E., Simard A.R., Bassel-Duby R., Williams R.S., Michel R.N. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 48. P. 45243–45254.
27. Templeton G.H., Sweeney H.L., Timson B.F., Padalino M., Dudenhoefter G.A. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1988. V. 65. № 3. P. 1191–1195.
28. Desplanches D., Mayet M.H., Sempore B., Flandrois R. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1987. V. 63. № 2. P. 558–563.
29. Riley D.A., Slocum G.R., Bain J.L., Sedlak F.R., Sowa T.E., Melender J.W. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1990. V. 69. № 1. P. 58–66.
30. Desplanches D., Kayar S.R., Sempore B., Flandrois R., Hoppe H. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1990. V. 69. № 2. P. 504–508.
31. Martin T.P., Edgerton V.R., Grindeland R.E. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1988. V. 65. № 5. P. 2318–2325.
32. Desplanches D., Mayet M.H., Ilyina-Kakueva E.I., Sempore B., Flandrois R. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1990. V. 68. № 1. P. 48–52.
33. Desplanches D., Mayet M.H., Ilyina-Kakueva E.I., Frutoso J., Flandrois R. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 1991. V. 63. P. 288–292.
34. Miu B., Martin T.P., Roy R.R., Oganov V.S., Ilyina-Kakueva E.I., Marini J.F., Leger J.J., Bodine-Fowler S., Edgerton V.R. // *FASEB J.* 1990. V. 4. P. 64–72.
35. Shenkman B.S., Kozlovskaya I.B., Kuznetsov S.L., Nemirovskaya T.L., Desplanches D. // *J. Gravit. Physiol.* 1994. V. 1. № 1. P. P64–P66.
36. Baldwin K.M., Herrick R., Ilyina-Kakueva E.I., Oganov V.S. // *FASEB J.* 1990. V. 4. P. 79–83.
37. Ohira Y., Jiang B., Roy R.R., Oganov V., Ilyina-Kakueva E., Marini J.F., Edgerton V.R. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1992. V. 73. № 2. Suppl. P. 51S–57S.
38. Guezennec C.Y., Gilson E., Serrurier B. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 1990. V. 60. № 6. P. 430–435.
39. Campione M., Ausoni S., Guezennec C., Shiaffino S. // *J. Appl. Physiol.* 1993. V. 74. № 3. P. 1156–1160.
40. Takahashi H., Wada M., Katsuta S. // *Acta Physiol. Scand.* 1991. V. 143. № 1. P. 131–132.
41. Thomason D., Morrison P.R., Oganov V., Ilyina-Kakueva E.I., Booth F.W., Baldwin K.M. // *J. Appl. Physiol.* 1992. V. 73. № 2. Suppl. P. 90S–93S.
42. Trappe S., Costill D., Gallagher P., Creer A., Peters J.R., Evans H., Riley D.A., Fitts R.H. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2009. V. 106. № 4. P. 1159–1168.
43. Zhou M.Y., Klitgaard H., Saltin B., Roy R.R., Edgerton V.R., Gollnick P.D. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1995. V. 78. № 5. P. 1740–1744.
44. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2004. Т. 90. № 5. С. 508–521.
45. Шенкман Б.С., Подлубная З.А., Вихлянцев И.М., Литвинова К.С., Удальцов С.Н., Немировская Т.Л., Лемешева Ю.С., Мухина А.М., Козловская И.Б. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. Вып. 5. С. 881–890.
46. Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2002. V. 87. № 2. P. 120–126.
47. Leterme D., Falempin M. // *Pflug. Arch.* 1994. V. 426. P. 155–160.
48. Dupont E., Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Stevens L. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. P. R408–R417.
49. Falempin M., Mounier Y. // *Acta Astronautics*. 1998. V. 42. № 1–8. P. 489–501.
50. Подлубная З.А., Вихлянцев И.М., Мухина А.М., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. // *Биофизика*. 2004. Т. 49. Вып. 3. С. 424–429.
51. Gallagher P., Trappe S., Harber M., Creer A., Mazzetti S., Trappe T., Alkner B., Tesch P. // *Acta Physiol. Scand.* 2005. V. 185. P. 61–69.
52. Киренская А.В., Козловская И.Б., Сирота М.Г. // *Физиол. человека*. 1986. Т. 12. № 1. С. 617–632.
53. Roy R.R., Hodgson J.A., Aragon J., Day M.K., Kozlovskaya I., Edgerton V.R. // *J. Gravit. Physiol.* 1996. V. 3. № 1. P. 11–15.
54. Kawano F., Nomura T., Ishihara A., Nonaka I., Ohira Y. // *Neurosci.* 2002. V. 114. № 4. P. 1133–1138.
55. Huey K.A., Roy R.R., Baldwin K.M., Edgerton V.R. // *Muscle Nerve*. 2001. V. 24. № 4. P. 517–526.
56. Шенкман Б.С., Шаповалова К.Б., Мухина А.М., Козловская И.Б., Немировская Т.Л., Камкина Ю.В. // *ДАН*. 2006. Т. 407. № 6. С. 842–844.
57. Шенкман Б.С., Немировская Т.Л., Мухина А.М., Подлубная З.А., Вихлянцев И.М., Ардабьевская А.В., Козловская И.Б., Григорьев А.И. // *ДАН*. 2005. Т. 400. № 6. С. 840–843.
58. Юганов Е.М., Касьян И.И., Черепяхин М.А., Горшков А.И. // *Пробл. косм. биол.* 1962. Т. 2. С. 206–214.
59. Luxa N., Salanova M., Schiffel G., Gutschmann M., Besnard S., Denise P., Clarke A., Blottner D. // *J. Vestib. Res.* 2013. V. 23. P. 187–193.
60. Fuller Ch. // *XII Conf. on space biology and aerospace medicine, Moscow*. 2002. P. 449–450.
61. Kasri M., Picquet F., Falempin M. // *Exp. Neurol.* 2004. V. 185. № 1. P. 143–153.
62. Stevens L., Sultan K.R., Peuker H., Gohlsch B., Mounier Y., Pette D. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 1999. V. 46. P. 1044–1049.
63. Giger J.M., Bodell P.W., Zeng M., Baldwin K.M., Haddad F. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2009. V. 107. № 4. P. 1204–1212.
64. Шенкман Б.С., Ломоносова Ю.Н. // *ДАН*. 2014. Т. 459. № 6. С. 759–761.
65. Stevens L., Gohlsch B., Mounier Y., Pette D. // *FEBS Lett.* 1999. V. 463. P. 15–18.
66. Lomonosova Y.N., Turtikova O.V., Shenkman B.S. // *J. Muscle Res. Cell Motility*. 2016. V. 37. № 1. P. 7–16. doi: 10.1007/s10974-015-9428-y.
67. Dupont-Versteegden E.E., Knox M., Gurley C.M., Houle J.D., Peterson C.A. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002. V. 282. P. C1387–C1395.
68. Salanova M., Bortoloso E., Schiffel G., Gutschmann M., Belavy D.L., Felsenberg D., Sandra Furlan S., Volpe P., Blottner D. // *FASEB J.* 2011. V. 25. P. 4312–4325.
69. Ломоносова Ю.Н., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. 2009. Т. 95. № 9. С. 969–974.
70. Pandorf C.E., Jiang W.H., Qin A.X., Bodell P.W., Baldwin K.M., Haddad F. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. V. 297. № 4. P. R1037–R1048.
71. Labeit S., Kohl C.H., Witt C.C., Labeit D., Jung J., Granzier H. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2010. V. 2010. Article 693741.
72. Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С., Ушаков И.Б., Огнева И.В. // *ДАН*. 2012. Т. 44. № 2. С. 216–218.
73. Tidball J.G., Spencer M.J. // *J. Physiol.* 2002. V. 545. № 3. P. 819–828.

74. Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B. // *J. Appl. Physiol.* 1999. V. 87. № 1. P. 386–390.
75. Ingalls C.P., Wenke J.C., Armstrong R.B. // *Aviat. Space Environ. Med.* 2001. V. 72. № 5. P. 471–476.
76. Kandarian S.C., Stevenson E.J. // *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2002. V. 30. № 3. P. 111–116.
77. Мухина А.М., Алтаева Э.Г., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2006. Т. 92. № 11. С. 1285–1295.
78. Drenning J.A., Lira V.A., Simmons C.G., Soltow Q.A., Sellman J.E., Criswell D.S. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008. V. 294. P. 1088–1095.
79. Ломоносова Ю.Н., Каламкаров Г.Р., Бугрова А.Е., Шевченко Т.Ф., Карташкина Н.Л., Лысенко Е.А., Швец В.И., Немировская Т.Л. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. Вып. 5. С. 699–710.
80. Wakatsuki T., Ohira Y., Yasui W., Nakamura K., Asakura T., Ohno H., Yamamoto M. // *Jpn. J. Physiol.* 1994. V. 44. № 2. P. 193–204.
81. Matoba T., Wakastuki T., Ohira Y. // *Med. Sci. Sports Exerc.* 1993. V. 25. № 5. P. S157.
82. Zong H., Ren J.M., Young L.H., Pypaert M., Mu J., Birnbaum M.J., Shulman G.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 25. P. 15983–15987.
83. Han B., Zhu M.J., Ma C., Du M. // *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 2007. V. 32. P. 1115–1123.
84. Hilder T.L., Baer L.A., Fuller P.M., Fuller C.A., Grindeland R.E., Wade C.E., Graves L.M. // *J. Appl. Physiol.* 2005. V. 99. P. 2181–2188.
85. Vilchinskaya N.A., Mirzoev T.M., Lomonosova Y.N., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. // *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 2015. V. 15. № 3. P. 286–293.
86. Pandorf C.E., Haddad F., Wright C., Bodell P.W., Baldwin K.M. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2009. V. 297. P. C6–C16.
87. Dupré-Aucouturier S., Castells J., Freyssenet D., Desplanches D. // *J. Appl. Physiol.* 2015. V. 119. P. 342–351.
88. Tsika G., Ji J., Tsika R. // *Mol. Cell. Biol.* 2004. V. 24. № 24. P. 10777–10791.
89. Ji J., Tsika G.L., Rindt H., Schreiber K.L., McCarthy J.J., Kelm R.J., Jr., Tsika R. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 4. P. 1531–1543.
90. Wheeler M.T., Snyder E.C., Patterson M.N., Swoap S.J. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 276. № 5. Pt. 1. P. C1069–C1078.
91. Seward D.J., Haney J.C., Rudnicki M.A., Swoap S.J. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2001. V. 280. № 2. P. C408–C413.
92. Ehlers M.L., Celona B., Black B.L. // *Cell Rep.* 2014. V. 8. P. 1–10.
93. Pandorf C.E., Haddad F., Roy R.R., Qin A.X., Edgerton V.R., Baldwin K.M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 50. P. 38330–38342.
94. Ohira Y., Yoshinaga T., Ohara M., Kawano F., Wang X.D., Higo Y., Terada M., Matsuoka Y., Roy R.R., Edgerton V.R. // *Cells Tissues Organs.* 2006. V. 182. № 3–4. P. 129–142.

УДК 615.277.3; 577.214.39

Роль белков семейства BAR в регуляции динамики клеточных мембран

Т. Б. Станишневa-Коновалова¹, Н. И. Деркачева², С. В. Полева¹, О. С. Соколова^{1*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12²Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, кафедра биохимии, 127473, Москва, ул. Делегатская, 20, стр. 1

*E-mail: sokolova184@gmail.com

Поступила в редакцию 10.03.2016

Принята к печати 22.08.2016

РЕФЕРАТ Многие процессы жизнедеятельности клетки связаны с перестройкой биологических мембран. Семейство BAR-доменных белков играет ключевую роль в формировании и детекции локальных изгибов мембран и привлечении к мембранам других белков, в том числе регулирующих перестройки актинового цитоскелета. Основываясь на структурных и филогенетических свойствах, BAR-домены принято делить на несколько групп, по-разному воздействующих на мембраны и выполняющих разные функции в клетке. Однако в последнее время появляется все больше свидетельств функциональных различий даже в пределах одной группы этого семейства. В настоящем обзоре рассмотрены принципы взаимодействия различных групп BAR-доменов и их отдельных представителей с мембранами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА BAR-домены, динамика мембран, липидные мембраны.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АС – амфипатическая спираль; ПН – поверхностное натяжение; $\Phi\text{I}(4,5)\Phi_2$ – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат.

ВВЕДЕНИЕ

При движении клетки скоординированные процессы полимеризации актина и взаимодействие актиновых филаментов с клеточной мембраной толкают активный край клетки вперед и приводят к образованию филоподий. Эти процессы координируются актинсвязывающими белками. Нарушения в функционировании актинсвязывающих белков, приводящие к нарушениям подвижности клетки, являются отличительной особенностью необластических клеток. Белки семейства BAR служат связующим звеном между динамикой актина и мембранными перестройками у всех эукариот. Изначально BAR-домены были определены как консервативные участки белков животных BIN и амфифизина, а также дрожжевых белков Rvs161 и Rvs167 [1]. Помимо BAR-домена, белки этого семейства содержат другие домены, необходимые для связывания со специфическими белками и липидами, что определяет их функцию и расположение в клетке [2] (рис. 1). Предпочтительное связывание BAR-доменов с изогнутыми участками мембраны позволяет привлекать нужные белки к местам мембранных перестроек.

BAR-доменные белки могут воздействовать на полимеризацию актина разными способами. В некоторых случаях они активируют факторы нуклеации актина WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome Protein) и WAVE (Wiskott-Aldrich Verprolin Protein) [3], другие BAR-доменные белки взаимодействуют с Rho GTP-азами [4]. Большинство BAR-доменов привлекают к мембране специфические для конкретного клеточного процесса белки за счет SH3-доменов, которые сами способны взаимодействовать со множеством белков, содержащих богатые пролином последовательности [5, 6]. Это ставит вопрос о факторах, определяющих специфичность привлечения определенных белков. Существует гипотеза, согласно которой белки-партнеры узнают не отдельные SH3-домены, а специфическое расположение нескольких SH3-доменов [7] (см. ниже).

Помимо привлечения белков-партнеров, SH3-домены часто выполняют функцию регуляции активности BAR-доменов [8, 9]. Как правило, связывание SH3 с BAR-доменом переводит структуру в автоингибированное состояние, для снятия которого необходимо взаимодействие с белком-акти-

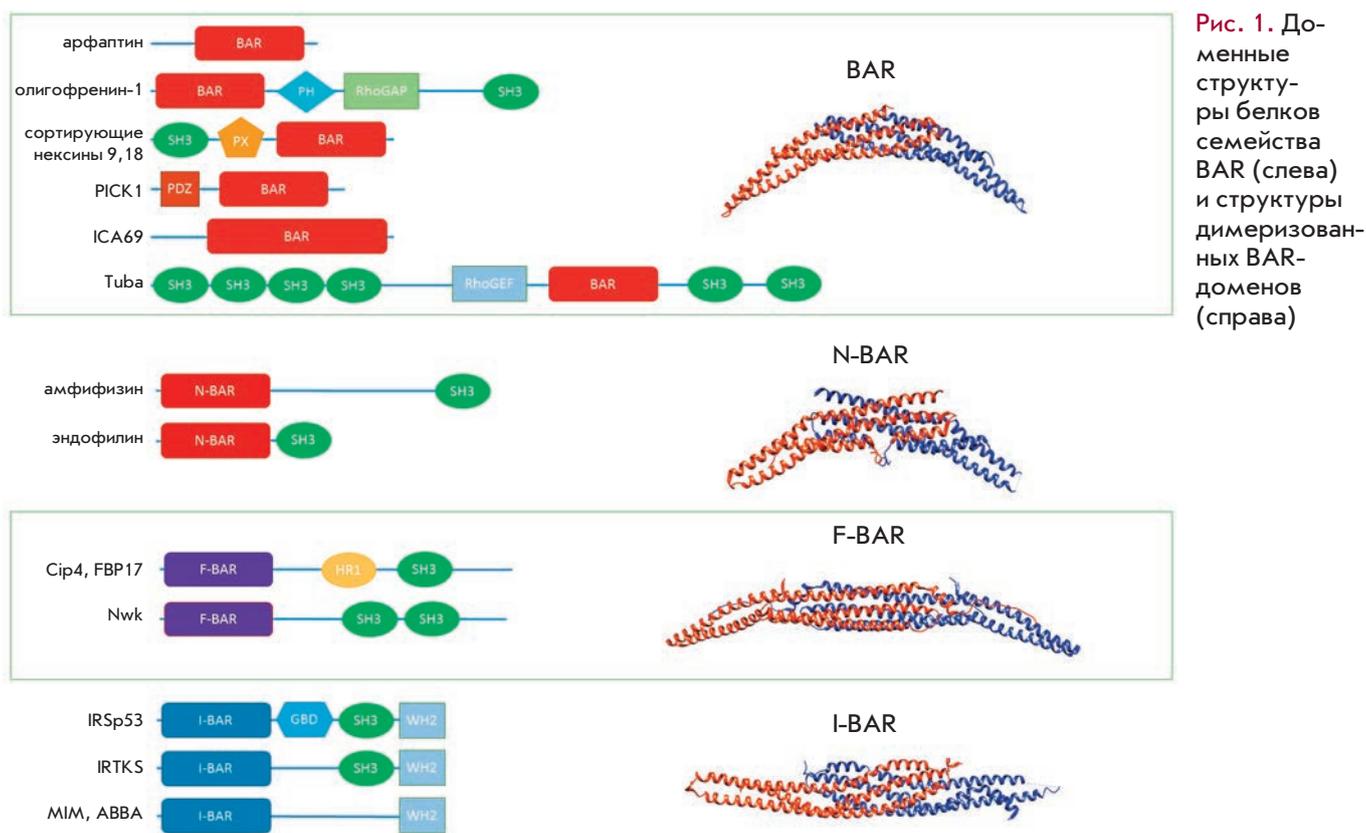


Рис. 1. Доменные структуры белков семейства BAR (слева) и структуры димеризованных BAR-доменов (справа)

ватором [9]. У F-BAR белка Nervous wreck (Nwk) связывание SH3-домена с F-BAR не блокирует его способность связываться с мембраной, а лишь увеличивает необходимое для связывания количество фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (ФИ(4,5)Ф₂) [10].

Интересный пример регуляции активности BAR-домена показывает белок PICK, функции которого связаны с интернализацией и экспонированием на поверхность клетки АМРА-рецепторов [11]. PICK ингибируется другим BAR-доменным белком – ICA69 [12], причем на сегодняшний день не ясно, обусловлено это образованием гетеродимера из BAR-доменов ICA69 и PICK или совместной олигомеризацией их гомодимеров. Второй вариант кажется более вероятным, учитывая стабильность димеров BAR-доменных белков и потенциальное участие С-концевого участка ICA69 во взаимодействии.

По данным базы Uniprot семейство BAR включает в настоящее время более 220 белков [13], только для четверти из них получены кристаллические структуры [14]. Общее свойство всех BAR-доменов – формирование димеров с положительно заряженной поверхностью, которая связывается с отрицательно заряженными липидными мембранами [15,

16]. По структурным и филогенетическим свойствам BAR-домены делятся на несколько групп: классические BAR/N-BAR, F-BAR и I-BAR (рис. 1) [17].

КЛАССИЧЕСКИЕ BAR-ДОМЕНЫ И N-BAR-ДОМЕНЫ

Классический BAR-домен представляет собой димер, в котором каждый мономер состоит из трех изогнутых антипараллельно направленных альфа-спиралей [15]. Димеры классических BAR и N-BAR имеют серповидную форму и связываются с мембраной своей вогнутой поверхностью. Большинство белков, содержащих классические BAR-домены, присутствуют в нервных клетках млекопитающих, где участвуют в формировании синаптических контактов, и в процессах, связанных с передачей сигнала [18].

Одними из наиболее изученных BAR-доменных белков являются амфифизины, функции которых связаны с эндоцитозом в нейронах [19]. У млекопитающих имеется два гена, кодирующих амфифизины. Изоформа амфифизина 2, так же как амфифизин дрозофилы, экспрессируется не в нейронах, а в мышечных клетках, где участвует в формировании и стабилизации Т-трубочек [20, 21]. Мутации в амфифизине 2/BIN1 человека вызывают наследственное нейромышечное заболевание, называемое центронуклеарная, или миотубулярная миопатия [22].

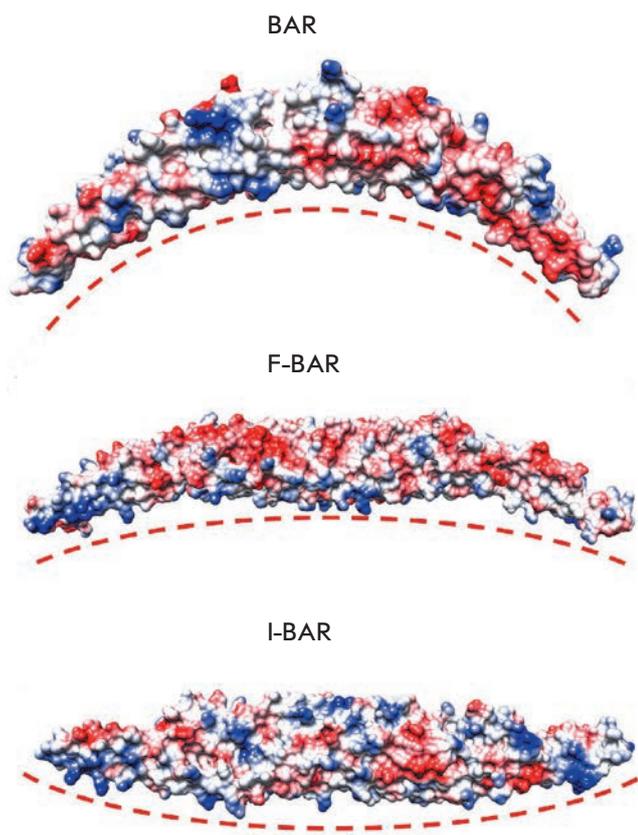


Рис. 2. Деформация мембраны BAR-доменами. Положительный и отрицательный электростатические потенциалы поверхности белка показаны синим и красным цветами соответственно, поверхность мембраны обозначена красной пунктирной линией

Единственный консервативный участок различных амфифизинов – N-концевой BAR-домен.

Кристаллическую структуру BAR-домена амфифизиона дрозофилы получили в 2004 году и предсказали, что подобные домены могут встречаться у многих групп белков [15]. На основании структурного сходства к семейству BAR-доменов была отнесена определенная ранее структура С-концевого домена арфатина [23] и расшифрованная позднее структура эндофилина [24]. На тот момент в ряде работ уже отмечали важную роль эндофилина в эндоцитозе и его взаимодействие с амфифизином и динамином [25, 26].

Согласно результатам рентгеноструктурного анализа, на концах BAR-домена, между α -спиралями 2 и 3 и на его вогнутой поверхности присутствуют кластеры положительно заряженных аминокислотных остатков (а.о.) (рис. 2), мутации которых снижали способность BAR-домена связываться с мембраной и модифицировать липосомы *in vitro*. Показано так-

же, что N-концевая последовательность амфифизиона длиной 26 а.о. имеет неупорядоченную структуру в растворе, но складывается в амфипатическую спираль (АС) при взаимодействии с липидами. Встраивание АС помогает BAR-домену формировать изгиб мембраны [27]. В дальнейшем АС обнаружили у многих (но не у всех) BAR-доменных белков.

I-BAR-ДОМЕНЫ

I-BAR-домен был впервые определен как гомологичный N-концевой домен белков IRSp53 и MIM млекопитающих и назван IM-доменом (IRSp53/MIM) [28]. Позднее, из-за структурного сходства с BAR-доменами, этот домен получил название I-BAR (Inverse BAR) [29]. I-BAR-доменные белки представлены как у высших, так и у низших эукариот, однако не найдены у дрожжей.

Подобно классическим BAR-доменам, I-BAR-домены состоят из трех α -спиралей и формируют димеры, многие из которых в опытах *in vitro* связываются с липосомами и модифицируют их кривизну [30–32]. Димер I-BAR имеет менее изогнутую форму, чем классический BAR (рис. 1). Кластеры положительно заряженных аминокислот, отвечающих за связывание с отрицательно заряженными липидами в мембране, располагаются у них не на вогнутой, а на выпуклой поверхности (рис. 2), и они вызывают изгиб мембраны в противоположную по сравнению с BAR сторону [28, 33].

Ген, кодирующий IRSp53, активно экспрессируется в различных клетках и тканях млекопитающих, особенно в нейронах. У мышей с нокаутом IRSp53 нарушены способность к обучению и память [34]. IRSp53 содержит CRIB-мотив, который связывается с GTP-азой Cdc42, и SH3-домен, взаимодействующий с WAVE. В комплексе с Cdc42 и белком Eps8 он может вызывать формирование филоподий [35], а в комплексе с WAVE – ламеллоподий [36]. Регуляция IRSp53 происходит за счет фосфорилирования двух остатков треонина, что приводит к связыванию с ним белка 14-3-3 и последующей инактивации [37]. IRTKS, ближайший гомолог IRSp53, в меньших количествах присутствует в мозге, но найден в мочевом пузыре, печени, семенниках, сердце и легких. В отличие от IRSp53 он не связывается с Cdc42, а его экспрессия в клетках вызывает образование кластеров коротких актиновых филаментов, а не филоподии, однако конкретные биологические функции IRTKS неизвестны [38]. MIM (Missing-In-Metastasis) получил свое название благодаря тому, что его экспрессия была понижена в некоторых метастазирующих линиях клеток [39], однако более поздние исследования показали, что в других метастазирующих линиях его экспрессия может быть, наоборот, повышена [40].

В процессе развития организма MIM активно экспрессируется в сердце, скелетных мышцах и центральной нервной системе. Сверхэкспрессия MIM в клеточных линиях млекопитающих приводит к исчезновению стрессовых фибрилл актина и появлению множества небольших выступов на поверхности клеток [41]. Активность MIM, как и IRSp53, регулируется фосфорилированием остатка в центральной части белка (вне I-BAR-домена) [42]. Получены данные об участии MIM в образовании цилий [43], однако точная его роль в развитии и физиологии животных не ясна. Белок AVBA, ближайший гомолог MIM, экспрессируется в глиальных клетках центральной нервной системы мышей, но отсутствует в нейронах. В культуре глиальных клеток C6-R AVBA локализуется в области кортикального актина, а его нокдаун приводит к дефектам в формировании ламеллоподий [44].

В 2011 году была расшифрована атомная структура I-BAR-домена белка Pinkbar (Planar Intestinal and Kidney-specific BAR), которая обладает практически нулевой кривизной [45]. Этот белок экспрессируется в эпителиальных клетках кишечника и почки и участвует в структуризации мембраны в зоне межклеточных контактов. I-BAR-домен белка Pinkbar, в отличие от других известных, способен формировать уплощенные участки мембраны и собираться в стабильные плоские олигомеры, причем как на липидной мембране, так и в растворе [29, 45]. Следствием олигомеризации доменов, помимо деформации мембраны, является кластеризация заряженных липидов $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$ в мембране. По сравнению с классическими BAR-доменами I-BAR-домены обладают более высоким электростатическим потенциалом и способны формировать кластеры $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$ на микроскопических масштабах [33].

F-BAR-ДОМЕНЫ

Еще одна широкая группа BAR-доменных белков имеет домен F-BAR (Fes/CIP4 homology-BAR). F-BAR-белки найдены у всех эукариот, кроме растений, они считаются важнейшими регуляторами изгиба клеточных мембран [46]. Большая часть известных F-BAR-доменных белков вовлечена в клатрин-зависимый или кавеолин-зависимый эндоцитоз. Многие также участвуют в образовании филоподий и ламеллоподий, но если филоподии необходимы для формирования аксонов [47], то ламеллоподии, напротив, ингибируют этот процесс [48]. Обе эти структуры могут обеспечивать миграцию нормальных клеток и участвовать в распространении метастазирующих [49]. Еще один важный процесс, нарушение которого приводит к развитию опухолей, – клеточное деление, также происходящее с участием F-BAR-доменных

белков. К заболеваниям, связанным с изменением уровня экспрессии или мутациями в генах, кодирующих белки этой группы, относятся нарушения развития, неврологические и аутовоспалительные заболевания, инвазивные опухоли, гипертрофия сердца, нарушения углеводного обмена и дисфункция почек, что делает F-BAR-доменные белки потенциальной терапевтической мишенью [50].

Впервые F-BAR-домен обнаружили в белке CIP4 (CDC42-Interacting Protein 4) [51]. Консервативный N-концевой участок (60 аминокислотных остатков) белков CIP4 и FES был назван FCH (FES/CIP4 Homology). Он расположен рядом с доменом, похожим по структуре на BAR-домен, и вместе с ним образует функциональную единицу – F-BAR. Анализ кристаллических структур F-BAR-доменов белков млекопитающих FBP17 и CIP4 показал, что F-BAR-домены имеют менее изогнутую и более удлиненную форму, чем классические BAR-домены [16] (рис. 1). Они состоят из пяти α -спиралей: короткой N-концевой, трех длинных и короткой C-концевой, за которой следует небольшая последовательность, ответственная за гомодимеризацию. Поверхности, которыми мономеры взаимодействуют друг с другом, содержат в основном гидрофобные остатки и несколько заряженных (рис. 2). Мутации консервативных положительно заряженных аминокислотных остатков на вогнутой стороне F-BAR-димеров приводили к снижению способности белков связываться с мембраной и модифицировать липосомы *in vitro* [16, 52].

Исследования последних лет указывают на избирательность связывания фосфолипидов некоторыми F-BAR-доменами [53, 54]. Так, у дрожжевого белка Rgd1p, активирующего GTP-азы Rho3 и Rho4 [55], обнаружен сайт связывания фосфоинозитидов, отсутствующий у других F-BAR-доменных белков дрожжей – Bzz1p и Hof1p [56]. Опыты *in vitro* показали предпочтительное связывание Rgd1p с липосомами, содержащими $\text{FI}(4,5)\text{P}_2$. Получение кристаллографической структуры Rgd1p в комплексе с мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакаисфосфатом (ИнзФ6), выступающим в роли аналога фосфоинозитидной липидной головки, позволило определить аминокислотные остатки, составляющие сайт связывания фосфоинозитидов.

Белки CIP4, FBP17 и FCHo2 также обладают специфичностью к фосфоинозитидам и имеют соответствующий сайт связывания [16, 52, 57]. Такой же сайт обнаружен у человеческого белка Gmp1r [58], который активирует GTP-азу RhoA и играет важную роль в перестройке кортикального актина в раннем митозе [59], а также в миграции нейронов [60]. И в том, и в другом процессе фосфоинозитиды явля-

ются важными регуляторами. Таким образом, специфичность связывания некоторых F-VAR-доменов с липидами позволяет привлекать F-VAR-доменные белки к определенным участкам мембраны. Кроме этого, связывание F-VAR-доменов ограничивает диффузию липидов, а следовательно, и трансмембранных белков, что может иметь важное значение для пространственной организации белков в конкретном клеточном процессе [54, 61].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ VAR-ДОМЕННЫХ БЕЛКОВ С МЕМБРАНОЙ

Основные функции VAR-доменов заключаются в **формировании** мембранного изгиба, его **распространении** и **стабилизации** и/или **распознавании** с последующим привлечением цитозольных белковых факторов к определенному месту клетки [17]. При этом возникновение изгиба и его распространение являются связанными процессами: локальные деформации мембраны, обусловленные одним димером, облегчают связывание других димеров.

Начальные этапы **формирования** мембранного изгиба происходят за счет электростатического связывания VAR-домена с мембраной и в некоторых случаях встраивания в мембрану N-концевой АС [62]. В основе связывания лежит взаимодействие положительно заряженных аминокислот с отрицательно заряженными липидами, причем некоторые VAR-домены предпочтительно связываются с фосфоинозитидами [56]. Встраивание АС в один монослой способствует образованию изгиба из-за возникающей асимметрии в структуре бислоя [63]. Показано также, что АС некоторых VAR-белков играют ключевую роль во фрагментировании небольших липосом [64]. Однако экспериментальные данные о связывании с мембранами VAR-доменов, не имеющих АС [65, 66], не позволяют однозначно ответить на вопрос о роли АС в генерации мембранного изгиба.

Для **распространения** изгиба необходимо взаимодействие многих VAR-доменов. Структуру, которую они образуют на поверхности мембраны, называют скаффолдом. Считается, что формирование скаффолда присуще всем VAR-доменным белкам, и его структура во многом определяет результат воздействия на мембрану. В свою очередь, структура скаффолда зависит от концентрации белка и натяжения мембраны. Методом крупно-зернистой молекулярной динамики показано, что N-VAR-домены при их низкой концентрации собираются на плоских мембранах и липосомах в нитевидные структуры и сетки, а при достижении поверхностной плотности 20% начинают формировать мембранный выступ [67]. N-VAR-белок эндофилин, функции которого связаны с эндоцитозом, способен индуцировать формиро-

вание трубок на гигантской липосоме при плотности около 5% и малом поверхностном натяжении (ПН). Для формирования трубок при большом ПН требуется большая плотность белков, а при ПН выше 0.25 мН/м формирование трубок полностью ингибируется. Влияние ПН на сборку скаффолда обусловлено тем, что связывание димеров концевыми участками опосредуется локальными мембранными деформациями, которым препятствует высокое значение ПН. Это говорит о том, что уменьшение ПН может запустить механизм быстрой активации эндоцитоза [68].

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ VAR-ДОМЕНОВ К ИЗГИБУ МЕМБРАНЫ

Изучение интенсивности флуоресценции белков на мембранных трубках, образованных гигантскими липосомами, показало, что VAR-домены могут работать как детекторы мембранного изгиба: плотность расположения VAR-доменов, связанных с мембранными трубками, в десятки или сотни раз выше, чем на плоской мембране. Предпочтительное связывание с мембранными трубками показано для всех протестированных VAR-доменных белков: амфифизина [69], эндофилина [70], BIN1 [71], синдапина [65] и IRSp53 [66]. Чтобы объяснить, почему похожие по структуре VAR-домены воздействуют на мембраны по-разному, необходимо рассмотреть способы организации множества VAR-доменов на мембране.

Так как рентгеноструктурный анализ не может дать представления о взаимодействии белков с полноразмерной мембраной, реконструкции олигомеров VAR-доменов, связанных с мембранными трубками, получены методом криоэлектронной микроскопии [7, 72, 73] (рис. 3).

Изучение организации F-VAR-доменов эндофилина на мембранной трубке показало, что они располагаются под углом 10° [7] (рис. 3А). Большие участки свободной мембраны между соседними тяжами (около 50 Å) могут быть обусловлены необходимостью обеспечить доступ GTP-азам, с которыми эндофилин взаимодействует в процессе эндоцитоза [74]. SH3-домены полноразмерного эндофилина при его взаимодействии с мембранной трубкой также располагались на поверхности в виде димеров. Это подтверждено опытами с поперечными сшивками цистеинов, экспериментально введенных в SH3-домены [75]. Предположили, что такая пространственная организация может узнаваться GTP-азой динамином, имеющей две расположенные рядом богатые пролином последовательности [75].

Еще одной олигомерной структурой, изученной с помощью криоэлектронной микроскопии и спиральной реконструкции, стала структура VAR-доменов изоформы амфифизина 2, вовлеченного в организа-

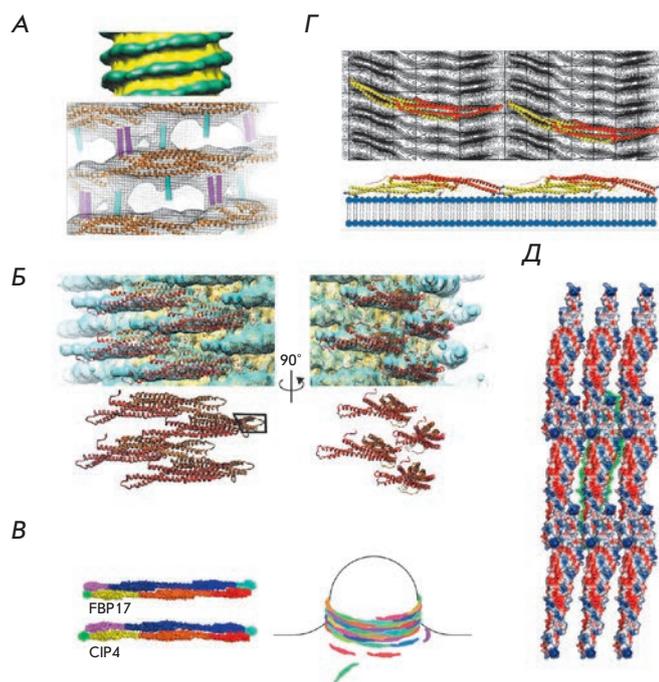


Рис. 3. Олигомеризация BAR-доменов на мембранах. А – построенная по изображениям криоэлектронной микроскопии модель мембранной трубочки диаметром 28 нм, вокруг которой собраны олигомеры эндофилина (сверху). Показано предполагаемое расположение BAR-домена (оранжевый) и дополнительных спиралей (голубой и фиолетовый) (снизу) [7]. Б – олигомеры, образованные BAR-доменами амфифизицина 2 [72]. В – схема олигомеризации BAR-доменов на мембране и формирования мембранных трубочек [16]. Г – взаимодействие между димеризованными BAR-доменами CIP4 [73]. Д – взаимодействие между димеризованными I-BAR-доменами Pinkbar [45]

цию Т-трубочек [72] (рис. 3Б). BAR-домены амфифизицина упакованы значительно плотнее, чем в структуре эндофилина, и таким образом, что один конец BAR-домена направлен в мембрану, а другой от нее. В отличие от эндофилина, они стабильно соединены друг с другом АС, которые, как предполагается, участвуют в инициации изгиба. Как следствие, трубочки, формируемые амфифизицином, намного более жесткие. Это согласуется с биологическими функциями белков: амфифизицин формирует стабильные Т-трубочки, а эндофилин динамичные структуры, быстро образующиеся и разбирающиеся в процессе эндоцитоза [76].

С помощью рентгеновской кристаллографии удалось не только получить структуры отдельных F-BAR-доменов, но и предложить схему их взаимодействия с мембранами. В кристаллах F-BAR-

домены формируют плоские скаффолды, в которых BAR-домены расположены в боковой ориентации. Между собой BAR-домены взаимодействуют концевыми и латеральными участками. При взаимодействии с мембраной BAR-домены поворачиваются так, что изогнутая сторона, несущая положительно заряженные аминокислотные остатки, оказывается повернутой к мембране, плоский скаффолд преобразуется в кольцевой, а затем в спиральный, закручивающийся вокруг формирующейся трубки [16] (рис. 3В). Это предположение подтверждено данными криоэлектронной микроскопии [73] и молекулярного моделирования [77].

Изолированные I-BAR-домены могут активно формировать мембранный изгиб [33], но поскольку у полноразмерных I-BAR-белков эта способность менее выражена [41] ввиду аутоингибирования, они могут связываться с уже изогнутой мембраной. Функции восприятия и генерации изгиба мембраны не являются взаимоисключающими, поэтому можно предположить, что поведение белка зависит от его концентрации: при низкой концентрации они распознают существующий изгиб мембраны и привлекают к ней другие белки, а при высоких могут собираться в олигомеры (рис. 3Г) и активно участвовать в распространении изгиба [78]. С другой стороны, I-BAR-домены белка Pinkbar формируют не изгибы, а уплотненные мембранные участки. В соответствии с этим их олигомеры имеют плоскую форму, хотя в них присутствуют характерные для BAR-доменов концевые взаимодействия (рис. 3Д).

СТАБИЛИЗАЦИЯ ИЗГИБА МЕМБРАНЫ

Важность N-концевых АС для стабилизации взаимодействия с липидами установлена с помощью различных методов [15, 79]. В опытах *in vitro* отсутствие АС приводило к неспособности эндофилина модифицировать липосомы и образовывать трубки. Это показано также методом молекулярной динамики [7]. В более позднем исследовании методом электронного парамагнитного резонанса было показано, что АС эндофилина проникают в липидный бислой на 8–11 Å ниже уровня фосфатных групп и не находятся в прямом контакте друг с другом [80]. Предполагали, что важность АС для олигомеризации белка может быть связана с совместной координацией липидов. Встраивание АС в верхний липидный монослой приводит к образованию положительного мембранного изгиба из-за возникающей асимметрии в структуре бислоя.

Структура эндофилинов, установленная с помощью криоэлектронной микроскопии, указывала на то, что вставки соседних (параллельно длинной оси трубки) димеров не взаимодействуют друг

с другом и направлены к мембране. Это отличало их от расположения в кристаллической структуре и в связанном с липосомами состоянии. Различие впоследствии объяснили двумя конформационными состояниями: при высоких концентрациях белка, достаточных для формирования олигомера, N-BAR-домен оказывается ближе к мембране, что способствует более глубокому встраиванию АС [80] и препятствует спонтанному мембранному изгибу и стабилизирует мембранную трубку. Переключение между конформациями эндофилина может быть связано с фосфорилированием Ser75: появление негативного заряда мешает встраиванию АС в мембрану и стабилизации трубочек. Известно, что мутации LRRK2-киназы, связанные с болезнью Паркинсона, приводят к повышению фосфорилирования Ser75 и нарушениям эндоцитоза в синапсах [81].

Помимо привлечения белков-партнеров, SH3-домен эндофилина регулирует активность N-BAR-домена. Методом молекулярной динамики показано, что в растворе SH3-домен связывается с N-концевой АС за счет гидрофобных взаимодействий и формирования солевых мостиков между заряженными остатками [8]. Отрицательный электростатический потенциал при этом концентрируется на SH3-домене, а положительный на АС, поэтому когда белок подходит к мембране, АС поворачивается к ней, а SH3-домен отворачивается от нее. С одной стороны, в такой автоингибированной форме SH3-домен не взаимодействует с другими белками в растворе, а с другой, белок «ищет» в мембране место, подходящее по электростатическому потенциалу и имеющее дефекты в упаковке липидов, куда может произойти встраивание АС.

В последние годы появляются свидетельства того, что активность по формированию мембранных трубок или инвагинаций мембраны характерна не для всех без исключения BAR-доменов. Дрожжевой белок Cdc15p, вовлеченный в цитокинез, олигомеризуется в филаменты и не вызывает модификацию мембраны [82]. Олигомеризация Cdc15p необходима для формирования контрактильного кольца, однако в этом случае белок не вызывает изменение формы мембраны, а лишь привлекает к ней другие белки. Отсутствие способности формировать трубки также показано для шести F-BAR-доменов млекопитающих. Возможно, общая функция F-BAR-доменных белков состоит в привлечении и пространственной организации около мембраны других белков, и лишь в некоторых случаях они непосредственно изменяют форму мембраны [83]. Один из таких белков – F-BAR-доменный белок Nervous wreck (Nwk), гомологи которого присутствуют у многих организмов, от насекомых до высших позвоночных.

Два гомолога этого белка вовлечены в мембранные перестройки в стереоцилиях и нейронах мозжечка млекопитающих [84, 85].

НЕТРАДИЦИОННАЯ ОРИЕНТАЦИЯ. F-BAR-ДОМЕННЫЙ БЕЛОК NERVOUS WRECK

Рост нейронов и образование новых связей – процессы, лежащие в основе обучения и памяти, – контролируются факторами роста. Рецепторы, связавшиеся с факторами роста, убираются внутрь клетки путем эндоцитоза и направляются в специфические клеточные компартменты, где могут подвергаться модификации, деградации или взаимодействовать с другими белками [86]. Определение механизмов, которые контролируют скорость и направление потока эндосом с рецепторами, имеет большое значение для понимания процессов передачи сигнала. Нервно-мышечный синапс *Drosophila melanogaster* служит удобной моделью для изучения регуляции синаптического роста, поскольку за 4 дня площадь мышцы увеличивается более чем в 100 раз, что сопровождается значительным увеличением количества контактов с нейронами. Регуляция процесса роста нейронов включает как ретроградные сигналы от мышцы, так и антероградные сигналы от нейрона к мышце [87]. Известно, что мутации белков-регуляторов эндоцитоза приводят к избыточному количеству ответвлений аксона, поскольку препятствуют затуханию сигнала от рецепторов фактора роста [88–90].

F-BAR-белок Nervous wreck (Nwk) имеет ограниченную гомологию с другими F-BAR-белками. Исследования *in vitro* показали, что, в отличие от других F-BAR-белков, Nwk вызывает образование клеточных выступов, а не инвагинаций (рис. 4А) [91].

Для изучения взаимодействия F-BAR-домена Nwk с мембраной была построена его модель по гомологии с известной кристаллической структурой гомологичного F-BAR-домена FCHO2, имеющая специфическую S-образную форму [92] (рис. 4Б). Мы использовали электронную микроскопию для изучения способов организации F-BAR-доменов белков Ctp4 и Nwk на липидах и обнаружили, что F-BAR-домены Ctp4, как и ожидалось, собирались в линейные филаменты, а F-BAR-домены Nwk образуют V-образные, N-образные и зигзагообразные структуры более высокого порядка [92]. Важно, что в отсутствие липидов такие структуры не наблюдались. На основании полученных результатов предложен механизм взаимодействия Nwk с мембранами. Зигзагообразные структуры формируют на мембране «гребешок», геометрия которого зависит от угла между димерами и частоты встречаемости димеров, обращенных вогнутой стороной к мембране. В клетках этот гребешок может образовывать кольцо,

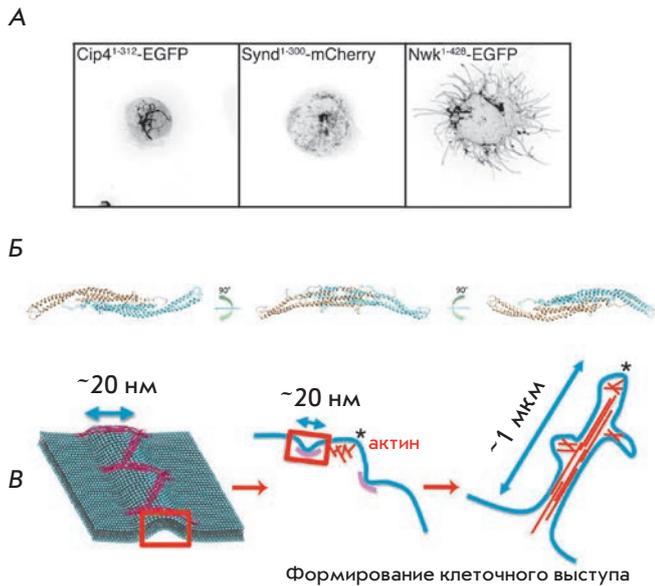


Рис. 4. Нетрадиционная активность F-BAR-домена Nwk [92]. А – формирование проникающих внутрь клетки трубочек при сверхэкспрессии типичных F-BAR-доменов и формирование клеточных выступов при сверхэкспрессии F-BAR-домена Nwk. Б – модель димеризованного F-BAR-домена Nwk (каждый мономер покрашен в свой цвет). В – схема формирования клеточных выступов при олигомеризации F-BAR-доменов Nwk и полимеризации актина

маркирующее участок мембраны, который далее преобразуется в клеточный выступ с помощью микротрубочек и актиновых филаментов (рис. 4B) [92].

Важную роль при этом играют концевые участки димера, ответственные за олигомеризацию, и электростатические взаимодействия между мембраной и вогнутой стороной F-BAR [92]. Формирование выступов также требует полимеризации актиновых филаментов, однако уже сформированные выступы не реагируют на обработку ингибитором полимеризации актина латрункулином В. Это указывает на то, что актин необходим только для их формирования [93]. Интересно, что возникшие выступы отличаются по структуре от филоподий, поскольку кроме актиновых филаментов содержат микротрубочки. Обработка нокадазолом, деполимеризатором микротрубочек, также не приводит к разрушению выступов.

Очевидно, что функционирование Nwk в нейронах обеспечивается не только его F-BAR-доменом, но и двумя SH3-доменами, каждый из которых связывается с определенными белками. В рециркулирующих эндосомах Nwk взаимодействует с белком из группы сортирующих нексинов SNX16, который,

в свою очередь, связан с пресинаптическим рецептором роста Tkv [94]. Взаимодействие Nwk с SNX16 приводит к понижению сигнала от Tkv и необходимо для возвращения рецептора на мембрану. Кроме того, Nwk связывает белки-регуляторы эндоцитоза Dap160, динамин и Wsp. Опыты с мутантными SH3a- и SH3b-доменами показали, что SH3a связывает динамин и Wsp, а SH3b отвечает за связывание с Dap160 [95]. Wsp активирует Arp2/3-комплекс, который запускает полимеризацию актина, необходимую для осуществления эндоцитоза [96]. Однако Nwk активирует Wsp значительно слабее, чем SH3-доменные белки млекопитающих, например, Nck активируют WASP [97]. Усиление эффекта достигается за счет совместного действия Nwk с другим активатором Wsp, GTP-азой Cdc42. Таким образом, посредством SH3-доменов Nwk взаимодействует с эндоцитарным аппаратом и вместе с Cdc42 активирует Wsp/Arp2-3-зависимую полимеризацию актина для регуляции синаптического роста.

Другая важная функция SH3-доменов Nwk – регуляция активности F-BAR. Показано, что SH3b-домен связывается с F-BAR, однако это не приводит к потере способности последнего связываться с мембраной, а лишь повышает количество отрицательно заряженных липидов, необходимое для связывания [10]. При этом как сам F-BAR-домен, так и полноразмерный белок модифицировали гигантские липосомы, однако слишком большой негативный заряд препятствовал деформации мембраны [10]. Одним из возможных объяснений может служить то, что при меньшей концентрации $\Phi\text{I}(4,5)\Phi_2$ большая часть F-BAR-доменов оказывается связанной с мембраной вогнутой стороной, что способствует деформации. С другой стороны, не исключено, что причиной является изменение свойств самой мембраны. Увеличение концентрации $\Phi\text{I}(4,5)\Phi_2$ в мембране приводит к возрастанию упорядоченности липидов, которое характеризуется выпрямлением углеводородных хвостов, возрастанием толщины бислоя, понижением коэффициента латеральной диффузии и т.д. [98, 99]. Образование таких липидных микродоменов может препятствовать деформации мембраны или динамичному перемещению белков, необходимому для формирования олигомеров [100]. Состав мембраны сходным образом способен регулировать и другие BAR-доменные белки: повышенное содержание $\Phi\text{I}(4,5)\Phi_2$ подавляет деформирующую мембрану активность F-BAR-домена FBP17 в опытах *in vivo* [101]. Ранее считалось, что связывание SH3-доменов с F-BAR приводит к полному автоингибированию, которое снимается либо связыванием с другими белками [102], либо повышением негативного заряда в мембране [103]. Пример Nwk, однако, ука-

зывает на более сложный механизм, который требует дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение кристаллических структур VAR-доменов позволило описать механизмы изменения формы мембран на молекулярном уровне, а с помощью исследований *in vitro* и метода электронной микроскопии удалось объяснить, каким образом схемы олигомеризации VAR-доменов приводят к формированию различных мембранных структур. Показано как активность некоторых белков семейства VAR может регулироваться внутри- и межбелковыми взаимодействиями, а также за счет чего может достигать-

ся специфичность привлечения белков-партнеров. Однако, несмотря на значительное продвижение в понимании роли VAR-доменных белков в жизнедеятельности клетки, многие проблемы остаются нерешенными. Учитывая, что изменения уровня экспрессии и мутации в генах, кодирующих VAR-доменные белки, связаны со множеством серьезных заболеваний, исследования в этой области представляют собой интерес не только для биологии, но и для медицины. ●

*Работа поддержана грантом РФФ
(№ 14-14-00234).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sakamuro D., Elliott K.J., Wechsler-Reya R., Prendergast G.C. // *Nat. Genet.* 1996. V. 14. № 1. P. 69–77.
- Qualmann B., Koch D., Kessels M.M. // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 3501–3515.
- Padrick S.B., Cheng H.C., Ismail A.M., Panchal S.C., Doolittle L.K., Kim S., Skehan B.M., Umetani J., Brautigam C.A., Leong J.M., et al. // *Mol. Cell.* 2008. V. 32. № 3. P. 426–438.
- Itoh T., De Camilli P. // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids.* 2006. V. 1761. № 8. P. 897–912.
- Ferguson S.M., Brasnjo G., Hayashi M., Wölfel M., Collesi C., Giovedi S., Raimondi A., Gong L., Ariel P., Paradise S., et al. // *Science.* 2007. V. 316. № 5824. P. 570–574.
- Solomaha E., Szeto F.L., Yousef M.A., Palfrey H.C. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 24. P. 23147–23156.
- Mim C., Cui H., Gawronski-Salerno J.A., Frost A., Lyman E., Voth G.A., Unger V.M. // *Cell.* 2012. V. 149. № 1. P. 137–145.
- Vázquez F.X., Unger V.M., Voth G.A. // *Biophys. J.* 2013. V. 104. № 2. P. 396–403.
- Rao Y., Ma Q., Vahedi-Faridi A., Sundborger A., Pechstein A., Puchkov D., Luo L., Shupliakov O., Saenger W., Haucke V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 18. P. 8213–8218.
- Kelley C.F., Messelaar E.M., Eskin T.L., Sokolova O.S., Nicastro D., Rodal A.A., Kelley C.F., Messelaar E.M., Eskin T.L., Wang S., et al. // *Cell Reports.* 2015. V. 13. № 11. P. 1–13.
- Rocca D.L., Martin S., Jenkins E.L., Hanley J.G. // *Nat. Cell Biol.* 2008. V. 10. № 3. P. 259–271.
- Cao M., Xu J., Shen C., Kam C., Haganir R.L., Xia J. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 47. P. 12945–12956.
- The UniProt Consortium. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. Database issue. P. D43–D47.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 235–242.
- Peter B.J., Kent H.M., Mills I.G., Vallis Y., Butler P.J.G., Evans P.R., McMahon H.T. // *Science.* 2004. V. 303. № 5657. P. 495–499.
- Shimada A., Niwa H., Tsujita K., Suetsugu S., Nitta K., Hanawa-Suetsugu K., Akasaka R., Nishino Y., Toyama M., Chen L., et al. // *Cell.* 2007. V. 129. № 4. P. 761–772.
- Frost A., Unger V.M., De Camilli P. // *Cell.* 2009. V. 137. № 2. P. 191–196.
- Kessels M.M., Qualmann B. // *J. Cell Sci.* 2015. P. 1–9.
- David C., McPherson P.S., Mundigl O., de Camilli P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 1. P. 331–335.
- Lee E., Marcucci M., Daniell L., Pypaert M., Weisz O.A., Ochoa G.-C., Farsad K., Wenk M.R., De Camilli P. // *Science.* 2002. V. 297. № 5584. P. 1193–1196.
- Razaq A., Robinson I.M., McMahon H.T., Skepper J.N., Su Y., Zehof A.C., Jackson A.P., Gay N.J., Kane C.J.O. // *Genes Dev.* 2001. V. 15. P. 2967–2979.
- Nicot A.S., Toussaint A., Tosch V., Kretz C., Wallgren-Petersson C., Iwarsson E., Kingston H., Garnier J.M., Biancalana V., Oldfors A., Mandel J.L., Laporte J. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39(9). P. 1134–1139.
- Tarricone C., Xiao B., Justin N., Walker P.A., Rittinger K., Gambin S.J., Smerdon S.J. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6834. P. 215–219.
- Weissenhorn W. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 351. № 3. P. 653–661.
- Ringstad N., Gad H., Löw P., Di Paolo G., Brodin L., Shupliakov O., De Camilli P. // *Neuron.* 1999. V. 24. № 1. P. 143–154.
- Guichet A., Wucherpennig T., Dudu V., Etter S., Wilsch-Bräuniger M., Hellwig A., González-Gaitán M., Huttner W.B., Schmidt A.A. // *EMBO J.* 2002. V. 21. № 7. P. 1661–1672.
- Gallop J.L., Jao C.C., Kent H.M., Butler P.J.G., Evans P.R., Langen R., McMahon H.T. // *EMBO J.* 2006. V. 25. № 12. P. 2898–2910.
- Yamagishi A., Masuda M., Ohki T., Onishi H., Mochizuki N. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 15. P. 14929–14936.
- Mattila P.K., Pykäläinen A., Saarikangas J., Paavilainen V.O., Vihinen H., Jokitalo E., Lappalainen P. // *J. Cell Biol.* 2007. V. 176. № 7. P. 953–964.
- Suetsugu S., Murayama K., Sakamoto A., Hanawa-Suetsugu K., Seto A., Oikawa T., Mishima C., Shirouzu M., Takenawa T., Yokoyama S. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 46. P. 35347–35358.
- Millard T.H., Bompard G., Heung M.Y., Dafforn T.R., Scott D.J., Machesky L.M., Fütterer K. // *EMBO J.* 2005. V. 24. № 2. P. 240–250.
- Lee S.H., Kerff F., Chereau D., Ferron F., Klug A., Dominguez R. // *Structure.* 2007. V. 15. № 2. P. 145–155.
- Saarikangas J., Zhao H., Pykäläinen A., Laurinmäki P., Mattila P.K., Kinnunen P.K.J., Butcher S.J., Lappalainen P. // *Curr. Biol.* 2009. V. 19. № 2. P. 95–107.
- Kim M.-H., Choi J., Yang J., Chung W., Kim J.-H., Paik S.K., Kim K., Han S., Won H., Bae Y.-S., et al. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 5. P. 1586–1595.
- Krugmann S., Jordens I., Gevaert K., Driessens M.,

- Vandekerckhove J., Hall A. // *Curr. Biol.* 2001. V. 11. № 21. P. 1645–1655.
36. Scita G., Confalonieri S., Lappalainen P., Suetsugu S. // *Trends Cell Biol.* 2008. V. 18. P. 52–60.
37. Robens J.M., Yeow-Fong L., Ng E., Hall C., Manser E. // *Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 30. № 3. P. 829–844.
38. Millard T.H., Dawson J., Machesky L.M. // *J. Cell Sci.* 2007. V. 120. № 9. P. 1663–1672.
39. Lee Y.-G., Macoska J.A., Korenchuk S., Pienta K.J. // *Neoplasia.* 2002. V. 4. № 4. P. 291–294.
40. Machesky L.M., Johnston S.A. // *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2007. V. 85. № 6. P. 569–576.
41. Woodings J.A., Sharp S.J., Machesky L.M. // *Biochem. J.* 2003. V. 371. Pt 2. P. 463–471.
42. Wang Y., Zhou K., Zeng X., Lin J., Zhan X. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 10. P. 7624–7631.
43. Bershteyn M., Atwood S.X., Woo W.M., Li M., Oro A.E. // *Dev. Cell.* 2010. V. 19. № 2. P. 270–283.
44. Saarikangas J., Hakonen J., Mattila P.K., Grumet M., Salminen M., Lappalainen P. // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. P. 1444–1454.
45. Pykäläinen A., Boczkowska M., Zhao H., Saarikangas J., Rebowski G., Jansen M., Hakonen J., Koskela E.V., Peränen J., Vihinen H., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2011. V. 18. № 8. P. 902–907.
46. Heath R.J.W., Insall R.H. // *J. Cell Sci.* 2008. V. 121. № 12. P. 1951–1954.
47. Dent E.W., Kwiatkowski A.V., Mebane L.M., Philippar U., Barzik M., Rubinson D.A., Gupton S., van Veen J.E., Furman C., Zhang J., et al. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. № 12. P. 1347–1359.
48. Tanaka E., Sabry J. // *Cell.* 1995. V. 83. № 2. P. 171–176.
49. Machesky L.M. // *FEBS Lett.* 2008. V. 582. № 14. P. 2102–2111.
50. Liu S., Xiong X., Zhao X., Yang X., Wang H. // *J. Hematol. Oncol.* 2015. V. 8. № 1. P. 1–14.
51. Aspenström P. // *Curr. Biol.* 1997. V. 7. № 7. P. 479–487.
52. Tsujita K., Suetsugu S., Sasaki N., Furutani M., Oikawa T., Takenawa T. // *J. Cell Biol.* 2006. V. 172. № 2. P. 269–279.
53. Wang Q., Navarro M.V.A.S., Peng G., Molinelli E., Goh S.L., Judson B.L., Rajashankar K.R., Sondermann H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 31. P. 12700–12705.
54. Zhao H., Michelot A., Koskela E.V., Tkach V., Stamou D., Drubin D.G., Lappalainen P. // *Cell Rep.* 2013. V. 4. № 6. P. 1213–1223.
55. Roumanie O., Peypouquet M.F., Bonneau M., Thoraval D., Doignon F., Crouzet M. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 36. № 6. P. 1403–1414.
56. Moravec K., Alvarado D., Schmitz K.R., Kenniston J.A., Mendrola J.M., Ferguson K.M., Lemmon M. // *Structure.* 2015. V. 23. № 2. P. 352–363.
57. Henne W.M., Kent H.M., Ford M.G., Hegde B.G., Daumke O., Butler P.J., Mittal R., Langen R., Evans P.R., McMahon H.T. // *Structure.* 2007. V. 15. № 7. P. 839–852.
58. Aresta S., de Tand-Heim M.-F., Beranger F., de Gunzburg J. // *Biochem. J.* 2002. V. 367. № 1. P. 57–65.
59. Andrieu G., Quaranta M., Leprince C., Cuvillier O., Hatzoglou A. // *Carcinogenesis.* 2014. V. 35. № 11. P. 2503–2511.
60. Ota H., Hikita T., Sawada M., Nishioka T., Matsumoto M., Komura M., Ohno A., Kamiya Y., Miyamoto T., Asai N., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 5. P. 4532.
61. Tanaka-Takiguchi Y., Itoh T., Tsujita K., Yamada S., Yanagisawa M., Fujiwara K., Yamamoto A., Ichikawa M., Takiguchi K. // *Langmuir.* 2013. V. 29. № 1. P. 328–336.
62. Isas J.M., Ambroso M.R., Hegde P.B., Langen J., Langen R. // *Structure.* 2015. V. 23. № 5. P. 873–881.
63. McMahon H.T., Boucrot E. // *J. Cell Sci.* 2015. V. 128. № 6. P. 1065–1070.
64. Boucrot E., Pick A., Çamdere G., Liska N., Evergren E., McMahon H.T., Kozlov M.M. // *Cell.* 2012. V. 149. № 1. P. 124–136.
65. Ramesh P., Baroji Y.F., Reihani S.N.S., Stamou D., Oddershede L.B., Bendix P.M. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1565.
66. Prévost C., Zhao H., Manzi J., Lemichez E., Lappalainen P., Callan-Jones A., Bassereau P. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8529.
67. Simunovic M., Voth G.A. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7219.
68. Shi Z., Baumgart T. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 5974.
69. Sorre B., Callan-Jones A., Manzi J., Goud B., Prost J., Bassereau P., Roux A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 1. P. 173–178.
70. Zhu C., Das S.L., Baumgart T. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. № 8. P. 1837–1845.
71. Wu T., Shi Z., Baumgart T. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. P. e93060.
72. Adam J., Basnet N., Mizuno N. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 15452.
73. Frost A., Perera R., Roux A., Spasov K., Destaing O., Egelman E.H., De Camilli P., Unger V.M. // *Cell.* 2008. V. 132. № 5. P. 807–817.
74. Ringstad N., Nemoto Y., De Camilli P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 16. P. 8569–8574.
75. Faelber K., Posor Y., Gao S., Held M., Roske Y., Schulze D., Haucke V., Noé F., Daumke O. // *Nature.* 2011. V. 477. № 7366. P. 556–560.
76. Mizuno N., Jao C.C., Langen R., Steven A.C. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 30. P. 23351–23358.
77. Левцова О.В., Давлетов И.Д., Соколова О.С., Шайтан К.В. // *Биофизика.* 2011. Т. 56. № 2. P. 242–247.
78. Zhao H., Pykäläinen A., Lappalainen P. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011. V. 23. № 1. P. 14–21.
79. Cui H., Mim C., Vázquez F.X., Lyman E., Unger V.M., Voth G.A. // *Biophys. J.* 2013. V. 104. № 2. P. 404–411.
80. Ambroso M.R., Hegde B.G., Langen R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 19. P. 6982–6987.
81. 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., et al. // *Neuron.* 2012. V. 75. № 6. P. 1008–1021.
82. McDonald N.A., Vander Kooi C.W., Ohi M.D., Gould K.L. // *Dev. Cell.* 2015. V. 35. № 6. P. 725–736.
83. Traub L.M. // *Dev. Cell.* 2015. V. 35. № 6. P. 664–666.
84. Cao H., Yin X., Cao Y., Jin Y., Wang S., Kong Y., Chen Y., Gao J., Heller S., Xu Z. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 2. P. 1–11.
85. Sun X., Pinacho R., Saia G., Punko D., Meana J.J., Ramos B., Gill G. // *Dev. Neurobiol.* 2015. V. 75. № 1. P. 93–108.
86. Sadowski L., Pilecka I., Miaczynska M. // *Exp. Cell Res.* 2009. V. 315. № 9. P. 1601–1609.
87. Collins C.A., DiAntonio A. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007. V. 17. № 1. P. 35–42.
88. Dickman D.K., Lu Z., Meinertzhagen I.A., Schwarz T.L. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. № 6. P. 591–598.
89. Khodosh R., Augsburg A., Schwarz T.L., Garrity P.A. // *Development.* 2006. V. 133. № 23. P. 4655–4665.
90. Wang X., Shaw W.R., Tsang H.T.H., Reid E., O’Kane C.J. // *Nat. Neurosci.* 2007. V. 10. № 2. P. 177–185.
91. Cherbas L., Willingham A., Zhang D., Yang L., Zou Y., Eads B.D., Carlson J.W., Landolin J.M., Kapranou P., Dumais J., et al. // *Genome Res.* 2011. V. 21. № 2. P. 301–314.
92. Becalska A.N., Kelley C.F., Berciu C., Stanishneva-Kononova T.B., Fu X., Wang S., Sokolova O.S., Nicastro D., Rodal A.A. // *Mol. Biol. Cell.* 2013. V. 24. № 15. P. 2406–2418.

93. Kelley C.F., Becalska A.N., Berciu C., Nicastro D., Rodal A.A. // *Commun. Integr. Biol.* 2015. V. 8. № 2. P. e1000703.
94. Rodal A.A., Blunk A.D., Akbergenova Y., Jorquera R.A., Buhl L.K., Littleton J.T. // *J. Cell Biol.* 2011. V. 193. № 1. P. 201–217.
95. Rodal A.A., Motola-Barnes R.N., Littleton J.T. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 33. P. 8316–8325.
96. Kaksonen M., Toret C.P., Drubin D.G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 6. P. 404–414.
97. Tomasevic N., Jia Z., Russell A., Fujii T., Hartman J.J., Clancy S., Wang M., Beraud C., Wood K.W., Sakowicz R. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 11. P. 3494–3502.
98. Stanishneva-Konovalova T.B., Sokolova O.S. // *Comput. Theor. Chem.* 2015. V. 1058. P. 61–66.
99. Lupyan D., Mezei M., Logothetis D.E., Osman R. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. № 2. P. 240–247.
100. Ruiz-Herrero T., Hagan M.F. // *Biophys. J.* 2015. V. 108. № 3. P. 585–595.
101. Tsujita K., Takenawa T., Itoh T. // *Nat. Cell Biol.* 2015. V. 17. № 6. P. 749–758.
102. Roberts-Galbraith R.H., Gould K.L. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 20. P. 4091–4097.
103. Wu T., Baumgart T. // *Biochemistry.* 2014. V. 53. № 46. P. 7297–7309.

УДК 577.3

Дизайн стабильных α -спиральных пептидов и термостабильных белков в биотехнологии и биомедицине

А. П. Якимов^{1,2*}, А. С. Афанасьева^{1,2}, М. А. Ходорковский¹, М. Г. Петухов^{1,2}¹Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29²Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, Орлова роща, 1

*E-mail: yaleks@nanobio.spbstu.ru

Поступила в редакцию 19.06.2016

Принята к печати 28.09.2016

РЕФЕРАТ Наиболее часто встречающимся элементом вторичной структуры во многих глобулярных водорастворимых белках и пептидах являются α -спирали. Повышенная конформационная стабильность α -спиралей – одна из главных причин высокой термостабильности белков термофильных бактерий. Кроме того, α -спирали часто участвуют во взаимодействиях белков не только с другими белками, но и с нуклеиновыми кислотами, а также с липидами клеточных мембран. Именно поэтому конструирование высокостабильных α -спиральных пептидов, используемых в качестве высокоактивных и высокоспецифичных ингибиторов межбелковых и других взаимодействий, в последнее время находит все больше практических применений в медицине. Для улучшения конформационной стабильности α -спиральных пептидов и термостабильных белков в последнее время разработано несколько подходов, которые мы обсудим в этом обзоре. Кроме того, будут рассмотрены методы улучшения прохождения пептидов и белков через клеточные мембраны и устойчивости к действию внутриклеточных протеаз. Особое внимание уделено методу SEQOPT (<http://mml.spbstu.ru/services/seqopt/>), который используется для конструирования конформационно стабильных коротких α -спиралей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА α -спираль, конформационная стабильность, проницаемость мембран, сопротивляемость внутриклеточному протеолизу, факторы термостабильности.

СОКРАЩЕНИЯ SEQOPT – метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей; МД – метод молекулярной динамики; НС (alpha-helix content) – содержание (%) α -спиральной конформации в белке; PDB – база данных пространственных структур белков; AGADIR, ALB, HELIX – статистико-механические модели, описывающие конформационные переходы α -спираль-клубок в коротких мономерных пептидах; КД – спектроскопия кругового дихроизма.

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования α -спиральных пептидов, проведенные за последние четверть века, не только способствовали лучшему пониманию сворачивания белка в нативную, биологически активную конформацию, но и представляют значительный интерес для разработки лекарственных препаратов, эффективных при заболеваниях, связанных с нарушениями межбелковых взаимодействий [1–3]. С начала 1990-х годов собран большой объем экспериментальных данных по сворачиванию и стабильности α -спиралей в мономерных пептидах [4, 5]. Эти данные показывают, что аминокислотные последовательности α -спиралей, как правило, не оптимизированы для обеспечения высокой конформационной

стабильности. Это может быть важным фактором в предотвращении накопления ошибочных интермедиатов сворачивания глобулярных белков. Поэтому конструирование коротких α -спиральных пептидов и белков с достаточной конформационной стабильностью при заданных условиях среды (температуры, рН и ионной силы) по-прежнему остается интересной и практически важной проблемой белковой инженерии [1, 6].

Огромный объем экспериментальных данных по физическим взаимодействиям, которые влияют на стабильность α -спиралей в белках и мономерных пептидах, позволяет создать теоретические модели, описывающие переходы α -спираль-клубок, и разработать на этой основе новые высокоэффек-

тивные вычислительные методы конструирования α -спиральных пептидов с высокой конформационной стабильностью.

Стабилизацию α -спиралей неоднократно использовали для конструирования промышленно важных ферментов, способных работать при повышенных температурах [7, 8]. В представленной работе обсуждаются также различные способы повышения термостабильности глобулярных белков, включая такие молекулярные механизмы, как изменения аминокислотного состава белков термофильных организмов, введение дополнительных ионных пар и водородных связей, использование аминокислот с повышенной склонностью к α -спиральной конформации, образование дополнительных дисульфидных мостиков, усиление гидрофобных взаимодействий, замены на остатки пролина в петлях, связывание с ионами металлов, более плотная упаковка и др.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ

Термостабильные ферменты используются во многих современных биотехнологических процессах как в лабораторных условиях, так и в широкомасштабном промышленном производстве [9, 10].

Природным источником термофильных белков служат гипертермофильные микроорганизмы, оптимально растущие при температурах от 80 до 110°C. Эти организмы, первоначально найденные в горячих геотермальных источниках, относятся в основном к архебактериям. Ферменты из этих организмов также имеют оптимум активности при высоких температурах (>70°C), а некоторые из них активны при температурах значительно выше 100°C. При этом термостабильные ферменты обычно неактивны при температурах ниже 40°C [11].

Способность надежно предсказывать такие основные физико-химические свойства мутантных белков, как стабильность и растворимость в воде, имеет большое значение в молекулярной биологии и биотехнологии. Ранее во многих работах изучали факторы, влияющие на стабильность и растворимость белков, а также разрабатывали модели для предсказания последствий точечных мутаций в белках [11–14]. В настоящее время ясно, что существует много факторов, которые могут повредить стабильности белковой структуры или ее активности.

Особенности структурной организации термостабильных белков и ферментов, позволяющие им функционировать при температуре 100°C и выше, активно изучали как в экспериментальных, так и в теоретических работах с середины 80-х годов (всего, согласно базе данных Medline, опубликовано около 3000 работ) [12, 15–18].

В основе дискуссии лежит сравнительный анализ гомологичных белков из мезофильных и термофильных микроорганизмов (далее мезофильных и термофильных белков соответственно). Описанные к настоящему времени пространственные структуры термостабильных белков не выявили в организации вторичной или третичной структуры какой-либо особенности, специфичной только для термофилов, по сравнению с их мезофильными аналогами. Различия же, выявляемые на уровне аминокислотных последовательностей, весьма разнородны. Такое разнообразие характеристик терморезистентных белков может быть вызвано тем, что термофильность обусловлена суммированием действия различных факторов, возникающих благодаря подходящей комбинации слабых взаимодействий, вовлеченных в стабилизацию белка.

Недавно показали, что механизмы адаптации к высоким температурам у разных организмов могут зависеть от их эволюционной истории [19]. Вместе с тем замечено, что аминокислотные замены, предположительно сопряженные с терморезистентностью белка, часто локализуются в α -спиралах [20–22]. Следовательно, анализ энергетического баланса молекулярных взаимодействий внутри α -спиралей может прояснить причины стабильности термофильных белков при высоких температурах.

Изменения в аминокислотном составе белков термофильных организмов

Изменения в аминокислотном составе белков термофильных организмов по сравнению с их мезофильными аналогами были одним из первых исследованных факторов, влияющих на термостабильность [23, 24]. Этот статистический анализ показал, что в термофильных белках остатки глицина, серина, лизина и аспарагиновой кислоты часто заменены на аланин, треонин, аргинин и глутаминовую кислоту соответственно [25]. Функция этих замен в основном состоит в повышении внутренней и понижении внешней гидрофобности термостабильных белков. Кроме того, эти замены несколько усиливают стабильность α -спиралей и плотность упаковки аминокислот в термостабильных белках. В последнее время предприняты многие дополнительные исследования различных физических факторов, которые могут приводить к изменению аминокислотного состава термофильных белков (см. обзор на эту тему [18]).

В серии работ [26–28] нами показано, что α -спиралы термостабильных белков в целом более конформационно стабильны, чем такие же α -спиралы из высокоомологичных белков мезофильных и психрофильных бактерий. При этом состав α -спиралей термостабильных белков меняется за счет увели-

чения содержания аминокислот с высокой склонностью к образованию α -спиралей (аланин, лейцин) и соответственно уменьшения содержания β -разветвленных остатков (валин, изолейцин и треонин). Кроме того, обнаружено значительное увеличение представленности аминокислот, которые могут стабилизировать α -спирали за счет сильных взаимодействий их боковых цепей с боковыми цепями других аминокислот (например, глутаминовой кислоты и аргинина). Сходные результаты получены и в работе других исследователей, которые также обнаружили значительное уменьшение содержания β -разветвленных остатков с низкой склонностью к образованию α -спиралей в термофильных белках [29].

В работе Matthews и соавт. [30] показано, что введение остатков пролина повышает термостабильность белка за счет уменьшения энтропии развернутого состояния.

Дополнительные гидрофобные взаимодействия являются важным механизмом стабилизации структуры в термостабильных белках. Показано, что в среднем каждая дополнительная метильная группа, погруженная в структуру белка, добавляет примерно 1.3 (± 0.5) ккал/моль в стабильность свернутой конформации белка [31].

Ионные пары и связывание с ионами металлов

Сравнение пространственных структур термофильных белков и их аналогов из мезофильных организмов показало, что первые часто имеют существенно большее количество ионных пар, которые значительно стабилизируют их структуру при высоких температурах [32]. Один из наиболее ярких примеров такого рода – увеличение содержания ионных пар, наблюдаемое в гипертермофильной люмазинсинтазе из *Aquifexae olicus* по сравнению с ее мезофильным аналогом из *Bacillus subtilis* более чем на 90% [33].

Уже давно известно, что ионы металлов часто стабилизируют и активируют некоторые ферменты. Например, изомераза ксилозы из *Streptomyces rubiginosus* связывает два иона из набора Co^{2+} , Mg^{2+} или Mn^{2+} , один из которых непосредственно вовлечен в катализ, а второй преимущественно в стабилизацию структуры фермента [34]. Показано, что некоторые термостабильные ферредоксины содержат атомы металлов, которых нет в их мезофильных гомологах [35].

Увеличение количества нековалентных взаимодействий

Предполагается, что увеличение нелокальных нековалентных взаимодействий (например, ионных пар, водородных связей и Ван-дер-Ваальсовых контак-

тов), связывающих несмежные части белка, может значительно улучшать термостабильность белка. Данные, накопленные в последнее время, в целом подтверждают эту гипотезу. Например, на основе гомологичных белков рубредоксинов из *Pyrococcus furiosus* и *Clostridium pasteurianum* построены химеры [36]. Относительные стабильности этих химер по сравнению с рубредоксинами *P. furiosus* и *C. pasteurianum* указывают на существенные для термостабильности белка взаимодействия между ядром белка и одним из β -листов за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Причем отдельно ни ядро, ни β -лист не обеспечивают необходимую стабилизацию. Сравнение одинаковых белков из термофильных и мезофильных организмов (373 пары белков http://phys.protres.ru/resources/termo_meso_base.html) показало, что первые имеют более плотно упакованную опущку глобулы, а плотность упаковки внутренней части белка и его ядра сворачивания примерно одинакова в обоих случаях [37].

Водородные связи

Другой такой фактор – образование дополнительных водородных связей, стабилизирующих структуру многих термостабильных белков при высоких температурах [38–40]. В частности, изучение механизма влияния водородных связей на термостабильность РНКазы T1 показало, что каждая дополнительная водородная связь в среднем добавляет 1.3 ккал/моль в стабильность этого белка [38].

В другой работе [39] обнаружили сильную корреляцию между термостабильностью белка GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и количеством водородных связей между полярными незаряженными группами в нем. Предположили, что существуют две основные причины, объясняющие, как наличие дополнительных водородных связей может влиять на термостабильность белка: 1) энергия дегидратации таких групп намного меньше, чем энергия дегидратации заряженных групп ионных пар; 2) выигрыш в энтальпии для таких водородных связей значительно выше из-за электростатических заряд-дипольных взаимодействий.

Образование дисульфидных мостиков

Образование дополнительных дисульфидных мостиков – еще один важный фактор, стабилизирующий структуру белка при высоких температурах [41, 42]. Как полагают, этот эффект главным образом связан с уменьшением конфигурационной энтропии развернутого состояния белка.

В некоторых случаях эффект введения в структуру белка множественных дисульфидных мостиков имел аддитивный характер [43]. В частности, в моле-

куле лизоцима фага T4 (фермент без дисульфидов) были спроектированы мутанты с дисульфидными мостами между остатками 3–97, 9–164 и 21–142, которые оказались значительно более термостабильными, чем белок дикого типа.

Однако в других случаях такая аддитивность отсутствовала [42, 44, 45]. Более того, в некоторых случаях образование дисульфидных мостиков вообще не влияет на термостабильность белка [45] или даже понижает ее [42], что указывает на наличие в структуре белка участков с различной термочувствительностью. Интересно, что, по крайней мере в некоторых случаях, величина эффекта термостабилизации белка с помощью искусственных дисульфидных мостиков примерно пропорциональна логарифму количества аминокислотных остатков, разделяющих два остатка цистеина, образующих дисульфидный мостик [16, 43].

В последнее время этот подход к конструированию термостабильных белков приобрел дополнительную популярность в связи с появлением новых теоретических подходов, позволяющих на основе известной пространственной структуры белка рассчитывать не только все возможные комбинации искусственных дисульфидных мостиков, но и примерно оценивать их энергию и вероятность самопроизвольного образования [46].

Направленная эволюция

Основным экспериментальным методом улучшения свойств ферментов является метод направленной эволюции [47]. Главное преимущество этого подхода состоит в том, что он не требует знания никаких деталей структуры изменяемого фермента. Метод основан на контролируемом экспериментатором процессе искусственной ускоренной эволюции микроорганизмов, поставленных в жесткие условия окружающей среды. В отличие от естественной эволюции, это более интенсивный и избирательный процесс, он имеет определенную специфическую цель, ограничен во времени и имитирует такие протекающие в природе процессы, как случайный мутагенез, рекомбинации и отбор.

Работы по направленной эволюции промышленно важных белков с помощью химического и радиационного мутагенеза начали проводить с начала 80-х годов, а в 90-х они получили широкое развитие в связи с наступлением эры промышленной молекулярной биотехнологии. Бурное развитие этой отрасли диктуется необходимостью получения новых все более эффективных и безопасных для здоровья человека биокатализаторов природного происхождения. В 1994 г. появился новый подход – метод перетасовки ДНК [48], который доказал свою эффективность, и на его

основе было создано множество различных разновидностей основного варианта. Например, с помощью этого подхода получен термостабильный субтилизин E, в 15 раз более активный, чем белок дикого типа из *B. subtilis* при 37°C [49]. Изучение его структуры показало, что большинство мутаций, приводящих к повышению термостабильности белка, находятся в петлях, соединяющих элементы вторичной структуры [50]. В другом эксперименте термостабильность и активность *n*-нитробензолэстеразы из *B. subtilis* были увеличены с помощью пяти циклов неточного ПЦР, сопровождаемых одним шагом перетасовки ДНК [51]. Термостабильность мутантного белка увеличилась на 10°C, а активность была выше, чем у фермента дикого типа при любой температуре.

ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОГО КОНСТРУИРОВАНИЯ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ БЕЛКОВ

Для предсказания конформационной стабильности белков и конструирования термостабильных мутантов были предложены многие теоретические модели и компьютерные алгоритмы, основанные на физических и химических принципах [52–54]. Полученные результаты достаточно убедительно показывают, что эти подходы могут стать надежным инструментом белковой инженерии в ближайшем будущем.

Метод молекулярной динамики (МД) – один из основных, хорошо зарекомендовавших себя вычислительных подходов к моделированию конформационной подвижности белков, сворачивания их в нативную конформацию и рационального дизайна мутантов с измененными свойствами [55]. Для того чтобы устранить необходимость моделировать слишком длинные молекулярно-динамические траектории, создана теоретическая модель и соответствующее программное обеспечение, позволяющее предсказывать подвижные и более стабильные области в белках с известной пространственной структурой без моделирования детальной молекулярной динамики этого белка [56].

Многочисленные траектории МД того же самого белка при идентичных условиях позволяют определить структуру и последовательность его промежуточных состояний при термическом разворачивании [57]. Эти наблюдения могут обеспечить подсказки о том, как ферменты начинают разворачиваться и какие их области наиболее подходят для стабилизации [58].

Кроме МД применяются и другие подходы, основанные на современных методах перебора и оптимизации энергии конформеров боковых цепей аминокислотных остатков исследуемых белков [59]. Например, используя компьютерный алгоритм глобальной оптимизации, основанный на ДЭЕ-теореме, накладывающей условия для выявления ротаме-

ров, которые не могут быть членами конформации, обладающей глобальным минимумом энергии [60]. При помощи данного подхода был сконструирован термостабильный мутант G-белка стрептококка [61]. Мутантный белок имел температуру плавления более 100°C, что на 20°C больше по сравнению с белком дикого типа.

Недавно был разработан энергетический потенциал для оценки влияния точечных мутаций на стабильность глобулярных белков с известной пространственной структурой [62]. Эти расчеты доступны также через Интернет-сервер <http://foldx.embl.de/>. Расчеты включают не только оценки изменения свободной энергии белка при заменах аминокислот, но и расчеты положения заряженных групп, водных мостиков и центров связывания металлов, которые также могут оказывать значительное влияние на конформационную стабильность белков.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КОНФОРМАЦИОННУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ α -СПИРАЛЕЙ В КОРОТКИХ ПЕПТИДАХ

В отличие от белков в коротких пептидах длиной 10–20 остатков, отсутствуют многие возможности стабилизации структуры, которые есть у глобулярных белков. Еще в начале 80-х годов считалось, что короткие пептиды не могут поддерживать стабильные конформации в воде даже при относительно низких температурах [63]. Однако в середине 70-х годов в теоретических работах Финкельштейна и Птицына было предсказано, что короткие пептиды, состоящие из аминокислот с высокой склонностью к α -спиральной структуре, могут иметь достаточно стабильные α -спиральные конформации в водных растворах [64–68]. Позднее эти теоретические предсказания были подтверждены экспериментально на основе исследования синтетических пептидов, последовательности которых повторяли последовательности α -спиралей рибонуклеазы А [69, 70]. Теоретическая модель, разработанная Финкельштейном и Птицыным, описывает вероятность образования α -спиралей, β -структур и изгибов в коротких пептидах и глобулярных белках на основе классического подхода Зима–Брэгга с модификациями, позволяющими учесть некоторые дополнительные взаимодействия, такие, как электростатические взаимодействия заряженных боковых цепей между собой и с макродиполем α -спирали, а также гидрофобные взаимодействия боковых цепей некоторых аминокислот. На основе этой теоретической модели создана компьютерная программа (ALB), способная успешно предсказывать не только примерный уровень конформационной стабильности α -спиральных пептидов [4], но и, с вероятностью ~65%, распреде-

ление элементов вторичной структуры в глобулярных белках [71]. Основным недостатком этой модели – отсутствие учета некоторых взаимодействий (например, так называемый CappingBox и/или наличие пролина в первом N-концевом положении α -спирали), позиционных зависимостей склонности аминокислот в первом и последнем витке спирали, а также влияние различных специальных последовательностей соседних с α -спиралью участков рассматриваемого пептида, которые, как показано позднее, играют значительную роль в стабилизации α -спиральной конформации в белках и пептидах.

Начиная с конца 80-х и особенно в 90-е годы, описано большое количество экспериментов, в которых для изучения различных взаимодействий в α -спиралях использовали аминокислотные замены в коротких синтетических пептидах на основе полиаланина [72]. Этот подход позволил накопить достаточно данных и перейти к количественному описанию кооперативных механизмов конформационных переходов в α -спиральную конформацию для пептидов с произвольными последовательностями [5, 73].

В настоящее время считается, что у каждой из 20 природных аминокислот имеется характерная внутренняя, связанная с ковалентной структурой, тенденция к участию в образовании α -спиральных конформаций в пептидах и белках (например, изменения конфигурационной энтропии боковых цепей аминокислот при переходе из случайной в α -спиральную конформацию) [74]. Кроме этого, на стабильность α -спиральных конформаций белков влияют взаимодействия боковых цепей (между остатками в положениях $i, i+3$ и $i, i+4$), электростатические взаимодействия заряженных и полярных остатков с макродиполем α -спирали и Capping-взаимодействия между остатками, примыкающими к α -спирали со свободными NH- и CO-группами основной цепи белка в первом и последнем витке α -спирали [5, 73].

Кроме того, описаны локальные мотивы аминокислотных последовательностей, включающие остатки, прилегающие к α -спирали, которые либо специфически упаковываются против остатков первого (N-концевого) и последнего (C-концевого) витка спирали, либо образуют с ними сеть специфических водородных связей [75].

Обычно предполагается, что структурные склонности аминокислот не зависят от их положения в α -спирали [4, 76, 77]. Однако первый и последний виток α -спирали не эквивалентны остальной части спирали. Как можно видеть из *рис. 1*, подвижность боковой цепи валина в центральных позициях спирали сильно ограничена по сравнению с положением в ее первом витке. Отсутствие учета этого фактора

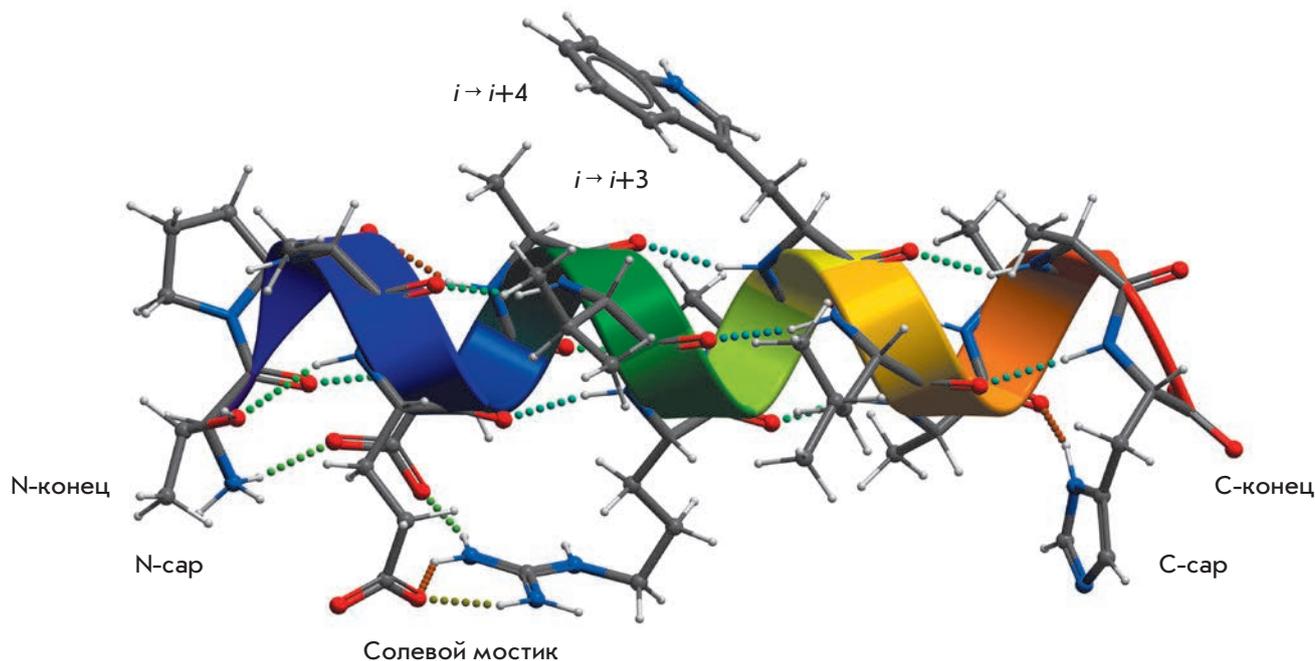


Рис. 1. Структура и факторы, влияющие на конформационную стабильность α -спиралей в белках и мономерных пептидах

значительно снижает точность теоретических моделей переходов α -спираль/случайный клубок в описании экспериментальных наблюдений по измерению стабильности α -спиральных пептидов со сложными аминокислотными последовательностями [78–80].

ХИМИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ СТАБИЛИЗАЦИИ α -СПИРАЛЬНЫХ СТРУКТУР

Поскольку α -спирали часто служат структурной основой межмолекулярных интерфейсов белковых комплексов, их часто используют в разработках пептидных ингибиторов, направленных против образования этих комплексов. Прицельное разрушение определенных белок-белковых взаимодействий с помощью α -спиральных или β -структурных пептидов является актуальной проблемой химической биологии, активно решаемой в настоящее время.

Однако использование пептидных ингибиторов имеет свои серьезные ограничения. Прежде всего, это недостаточная стабильность α -спиральной конформации коротких пептидов с аминокислотными последовательностями, полученными из природных белков. Кроме того, такие пептиды плохо проникают через клеточную мембрану и легко деградируются протеазами. В течение последних 30 лет разработаны различные методологии химической модификации коротких α -спиральных пептидов для повышения стабильности α -спиральных конформаций, а также их устойчивости к действию

протеаз (рис. 2). Химические модификации для стабилизации α -спиральных конформаций включают: 1) введение в аминокислотную последовательность пептида остатков с ограниченной подвижностью, таких, как α - α -диалкилированные остатки [81]; 2) ковалентное сшивание боковых цепей аминокислот, расположенных на соседних витках α -спиралей, включая образование ковалентных мостиков на основе дисульфидных связей [82], лактамных структур [83] и углеводов [3]; 3) кэппинг группы на N- или C-концах пептида [84]; а также различные комбинации всего вышеперечисленного [2].

В некоторых случаях химические модификации, стабилизирующие α -спирали, одновременно оказались способными улучшить и клеточную проницаемость этих пептидов, что делает их хорошими ингибиторами внутриклеточных мишеней. В частности, за последнее время появилось большое количество данных о повышенной проницаемости мембран некоторых типов раковых клеток человека для химически модифицированных α -спиральных пептидов [85].

КОНСТРУИРОВАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ α -СПИРАЛЕЙ БЕЛКОВ С ПОМОЩЬЮ ГЛОБАЛЬНОЙ ОПТИМИЗАЦИИ ИХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Одним из эффективных способов решения задачи стабилизации структуры биологически активных

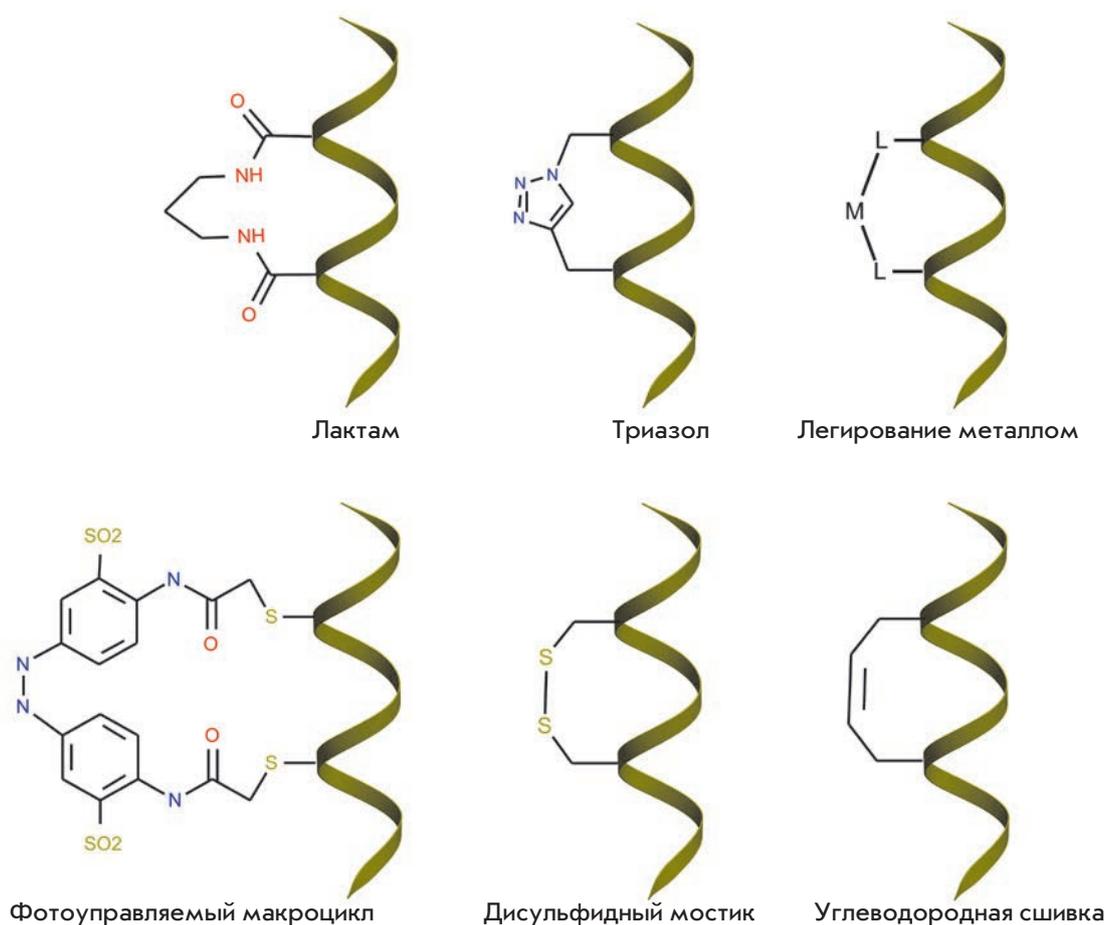


Рис. 2. Основные способы химических модификаций для увеличения конформационной стабильности α -спиральных структур

α -спиральных пептидов с использованием только природных аминокислот является SEQOPT – недавно разработанный метод глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиралей в мономерных пептидах и глобулярных белках [1]. Этот метод позволяет конструировать α -спирали белков с максимально возможной конформационной стабильностью при данных условиях (конформационное окружение, pH, температура и ионная сила раствора) с помощью глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей с произвольным фиксированием любых комбинаций аминокислот. Теоретической основой предлагаемого метода является модель AGADIR, описывающая термодинамику сворачивания α -спиралей при различных условиях окружающей среды (температура, pH и ионная сила раствора и т.д.) [77], успешно использованная также для конструирования мутантных белков с повышенной конформационной стабильностью [7]. Эта модель хорошо воспроизводит имеющиеся экспериментальные данные по стабильности α -спиральной конформации огромного количества коротких пептидов [73, 77–80, 86–88].

Зависимость энергетических параметров модели от температуры, pH и ионной силы растворителя была включена в расчеты как описано в работе [86].

Хотя гарантированная сходимость к глобальному минимуму в настоящее время не может быть получена для большинства практически значимых многомерных задач, показано, что разработанный метод имеет высокую эффективность в оптимизации аминокислотных последовательностей α -спиральных пептидов. Измерения КД нескольких синтетических пептидов с оптимизированными последовательностями оказались в хорошем согласии с теоретическими расчетами как в терминах абсолютных, так и относительных величин α -спирального содержания [6].

Как известно, короткие пептиды обычно весьма подвижны и не имеют какой-то одной выделенной конформации. На рис. 3 представлены распределения заселенностей всех возможных сегментов в коротких пептидах длиной 13 аминокислотных остатков. Последовательность (AETAAKFLRANA) одного из этих пептидов (см. панель 3A) соответствует α -спирали С рибонуклеазы А – одного из первых пептидов, значительная стабильность α -спиральной

конформации которого в воде (НС ~21%, 5°C, pH 7, ионная сила 100 ммоль/л, N- и C-концы ацетилированы и амидированы соответственно) показана экспериментально. Для сравнения на *рис. 3Б* представлены данные для пептида такой же длины, но имеющего оптимизированную последовательность DYMERWYRYYNEF и НС ~ 88%.

Из этих рисунков видно, что у пептида с аминокислотной последовательностью, взятой из глобулярного белка, в растворе заселенными оказались в основном несколько спиральных сегментов, начинающихся с аланина в четвертом положении. При этом заселенности каждого такого сегмента меняются случайным образом в зависимости от его длины и соответственно аминокислот С-концевой части данного участка. В результате первые четыре, а также последние две аминокислоты этого пептида почти не имеют шансов участвовать в образовании α -спиральной конформации, средняя длина которой около шести аминокислотных остатков. В результате спиральное содержание этого пептида довольно низкое – около 21%.

Оптимизированная последовательность, в отличие от природной, ведет себя совершенно иным образом. Наиболее высокую заселенность имеет спиральный сегмент, покрывающий всю последовательность пептида. Следующими по заселенности идут сегменты, отличающиеся от максимально длинного одним или двумя остатками, потерявшими α -спиральную конформацию с N- и C-концов.

В результате общее спиральное содержание пептида с оптимизированной последовательностью достигает почти 90%. Естественно, с увеличением длины пептида стабильность α -спиральной конформации возрастает, приближаясь к 100%. Значительно выше и средняя длина α -спирального участка пептида. Эти результаты показывают не только возможности метода SEQOPT, но и то, что потенциал 20 природных кислот вполне позволяет получать достаточно стабильные конформации в коротких α -спиральных пептидах длиной всего 10–20 остатков.

В обновленной версии SEQOPT (сервер доступен <http://mml.spbstu.ru/services/seqopt/>, см. *рис. 4*) введена новая, практически важная функция алгоритма, позволяющая установить минимально допустимый уровень растворимости α -спиральных пептидов с оптимизированными последовательностями. Насколько известно авторам, это первая работа в новой и многообещающей области глобальной оптимизации аминокислотных последовательностей белков.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ДЛЯ ПЕПТИДОВ

В последнее время высокостабильные α -спиральные пептиды, используемые в качестве высокоактивных

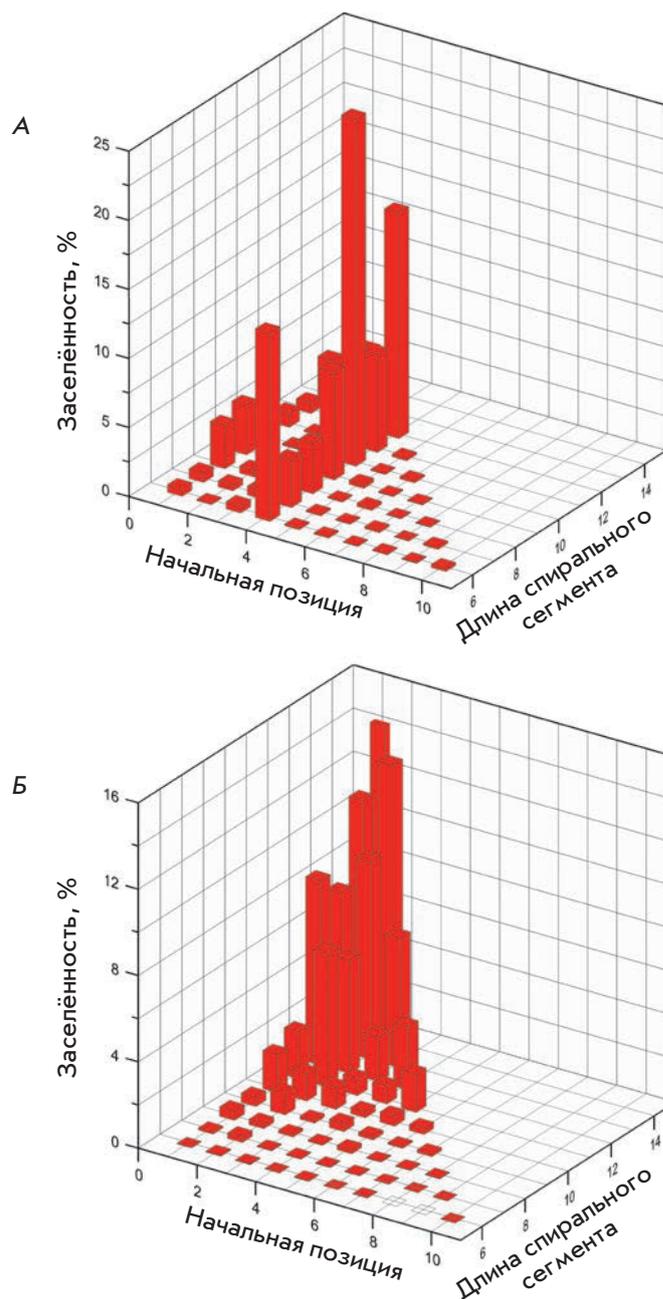


Рис. 3. Распределение заселенностей всех возможных сегментов в коротких пептидах длиной 13 аминокислотных остатков (согласно AGADIR [77]). А – С-пептид из рибонуклеазы А (ас-AETAAKFLRAHA-nh2) [69, 70]; Б – пептид с оптимизированной последовательностью такой же длины ас-DYMERWYRYYNEF-nh2

и высокоспецифичных ингибиторов межбелковых взаимодействий, находят все большее практическое применение в медицине в качестве антибиотиков различного назначения, а также для разрушения некоторых комплексов, играющих ключевую

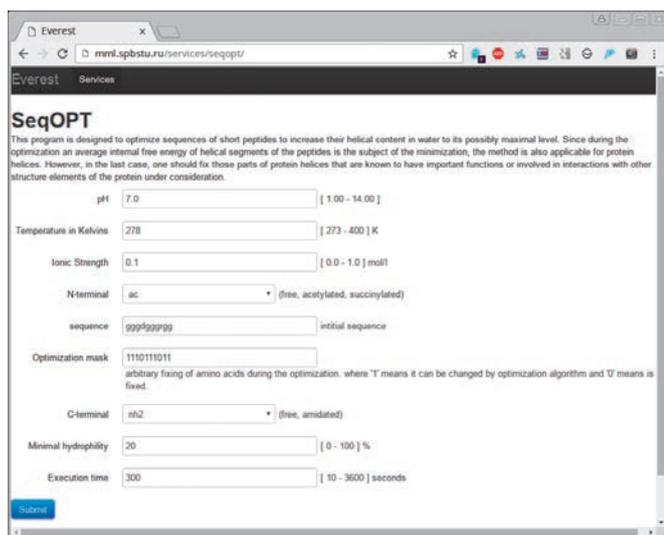


Рис. 4. Изображение интерфейса программы SEQOPT для задания таких параметров, как рН, температура, ионная сила, начальная последовательность для оптимизации и фиксируемые положения аминокислотных остатков, требования по минимальной растворимости, время расчета

роль в жизнедеятельности клеток человека [2]. Одна из главных проблем использования пептидов в медицине состоит в возможности их проникновения через клеточные мембраны.

Клеточная стенка препятствует попаданию чужеродных молекул внутрь клетки, что затрудняет использование сконструированных высокостабильных пептидов в терапевтических целях. Известно несколько подходов к решению этой проблемы. Один из них основан на использовании специальных рецепторов, распознающих определенные химические

соединения и включающих механизмы активного транспорта внутрь клетки [89]. Другим способом является разрушение клеточной мембраны и проникновение сквозь открывшиеся поры.

Известен и хорошо изучен целый класс пептидов, обладающих антимикробными свойствами и проникающих сквозь клеточные мембраны, в том числе способных переносить через мембрану как другие пептиды, так и химические соединения другой природы [102, 103]. Эти пептиды были выделены из белков различных организмов – от вирусов до высших (табл. 1).

Успешное применение пептидов с антибактериальной активностью для доставки лекарственных средств внутрь клеток показано в ряде экспериментов [101, 104, 105], при этом эффективность их проникновения в различные клетки существенным образом не отличается. Сигнальные пептиды другой группы также способны проникать в клетки. Общий механизм их действия остается неустановленным [89]. В табл. 2 представлены аминокислотные последовательности пептидов и указана их способность проникать в клетки одноклеточных микроорганизмов.

Эти пептиды могут быть синтезированы или клонированы вместе с необходимыми терапевтическими агентами.

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ α -СПИРАЛЬНЫХ ПЕПТИДОВ

Одна из основных проблем, ограничивающих развитие пептидных терапевтических средств, – их неустойчивость к протеолизу и связанные с этим проблемы с доставкой к молекулярным мишеням. Протеолиз обычно происходит в кишечнике, в ми-

Таблица 1. Наиболее часто используемые пептиды с антибактериальной активностью, способные проникать сквозь клеточную мембрану

Пептид	Аминокислотная последовательность	Вторичная структура	Ссылка
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	α -спиральная	[90]
Tat	GRKKRRQRRRPPQ	неструктурированная, PPII-спиральная	[91]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	α -спиральная	[92]
S4 ₁₃ -PV	ALWKTLKKVLPKAPKKKRKV	α -спиральная	[93]
Magainin 2	GIGKFLHSAKFKGKAFVGEIMNS	α -спиральная	[94]
Buforin II	TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	α -спиральная	[95]
Apidacins	RP - - - - PRPPHR	неструктурированная	[96]
Transportan (TP10)	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	α -спиральная	[97]
MAP	KLALKLALKALKALKLA	α -спиральная	[98]
sC18	GLRKRLRKFRNKIKEK	α -спиральная	[99]
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	α -спиральная	[100]
Bac7	PFPRGPRPIRPLPFPRGPRPIPRP	PPII- и α -спиральная	[101]

Таблица 2. N-Концевые пептиды, способствующие проникновению в клетки микроорганизмов

Аминокислотная последовательность	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	Ссылка
VLTNENPFSDP	+		+	+		[106]
YKKSNNPFSD		+		+	+	[107]
RSNNPFRAR	+	+	+			[107]
CMVSCAMPNPF					+	[108]
LLDLMD	+					[109]
LMDLAD	+				+	[109]
RQIKIWFQNRMRKWKK	+					[110]
YGRKKRRQRRRCKGGAKL			+			[110]
CFFKDEL					+	[111]
GASDYQLGCG		+			+	[111]

кроворсинках на внутренних стенках тонкого кишечника, в энтероцитах, гепатоцитах, антигенпредставляющих клетках и плазме, поэтому пероральное применение пептидных препаратов, как правило, не представляется возможным и требуется инъекционное введение. Однако даже при парентеральном введении деградация пептидных препаратов в крови в сочетании с быстрой почечной фильтрацией делают применение пептидных препаратов дорогим и неудобным [112]. Кроме того, синтетические терапевтические пептиды, как правило, по большей части неструктурированы и поэтому быстро расщепляются в естественных условиях внутриклеточными протеазами, часто с периодом полураспада порядка минут.

Устойчивость α -спиральных пептидов к действию протеаз можно усилить путем введения различных факторов, стабилизирующих конформационную стабильность α -спирали, – дополнительных солевых мостиковых связей или других модификаций, таких, как лактамные мостики [113, 114], а также образования пептидных олигомерных структур [115].

Поскольку природные пептиды в целом обладают сравнительно коротким временем жизни в плазме, для его увеличения разработаны несколько подходов. Первый подход направлен на ограничение ферментативной деградации путем выявления возможных сайтов расщепления пептида с последующими структурными модификациями, например, замещением аминокислот в сайте расщепления. Повысить степень устойчивости пептидов к расщеплению можно также путем усовершенствования укладки вторичной структуры пептида. Такой подход предполагает использование структурно-индуцированных проб – (SIP)-хвост, лактамных мостиков, а также сшивки либо циклизацию пептидной цепи [3, 83, 116].

Для увеличения времени жизни пептида используют также стратегии связывания пептидов с циркулирующим белком альбумином в качестве транс-

портного средства и пептидное ацилирование [117]. Связывание полиэтиленгликоля с пептидами часто применяют для увеличения периода полувыведения пептидных препаратов из плазмы крови [118].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы биологически активные пептиды приобретают все большую популярность в качестве потенциальных лекарственных средств в связи с их высокой активностью, нетоксичностью и умеренной стоимостью. Проблемы, связанные с недостаточной конформационной стабильностью, способностью проникать через клеточные мембраны, а также с быстрой деградацией внутриклеточными протеазами, в значительной мере удается преодолеть с помощью современных методов конструирования высокостабильных пептидов на основе только природных аминокислот или с использованием нескольких типов их химических модификаций. SEQOPT – недавно разработанный вычислительный метод конструирования α -спиральных пептидов, содержащих только 20 природных аминокислот, позволяет получать пептиды с максимально возможной стабильностью их α -спиральной конформации. Метод позволяет учесть конформационное окружение, условия окружающей среды (рН, температура и ионная сила раствора), минимально допустимый уровень растворимости, а также произвольно фиксировать любые комбинации аминокислот, необходимые для биологической активности пептидов. Конформационная стабильность мономерных пептидов с оптимизированной структурой приближается к конформационной стабильности α -спиральных участков вторичной структуры глобулярных белков. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-34-00023).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yakimov A., Rychkov G., Petukhov M. // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1216. P. 1–14.
2. Estieu-Gionnet K., Guichard G. // *Expert Opin. Drug Discov.* 2011. V. 6. № 9. P. 937–963.
3. Robertson N.S., Jamieson A.G. // *Repts Organic Chem.* 2015. V. 5. P. 65–74.
4. Finkelstein A.V., Badretdinov A.Y., Ptitsyn O.B. // *Proteins.* 1991. V. 10. № 4. P. 287–299.
5. Doig A.J. // *Biophys. Chem.* 2002. V. 101–102. P. 281–293.
6. Petukhov M., Tatsu Y., Tamaki K., Murase S., Uekawa H., Yoshikawa S., Serrano L., Yumoto N. // *J. Pept. Sci.* 2009. V. 15. № 5. P. 359–365.
7. Villegas V., Viguera A.R., Aviles F.X., Serrano L. // *Fold Des.* 1996. V. 1. № 1. P. 29–34.
8. Суржик М.А., Чуркина С.В., Шмидт А.Е., Швецов А.В., Кожина Т.Н., Фирсов Д.Л., Фирсов Л.М., Петухов М.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2010. Т. 46. № 2. С. 221–227.
9. Bruins M.E., Janssen A.E., Boom R.M. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2001. V. 90. № 2. P. 155–186.
10. Глик Б., Пастернак Д. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.* М.: Мир, 2002.
11. Razvi A., Scholtz J.M. // *Protein Sci.* 2006. V. 15. № 7. P. 1569–1578.
12. Trivedi S., Gehlot H.S., Rao S.R. // *Genet. Mol. Res.* 2006. V. 5. № 4. P. 816–827.
13. Mozo-Villiarías A., Querol E. // *Curr. Bioinformatics.* 2006. V. 1. № 1. P. 25–32.
14. Li W.F., Zhou X.X., Lu P. // *Biotechnol. Adv.* 2005. V. 23. № 4. P. 271–281.
15. Ladenstein R., Antranikian G. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1998. V. 61. P. 37–85.
16. Vieille C., Zeikus G.J. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. № 1. P. 1–43.
17. Sterner R., Liebl W. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2001. V. 36. № 1. P. 39–106.
18. Zhou X.X., Wang Y.B., Pan Y.J., Li W.F. // *Amino Acids.* 2008. V. 34. № 1. P. 25–33.
19. Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 36. P. 12742–12747.
20. Menendez-Arias L., Argos P. // *J. Mol. Biol.* 1989. V. 206. № 2. P. 397–406.
21. Wetmur J.G., Wong D.M., Ortiz B., Tong J., Reichert F., Gelfand D.H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 41. P. 25928–25935.
22. Britton K.L., Baker P.J., Borges K.M., Engel P.C., Pasquo A., Rice D.W., Robb F.T., Scandurra R., Stillman T.J., Yip K.S. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 229. № 3. P. 688–695.
23. Argos P., Rossman M.G., Grau U.M., Zuber H., Frank G., Tratschin J.D. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. № 25. P. 5698–5703.
24. Bohm G., Jaenicke R. // *Int. J. Pept. Protein Res.* 1994. V. 43. № 1. P. 97–106.
25. Zeldovich K.B., Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I. // *PLoS Comput. Biol.* 2007. V. 3. № 1. P. e5.
26. Petukhov M., Kil Y., Kuramitsu S., Lanzov V. // *Proteins.* 1997. V. 29. № 3. P. 309–320.
27. Петухов М.Г., Киль Ю.В., Ланцов В.А. // *ДАН.* 1997. Т. 356. № 2. С. 268–271.
28. Петухов М.Г., Байтин Д.М., Киль Ю.В., Ланцов В.А. // *ДАН.* 1998. Т. 362. № 1. С. 118–121.
29. Facchiano A.M., Colonna G., Ragone R. // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 9. P. 753–760.
30. Matthews B.W., Nicholson H., Becktel W.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. № 19. P. 6663–6667.
31. Pace C.N. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 226. № 1. P. 29–35.
32. Matsui I., Harata K. // *FEBS J.* 2007. V. 274. № 16. P. 4012–4022.
33. Zhang X., Meining W., Fischer M., Bacher A., Ladenstein R. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 306. № 5. P. 1099–1114.
34. Whitlow M., Howard A.J., Finzel B.C., Poulos T.L., Winborne E., Gilliland G.L. // *Proteins.* 1991. V. 9. № 3. P. 153–173.
35. Fujii T., Hata Y., Oozeki M., Moriyama H., Wakagi T., Tanaka N., Oshima T. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 6. P. 1505–1513.
36. Eidsness M.K., Richie K.A., Burden A.E., Kurtz D.M., Jr., Scott R.A. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 34. P. 10406–10413.
37. Glyakina A.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 17. P. 2231–2238.
38. Shirley B.A., Stanssens P., Hahn U., Pace C.N. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 3. P. 725–732.
39. Tanner J.J., Hecht R.M., Krause K.L. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 8. P. 2597–2609.
40. Jaenicke R., Bohm G. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1998. V. 8. № 6. P. 738–748.
41. Matsumura M., Matthews B.W. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 202. P. 336–356.
42. Суржик М.А., Шмидт А.Е., Глазунов Е.А., Фирсов Д.Л., Петухов М.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2014. Т. 50. № 2. С. 139–146.
43. Matsumura M., Signor G., Matthews B.W. // *Nature.* 1989. V. 342. № 6247. P. 291–293.
44. Fierobe H.P., Stoffer B.B., Frandsen T.P., Svensson B. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. № 26. P. 8696–8704.
45. Li Y., Coutinho P.M., Ford C. // *Protein Eng.* 1998. V. 11. № 8. P. 661–667.
46. Dombkowski A.A. // *Bioinformatics.* 2003. V. 19. № 14. P. 1852–1853.
47. Jackel C., Kast P., Hilvert D. // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 153–173.
48. Stemmer W.P. // *Nature.* 1994. V. 370. № 6488. P. 389–391.
49. Zhao H., Arnold F.H. // *Protein Eng.* 1999. V. 12. № 1. P. 47–53.
50. Mamonova T.B., Glyakina A.V., Kurnikova M.G., Galzitskaya O.V. // *J. Bioinform. Comput. Biol.* 2010. V. 8. № 3. P. 377–394.
51. Giver L., Gershenson A., Freskgard P.O., Arnold F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 22. P. 12809–12813.
52. Lippow S.M., Tidor B. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 4. P. 305–311.
53. Kang S.G., Saven J.G. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007. V. 11. № 3. P. 329–334.
54. Marti S., Andres J., Moliner V., Silla E., Tunon I., Bertran J. // *Chem. Soc. Rev.* 2008. V. 37. № 12. P. 2634–2643.
55. Morra G., Meli M., Colombo G. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2008. V. 9. № 2. P. 181–196.
56. Jacobs D.J., Rader A.J., Kuhn L.A., Thorpe M.F. // *Proteins.* 2001. V. 44. № 2. P. 150–165.
57. Lazaridis T., Karplus M. // *Science.* 1997. V. 278. № 5345. P. 1928–1931.
58. Lazaridis T., Lee I., Karplus M. // *Protein Sci.* 1997. V. 6. № 12. P. 2589–2605.
59. Galzitskaya O.V., Higo J., Finkelstein A.V. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2002. V. 3. № 2. P. 191–200.
60. Desmet J., De Maeyer M., Hazes B., Lasters I. // *Nature.* 1992. V. 356. № 6369. P. 539–542.
61. Malakauskas S.M., Mayo S.L. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 6. P. 470–475.
62. Schymkowitz J.W., Rousseau F., Martins I.C., Ferkinghoff-Borg J., Stricher F., Serrano L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 29. P. 10147–10152.

63. Shoemaker K.R., Kim P.S., Brems D.N., Marqusee S., York E.J., Chaiken I.M., Stewart J.M., Baldwin R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 8. P. 2349–2353.
64. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *J. Mol. Biol.* 1976. V. 103. № 1. P. 15–24.
65. Finkelstein A.V. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 525–529.
66. Финкельштейн А.В. // *Мол. биол.* 1977. Т. 11. С. 811–819.
67. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 469–495.
68. Finkelstein A.V., Ptitsyn O.B., Kozitsyn S.A. // *Biopolymers*. 1977. V. 16. № 3. P. 497–524.
69. Bierczynski A., Kim P.S., Baldwin R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1982. V. 79. № 8. P. 2470–2474.
70. Kim P.S., Baldwin R.L. // *Nature*. 1984. V. 307. № 5949. P. 329–334.
71. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. *Физика белка*. М.: Книжный дом «Университет», 2002.
72. Scholtz J.M., Baldwin R.L. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1992. V. 21. P. 95–118.
73. Munoz V., Serrano L. // *Nat. Struct. Biol.* 1994. V. 1. № 6. P. 399–409.
74. Creamer T.P., Rose G.D. // *Proteins*. 1994. V. 19. № 2. P. 85–97.
75. Doig A.J., Baldwin R.L. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 7. P. 1325–1336.
76. Stapley B.J., Rohl C.A., Doig A.J. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 11. P. 2383–2391.
77. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. № 3. P. 275–296.
78. Petukhov M., Munoz V., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 278. № 1. P. 279–289.
79. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Yoshikawa S., Serrano L. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 10. P. 2144–2150.
80. Petukhov M., Uegaki K., Yumoto N., Serrano L. // *Protein Sci.* 2002. V. 11. № 4. P. 766–777.
81. Toniolo C., Crisma M., Formaggio F., Peggion C. // *Biopolymers*. 2001. V. 60. № 6. P. 396–419.
82. Ravi A., Prasad B.V.V., Balaram P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1983. V. 105. № 1. P. 105–109.
83. Taylor J.W. // *Biopolymers*. 2002. V. 66. № 1. P. 49–75.
84. Chapman R.N., Dimartino G., Arora P.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 39. P. 12252–12253.
85. Chu Q., Moellering R.E., Hilinski G.J., Kim Y.-W., Grossmann T.N., Yeh J.T.H., Verdine G.L. // *Med. Chem. Comm.* 2015. V. 6. № 1. P. 111–119.
86. Munoz V., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1995. V. 245. № 3. P. 297–308.
87. Petukhov M., Yumoto N., Murase S., Onmura R., Yoshikawa S. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 2. P. 387–397.
88. Lacroix E., Viguera A.R., Serrano L. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 284. № 1. P. 173–191.
89. Rajarao G.K., Nekhotiaeva N., Good L. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2002. V. 215. № 2. P. 267–272.
90. Derossi D., Joliot A.H., Chassaing G., Prochiantz A. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 14. P. 10444–10450.
91. Vives E., Brodin P., Lebleu B. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 25. P. 16010–16017.
92. Morris M.C., Vidal P., Chaloin L., Heitz F., Divita G. // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. № 14. P. 2730–2736.
93. Hariton-Gazal E., Feder R., Mor A., Graessmann A., Brack-Werner R., Jans D., Gilon C., Loyter A. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 29. P. 9208–9214.
94. Zasloff M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. № 15. P. 5449–5453.
95. Park C.B., Kim H.S., Kim S.C. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 244. № 1. P. 253–257.
96. Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. // *EMBO J.* 1989. V. 8. № 8. P. 2387–2391.
97. Pooga M., Hallbrink M., Zorko M., Langel U. // *FASEB J.* 1998. V. 12. № 1. P. 67–77.
98. Steiner V., Schar M., Bornsen K.O., Mutter M. // *J. Chromatogr.* 1991. V. 586. № 1. P. 43–50.
99. Neundorf I., Rennert R., Hoyer J., Schramm F., Löbner K., Kitanovic I., Wöfl S. // *Pharmaceuticals*. 2009. V. 2. № 2. P. 49.
100. Oren Z., Lerman J.C., Gudmundsson G.H., Agerberth B., Shai Y. // *Biochem. J.* 1999. V. 341 (Pt 3). P. 501–513.
101. Otvos L., Jr., Cudic M., Chua B.Y., Deliyannis G., Jackson D.C. // *Mol. Pharm.* 2004. V. 1. № 3. P. 220–232.
102. Splith K., Neundorf I. // *Eur. Biophys. J.* 2011. V. 40. № 4. P. 387–397.
103. Henriques S.T., Melo M.N., Castanho M.A. // *Biochem. J.* 2006. V. 399. № 1. P. 1–7.
104. Rousselle C., Clair P., Lefauconnier J.M., Kaczorek M., Scherrmann J.M., Tamsamani J. // *Mol. Pharmacol.* 2000. V. 57. № 4. P. 679–686.
105. Splith K., Hu W., Schatzschneider U., Gust R., Ott I., Onambele L.A., Prokop A., Neundorf I. // *Bioconjug. Chem.* 2010. V. 21. № 7. P. 1288–1296.
106. Tan P.K., Howard J.P., Payne G.S. // *J. Cell Biol.* 1996. V. 135. № 6. Pt 2. P. 1789–1800.
107. Paoluzi S., Castagnoli L., Lauro I., Salcini A.E., Coda L., Fre S., Confalonieri S., Pelicci P.G., Di Fiore P.P., Cesareni G. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 22. P. 6541–6550.
108. Fernandez-Chacon R., Achiriloaie M., Janz R., Albanesi J.P., Sudhof T.C. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 17. P. 12752–12756.
109. Rosenthal J.A., Chen H., Slepnev V.I., Pellegrini L., Salcini A.E., Di Fiore P.P., De Camilli P. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 48. P. 33959–33965.
110. Schwartz J.J., Zhang S. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2000. V. 2. № 2. P. 162–167.
111. Pap E.H., Dansen T.B., van Summeren R., Wirtz K.W. // *Exp. Cell Res.* 2001. V. 265. № 2. P. 288–293.
112. Weinstock M.T., Francis J.N., Redman J.S., Kay M.S. // *Biopolymers*. 2012. V. 98. № 5. P. 431–442.
113. Houston M.E., Jr., Campbell A.P., Lix B., Kay C.M., Sykes B.D., Hodges R.S. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 31. P. 10041–10050.
114. Houston M.E., Jr., Gannon C.L., Kay C.M., Hodges R.S. // *J. Pept. Sci.* 1995. V. 1. № 4. P. 274–282.
115. Jeong W.J., Lee M.S., Lim Y.B. // *Biomacromolecules*. 2013. V. 14. № 8. P. 2684–2689.
116. Sim S., Kim Y., Kim T., Lim S., Lee M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 50. P. 20270–20272.
117. Bao W., Holt L.J., Prince R.D., Jones G.X., Aravindhan K., Szapacs M., Barbour A.M., Jolivet L.J., Lepore J.J., Willette R.N., et al. // *Cardiovasc. Diabetol.* 2013. V. 12. P. 148.
118. Delgado C., Francis G.E., Fisher D. // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 1992. V. 9. № 3–4. P. 249–304.

УДК 57.036:577.113.3

Каскад термофильных ферментов как инструмент создания модифицированных нуклеотидов

Р. С. Есипов*, Ю. А. Абрамчик, И. В. Фатеев, И. Д. Константинова, М. А. Костромина, Т. И. Муравьева, К. Г. Артемова, А. И. Мирошников

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

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

Поступила в редакцию 09.11.2015

Принята к печати 06.06.2016

РЕФЕРАТ Предложена новая стратегия биосинтеза биологически важных нуклеотидов, заключающаяся в мультиферментативном каскадном превращении *D*-пентоз в пуриновые нуклеотиды с использованием ферментов нуклеинового обмена термофильных микроорганизмов (рибокиназы, фосфорибозилпирофосфатсинтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы). Клонирован ген рибокиназы термофильного микроорганизма *Thermus* sp. 2.9, два разных гена фосфорибозилпирофосфатсинтетазы (PRPP-синтетазы) и ген аденин-фосфорибозилтрансферазы (APR-трансферазы) из *Thermus thermophilus* HB27. Получены высокопродуктивные штаммы-продуценты *Escherichia coli*, разработаны методы выделения упомянутых ферментов, изучена их субстратная специфичность. Показана возможность использования этих ферментов для превращения *D*-пентоз в 5-фосфаты, а затем под действием рибокиназы и PRPP-синтетаз – в 5-фосфо- α -*D*-пентофуранозо-1-пирофосфаты, конденсация которых с аденином и рядом его структурных аналогов, катализируемая APR-трансферазой, приводила к получению искомым нуклеотидов. На примере 2-хлор(фтор)-аденозинмонофосфата (2Cl-AMP и 2F-AMP) показана возможность использования системы термофильных ферментов в одном реакционном объеме для получения биологически активных нуклеотидов из *D*-рибозы и соответствующих гетерооснований в присутствии АТФ, рибокиназы, PRPP-синтетазы и APR-трансферазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденин-фосфорибозилтрансфераза термофильных микроорганизмов, рибокиназа, субстратные свойства, ферментативный синтез нуклеотидов, фосфорибозилпирофосфатсинтетаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; ИПТГ – изопропил- β -*D*-1-тиогактопиранозид; ПААГ – полиакриламидный гель; ПМСФ – фенилметансульфонилфторид; ПЦР – полимеразная цепная реакция; APR-трансфераза (*Tth*APRT) – аденин-фосфорибозилтрансфераза из *Thermus thermophilus*; LB – среда Луриа-Бертани (*Luria-Bertani*); PRPP-синтетаза (*Tth*PRPPS) – фосфорибозилпирофосфатсинтетаза из *T. thermophilus*; RK (*Tsp*RK) – рибокиназа из *Thermus* sp.; 2Cl-AMP – 2-хлораденозин-5'-монофосфат; 2F-AMP – 2-фтораденозин-5'-монофосфат; Pi – неорганический фосфат; PRPP – 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфат.

ВВЕДЕНИЕ

5'-Фосфорилированные нуклеозиды являются важными метаболитами биосинтеза ДНК и РНК, а также косубстратами и кофакторами огромного числа биохимических превращений [1–3]. Важная роль этих соединений в живой клетке определяет интерес к синтезу не только природных представителей этого класса, но и их разнообразных аналогов с целью направленного влияния на метаболизм в норме и при патологии [4–8]. Большое число нуклеозидов, модифицированных по гетерооснованию и углеводному фрагменту, используются в качестве важных средств против вирусных инфекций и зло-

качественных новообразований [9–13]. Действие модифицированных нуклеозидов опосредовано через внутриклеточное превращение в первую очередь в 5'-монофосфаты и далее, как правило, в 5'-ди- и трифосфаты, которые и выступают в качестве антиметаболитов. Известно, что первая стадия метаболической активации модифицированных нуклеозидов – превращение в 5'-монофосфаты – определяет их биологические свойства. Следует также отметить, что нуклеозид-5'-монофосфаты, модифицированные по гетерооснованию и/или по углеводному фрагменту, представляют значительный интерес в качестве исходных соединений для хи-

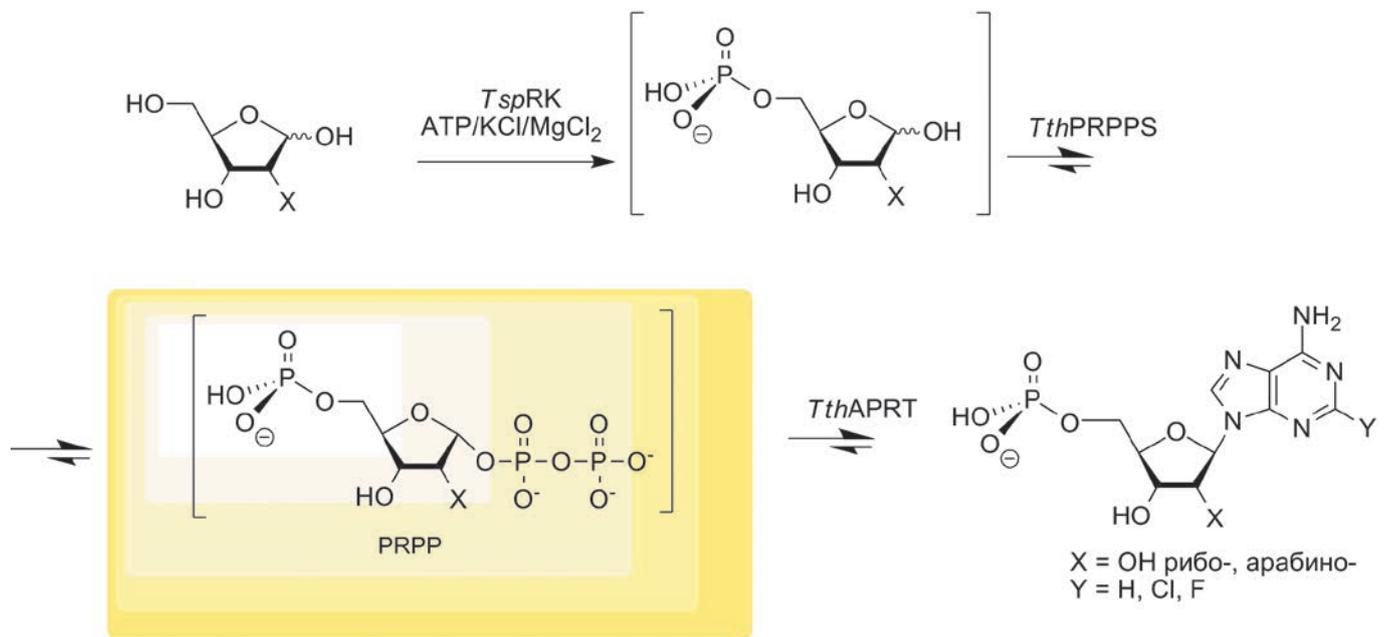


Рис. 1. Схема полиферментативного каскадного синтеза модифицированных аденозин-5'-монофосфатов

мического синтеза производных по фосфату (пролекарств) и ферментативного превращения в 5'-трифосфаты для последующего включения в олигонуклеотиды [14–16]. Разработка эффективных биосинтетических подходов к получению 5'-монофосфатов модифицированных нуклеозидов привлекает большое внимание исследователей, работающих в области повышения эффективности химиотерапевтических средств.

Моно- и полиферментативному синтезу нуклеозид-5'-моно- и 5'-трифосфатов посвящено большое число публикаций [17–21], среди которых наше внимание привлекли фосфорибозилтрансферазы, недавно успешно использованные в каскадном пятикомпонентном синтезе пуриновых рибозид-5'-монофосфатов [22–24]. Известно, что нуклеозид-фосфорилазы термофильных микроорганизмов менее чувствительны к структуре субстратов [25, 26], что позволяет работать при 70–80°C и существенно увеличивает эффективность ферментативной реакции за счет повышения растворимости гетероциклических субстратов [27]. Все эти данные вызвали наш интерес к получению рекомбинантных ферментов: рибозиназы, фосфорибозилпирофосфат-синтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы из термофильных микроорганизмов и изучению их субстратных свойств с целью определения потенциала этих ферментов в каскадном синтезе пуриновых нуклеозид-5'-монофосфатов согласно схеме на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование

Гены TT_RS05985, TT_RS06430, TT_RS06315, кодирующие *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TthAPRT*, соответственно амплифицировали на матрице геномной ДНК штамма *Thermus thermophilus* HB27 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием синтетических праймеров. Ген QT17_05185, кодирующий РК из *Thermus* sp. 2.9, был оптимизирован по встречаемости кодонов для экспрессии в *Escherichia coli* и синтезирован химико-ферментативным способом из перекрывающихся олигонуклеотидов. Все гены клонировали в экспрессионный вектор pET-23d+ по сайтам узнавания рестриктаз NcoI и XhoI.

Культивирование штаммов-продуцентов

Штаммы *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3) и C3029/pGTf2 трансформировали полученными экспрессионными векторами pER-PRPPS1-Tth, pER-PRPPS2-Tth, pER-APRT-Tth и pER-RK-Tsp. Штаммы-продуценты, производные *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta(DE3), культивировали при 37°C в среде LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование штаммов-продуцентов, производных *E. coli* C3029/pGTf2, проводили в среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, 20 мкг/мл хлорамфеникола и 1 нг/мл тетрациклина. После достижения культурами оптической плотности

$A_{595} = 0.8$ вносили ИПТГ до конечной концентрации 0.4 мМ и продолжали культивирование при 23 и 37°C. Длительность выращивания варьировала от 4 до 16 ч в зависимости от штамма. По окончании культивирования клеточную биомассу отделяли центрифугированием, гомогенизировали в соотношении 1 : 10 (w/v) в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 150 мМ NaCl, 2 мМ ПМСФ и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P (Sartorius, Германия) в течение 10 мин при 4°C (цикл – 0.4 с, амплитуда – 30%). Содержание целевых ферментов в растворимой и нерастворимой клеточных фракциях определяли денситометрическим анализом электрофоретических гелей с помощью программы ImageLab 5.0 (Bio-Rad, США) [28]. Выбор остановили на штаммах-продуцентах, содержащих максимальное количество целевого белка в супернатанте: *E. coli* BL21(DE3)/pER-APRT-Tth (культивирование в течение 4 ч при 37°C после внесения ИПТГ), *E. coli* Rosetta(DE3)/pER-PRPPS1-Tth (4 ч при 37°C), *E. coli* C3029/pGTf2/pER-PRPPS2-Tth (5 ч при 37°C) и *E. coli* C3029/pGTf2/pER-RK-Tsp (16 ч при 23°C). Штаммы выращивали в 5–6 л культуральной среды.

Выделение и очистка *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TspRK*

Клеточную биомассу штаммов-продуцентов *TthPRPPS1*, *TthPRPPS2* и *TspRK* ресуспендировали в буферном растворе 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 1 мМ ПМСФ в соотношении 1 : 10 (w/v) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора Labsonic P в течение 20 мин при +4°C (цикл – 0.5 с, амплитуда – 50%). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 30 мин при +4°C на центрифуге Hermle Z383K (HERMLE Labortechnik GmbH, Германия). При выделении *TspRK* осветленный клеточный лизат подвергали термической обработке в течение 10 мин при 65°C для осаждения примесных белков и ДНК. Осадок отделяли центрифугированием. Дальнейшее выделение ферментов осуществляли по одной схеме. Осветленный клеточный лизат наносили на колонку ХК 16/20 (GE Healthcare, США) с сорбентом Ni²⁺-IDA (Qiagen, Германия), предварительно уравновешенным буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7. Отмывали от балластных белков буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 50 мМ имидазол. Целевой белок элюировали буферным раствором 50 мМ Трис-НСl, рН 8.7, 200 мМ имидазол. После аффинной хроматографии к фракциям, содержащим целевой белок, добавляли EDTA до 5 мМ и концентрировали при помощи ультрафильтрационной ячейки Amicon 8200 объемом 200 мл (Millipore, США) на мембране YM 10 кДа (Millipore) при выделении *TthPRPPS1*

и *TthPRPPS2*, YM 30 кДа (Millipore) при выделении *TspRK*. Последующую очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 200 (GE Healthcare) в буферном растворе 20 мМ Трис-НСl, рН 8.5, 1 мМ АТФ, 1 мМ MgCl₂, 5% глицерина, 0.04% NaN₃. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали с помощью ультрафильтрации до конечной концентрации 12 ± 1 мг/мл как описано ранее. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя БСА в качестве стандарта [29]. Чистоту белка определяли с помощью белкового электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях [28]. Выделенные ферменты хранили при -80°C.

Выделение и очистка *TthAPRT*

Разрушение клеточной биомассы штамма-продуцента *TthAPRT* осуществляли по методике, описанной для других ферментов. В осветленный клеточный лизат добавляли NaCl до концентрации 300 мМ и проводили термическую обработку в течение 10 мин при 65°C. После осаждения осадка белка центрифугированием лизат наносили на колонку PD-10 с сорбентом Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare, США), уравновешенным буферным раствором 20 мМ Трис-НСl, рН 9.0, 1.0 мМ EDTA. Раствор белка после обессоливания наносили на колонку ХК 16/20 с сорбентом Q Sepharose XL (GE Healthcare, США), уравновешенным тем же буферным раствором. Целевой белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (от 0 до 400 мМ). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку ХК 16/20 с Phenyl Sepharose HP (GE Healthcare, США), уравновешенной буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис-НСl, рН 7.6, 1 М (NH₄)₂SO₄, 1.0 мМ EDTA. *TthAPRT* элюировали в линейном градиенте (NH₄)₂SO₄ (от 1 до 0 М). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали ультрафильтрацией на полисульфоновой мембране PBGC 10 кДа до конечной концентрации 5.0 ± 0.5 мг/мл как описано ранее. Окончательную очистку проводили на колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 200 20 мМ Трис-НСl-буфере рН 8.0, содержащем 50 мМ NaCl, 5% глицерина, 0.04% NaN₃. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали путем ультрафильтрации до конечной концентрации 12 ± 1 мг/мл. Концентрацию и чистоту белка определяли как описано ранее [28, 29]. Выделенный фермент хранили при -80°C.

Определение активности ферментов

Активность *TspRK* определяли радиохимическим методом по образованию *D*-рибофуранозо-5-[³²P]-фосфата в присутствии [³²P]АТФ. Реакционная

смесь (0.05 мл, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0) содержала 0.4 мМ динатриевой соли АТР, 1 мМ *D*-рибозы, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 1 мМ КН₂РО₄, 6 мкКи [γ-³²P]АТР и 0.15 мкг *Tsp*РК. Смесь термостатировали при 75°С. Аликвоты (0.8 мкл) отбирали через 10, 20 и 40 мин и наносили на пластинки с PEI-целлюлозой, затем элюировали водным 0.5 М дигидроортофосфатом калия. Количество образовавшегося *D*-рибофуранозо-5-[³²P]фосфата определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике TRI-CARB 2100TR (Packard BioScience Co.).

Активность *Tth*PRPPS1 и *Tth*PRPPS2 определяли в реакционной смеси, состоящей из 1 мМ динатриевой соли АТР, 1 мМ динатриевой соли *D*-рибозо-5-фосфата, 5 мМ MgCl₂, 10 мМ КН₂РО₄, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, при 75°С. Добавляли 0.75 мкг *Tth*PRPPS на 0.5 мл смеси.

Активность *Tth*APRT определяли в реакционной смеси, содержащей 1 мМ аденина, 1 мМ пентанатриевой соли 5-фосфорибозил-α-1-пирофосфата (PRPP), 5 мМ MgCl₂, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, при 75°С. *Tth*APRT добавляли из расчета 0.125 мкг на 0.5 мл реакционной смеси. За единицы активности принимали количество продукта (мкмоль), образующееся за 1 мин.

Определение кинетических параметров рибокиназы

Реакционная смесь (0.5 мл, 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0) содержала (а) динатриевую соль АТР (от 0.01 до 0.6 мМ) и *D*-рибозу (1 мМ); (б) *D*-рибозу (от 0.01 до 8.0 мМ) и АТР (1 мМ) для определения значений K_M и V_{max} для АТР и *D*-рибозы соответственно, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 10 мМ КН₂РО₄ и 0.0175 мкг *Tsp*РК. Для каждого эксперимента готовили 16 реакционных смесей. Смеси термостатировали при 75°С в течение 12 мин, каждый эксперимент повторяли трижды. Затем определяли среднее значение скорости в трех опытах с одинаковой концентрацией фермента. Концентрации субстрата и продукта определяли с помощью ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования 0.1 М КН₂РО₄ (вода, рН 6.0, скорость потока 0.5 мл/мин) с измерением на длине волны 254 нм (УФ-детектор Waters 2489; колонка Supelcosil LC-18-T, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Определение кинетических параметров PRPP-синтеза

Для определения кинетических параметров ферментов концентрацию АТР изменяли в интервале от 0.005 до 0.2 мМ. Аналогичный интервал использовали для *D*-рибозо-5-фосфата. Остальные условия были такими же, как при определении ферментативной активности. Реакцию проводили в течение

2 мин в трех повторностях. Затем определяли среднее значение скорости в трех опытах с одинаковой концентрацией. Концентрации АТР и АМР определяли с помощью ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 0.1 М КН₂РО₄, рН 6.0, скорость потока 0.5 мл/мин, длина волны – 254 нм (детектор Waters 2489; колонка Supelcosil LC-18-T, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Определение кинетических параметров APR-трансферазы

При определении кинетических параметров APR-трансферазы концентрацию аденина изменяли в интервале от 0.005 до 0.2 мМ, а PRPP – от 0.05 до 1.2 мМ. Остальные условия были такими же, как при определении активности. Реакцию проводили в течение 1 мин в трех повторностях. Среднее значение скорости реакции определяли по результатам трех экспериментов с одинаковой концентрацией. Концентрации аденина и АМР определяли методом ВЭЖХ в изократическом методе элюирования 36% водным метанолом, скорость потока 0.5 мл/мин, длина волны – 254 нм (детектор Waters 2489; колонка MZ PerfectSil 100 ODS-3, 5 мкм, 150 × 4.6 мм).

Кинетические параметры определяли нелинейным регрессионным анализом при помощи программы SciDAVis v.0.2.4. Наблюдаемую каталитическую константу (k_{cat}) рассчитывали на одну субъединицу, массу которой определяли исходя из аминокислотной последовательности (32.0 кДа для *Tsp*РК, 34.5 кДа для *Tth*PRPPS1, 34.6 кДа для *Tth*PRPPS2 и 19.0 кДа для *Tth*APRT).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения возможности трехступенчатого биосинтеза нуклеотидов проведены комплексные работы по получению и исследованию субстратных свойств рекомбинантных ферментов нуклеинового обмена – рибокиназы, двух PRPP-синтеза и APR-трансферазы из *T. thermophilus*.

Ген QT17_05185, кодирующий РК из *Thermus* sp. 2.9, получен химико-ферментативным способом. Гены TT_RS05985, TT_RS06430, TT_RS06315, кодирующие *Tth*PRPPS1, *Tth*PRPPS2 и *Tth*APRT из *T. thermophilus* HB27, соответственно амплифицированы с геномной ДНК с помощью ПЦР. Все гены были клонированы в плазмидный вектор pET-23d+. Созданные в результате экспрессионные векторы pER-PRPPS1-Tth, pER-PRPPS2-Tth и pER-RK-Tsp содержали гибридные гены, объединяющие в одной рамке считывания последовательности, кодирующие ферменты и аффинную метку из шести остатков гистидина. Экспрессионный вектор pER-APRT1-Tth содержал немодифицированную последовательность, кодирующую *Tth*APRT.

Таблица 1. Стадии выделения и очистки рибокиназы, PRPP-синтетаз и APR-трансферазы

Стадия очистки	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Суммарный белок, мг
Рибокиназа из <i>Thermus</i> sp. 2.9			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	150*	8.3	1245
2. Термообработка	136	1.7	231.2
3. Металл-хелатная хроматография	30	1.9	57
4. Концентрирование	9	6	54
5. Гель-фильтрационная хроматография	28.5	1.28	36.4
6. Концентрирование	2.6	11.7	30.4
PRPP-синтетаза 1 из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	150**	10	1500
2. Аффинная хроматография	100	0.8	80
3. Концентрирование	13	5.7	74.1
4. Гель-фильтрация	50	1	50
5. Концентрирование	4	12.3	49.2
PRPP-синтетаза 2 из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	130**	11.2	1456
2. Аффинная хроматография	125	0.6	75
3. Концентрирование	10.3	6.2	63.9
4. Гель-фильтрация	37.5	1.2	45
5. Концентрирование	3.4	12	40.8
APR-трансфераза из <i>T. thermophilus</i> HB27			
1. Разрушение ультразвуковым дезинтегратором	157***	6	942
2. Термообработка	149	1.3	193.7
3. Гель-фильтрация	258	0.7	181
4. Анионообменная хроматография	72	1.2	86.4
5. Гидрофобная хроматография	73	0.8	58.4
6. Концентрирование	11	5	55
7. Гель-фильтрационная хроматография	52	0.87	45.2
8. Концентрирование	3.4	12.5	42.5

* Из 5.8 л культуры.

** Из 5 л культуры.

*** Из 6 л культуры.

Этими плазмидами трансформировали штаммы *E. coli* BL21(DE3), Rosetta(DE3) и C3029/pGTf2. Подбирали условия культивирования штаммов-продуцентов, при которых целевые ферменты синтезировались в растворимой форме. Продукенты растворимых рекомбинантных *TspRK* и *TthPRPPS2* получены на основе *E. coli* C3029/pGTf2. Этот штамм создан путем трансформации клеток *E. coli* C3029 плазмидным вектором pGTf2 (Takara Bio Inc.), несущим последовательности, кодирующие белки-шапероны GroES-GroEL-Tig под контролем промотора Pzt-1. Выбор штамма *E. coli* Rosetta(DE3) для биосинтеза *TthPRPPS1* обусловлен тем, что ген TT_RS05985, кодирующий *TthPRPPS1*, содержит редко используемые в *E. coli* кодоны (один AGA, девять AGG, 10 CGG, один AUA, один CUA и 15 CCC). В штамме Rosetta(DE) синтезируются tРНК для этих редких кодонов. Рекомбинантную *TthAPRT* в растворимой форме получали в штамме *E. coli* BL21(DE3).

Выделение и очистка рибокиназы и двух PRPP-синтетаз включали стадии металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографии (табл. 1). Термическая обработка клеточного лизата при выделении *TspRK* позволила значительно обогатить фракцию целевым белком за счет агрегации клеточных белков и ДНК. При выделении обеих *TthPRPPS* аналогичная обработка не давала положительных результатов, а приводила к потере целевого белка. В связи с высокой вероятностью протеолиза металл-хелатную хроматографию проводили при охлаждении, а к объединенным фракциям добавляли EDTA. После проведения последней стадии очистки с помощью гель-фильтрационной хроматографии все белковые препараты концентрировали.

Выделение и очистка *TthAPRT* включала стадии термической обработки, обессоливания, анионообменной, гидрофобной, гель-фильтрационной хроматографии и концентрирования (табл. 1).

Таблица 2. Кинетические параметры природных субстратов исследуемых ферментов

Субстрат	K_M , мкМ	K_I , мкМ	V_{max} , мкмоль/мин·мг	k_{cat} , 1/с	k_{cat}/K_M , 1/М·с
Рибокиназа из <i>Thermus</i> sp. 2.9					
АТФ	75 ± 11	–	13 ± 1	6.8 ± 0.7	9.1 × 10 ⁴
D-Рибоза	20 ± 6	1700 ± 400	13 ± 2	7.1 ± 1.2	3.5 × 10 ⁵
PRPP-синтетаза 1 из <i>T. thermophilus</i> HB27					
АТФ	10 ± 2	–	0.71 ± 0.05	0.41 ± 0.03	4.3 × 10 ⁴
D-Рибозо-5-фосфат	32 ± 6	–	0.85 ± 0.11	0.49 ± 0.06	1.5 × 10 ⁴
PRPP-синтетаза 2 из <i>T. thermophilus</i> HB27					
АТФ	12 ± 2	–	20 ± 2	11 ± 1	9.9 × 10 ⁵
D-Рибозо-5-фосфат	40 ± 4	–	24 ± 2	14 ± 1	3.4 × 10 ⁵
APR-трансфераза из <i>T. thermophilus</i> HB27					
Аденин	13 ± 2	–	6.0 ± 0.4	1.9 ± 0.1	1.4 × 10 ⁵
PRPP	179 ± 35	–	9.2 ± 1.1	2.9 ± 0.4	1.6 × 10 ⁴

Как и в случае *TspRK*, на первой стадии проводили термическую обработку осветленного клеточного лизата, но при этом в раствор добавляли соль (до 300 мМ хлорида натрия), что значительно ускоряло агрегацию примесных клеточных белков и ДНК.

При использовании разработанных методик выход всех рекомбинантных термофильных ферментов составил не менее 8–10 мг/л культуральной среды с электрофоретической чистотой не менее 95%.

Далее определяли кинетические параметры и оптимальные условия работы выделенных рекомбинантных ферментов.

Специфическую активность *TspRK* определяли радиохимическим методом по образованию D-рибофуранозо-5-[³²P]фосфата в присутствии [γ -³²P]АТФ. За единицы активности принимали количество продукта (мкмоль), образующееся за 1 мин. Активность *TspRK* составила 5.5 ед/мг.

Специфическую активность *TthPRPPS1* и *TthPRPPS2* определяли опосредованно по образованию АМР в реакционной смеси (по данным ВЭЖХ) в присутствии двух субстратов: АТФ и D-рибозо-5-фосфата. У первого фермента она составила 0.85 ед/мг, а у второго – 11 ед/мг. Учитывая большие различия в активности ферментов, более рациональным представляется использование для синтеза нуклеотидов второй синтетазы, учитывая более низкий расход белка. Свойства *TthAPRT* изучали на модельной реакции взаимодействия аденина с 5-фосфорибозил- α -1-пирофосфатом. Образование АМР наблюдали при помощи ВЭЖХ. Специфическая активность фермента составила 8.8 ед/мг.

При использовании в качестве субстрата рибозы в высокой концентрации обнаружено ингибирование

ферментативной активности *TspRK*. Данный эффект описан для рибокиназы человека [30]. Таким образом, результаты экспериментов с АТФ анализировали с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен $V = V_{max} \times S / (K_M + S)$. В опытах с D-рибозой использовали уравнение, учитывающее эффект ингибирования субстратом в результате связывания второй молекулы $V = V_{max} \times S / (K_M + S + S^2 / K_I)$.

Кинетические параметры природных субстратов ферментов приведены в табл. 2.

Результаты определения оптимальных условий работы рекомбинантных ферментов приведены на рис. 2–4.

Изученные ферменты активны в широком температурном диапазоне. Максимальная активность *TspRK* и *TthPRPPS1* наблюдалась при 85°C, тогда как активность *TthAPRT* при этой температуре снижалась на 35%. Поэтому было решено дальнейшие каскадные синтезы проводить при 75°C.

В отсутствие ионов магния в буферном растворе активность ферментов была очень низкой. При добавлении 0.25 мМ хлорида магния активность значительно увеличивается.

В области более высоких концентраций зависимость активности ферментов от концентрации ионов магния выглядит следующим образом: у *TspRK* и *TthPRPPS1* активность снижается, у *TthAPRT* повышается, в случае *TthPRPPS2* – резко повышается. Таким образом, каскадные реакции с участием *TthPRPPS1* целесообразно проводить при концентрации хлорида магния 0.25–0.5 мМ, а с участием *TthPRPPS2* – при 5 мМ.

Ферменты по-разному реагируют на добавление ортофосфата калия. Активность *TspRK* снижает-

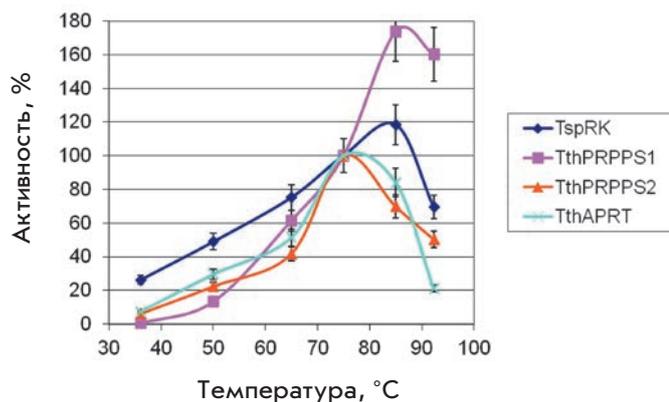


Рис. 2. Зависимость активности ферментов от температуры. Активность при 75°C принята за 100%. Реакции проводили при температуре от 36 до 92°C в смеси объемом 0.05 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 5 мМ MgCl_2 , 0.125 мкг *TthAPRT*

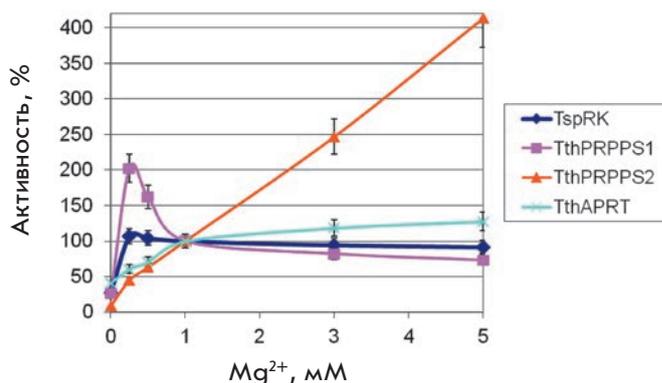


Рис. 3. Зависимость активности ферментов от концентрации ионов магния. Активность при 1 мМ Mg^{2+} принята за 100%. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, от 0 до 5 мМ MgCl_2), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 1 мМ KH_2PO_4 , 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 0.125 мкг *TthAPRT*

ся, *TthAPRT* – практически не меняется, у обеих *TthPRPPS* существенно повышается, причем в случае *TthPRPPS2* она начинает падать при концентрации свыше 25 мМ. Оптимальная концентрация для проведения каскадных реакций составляет 10–25 мМ.

Наиболее критичным оставался вопрос о субстратной специфичности каждого фермента по отношению к различным углеводам.

D-рибоза и 2-дезоксид-*D*-рибоза являются субстратами *TspRK* (рис. 5), при этом активность по дезоксисахару составляет 57% от активности в отношении *D*-рибозы. Активность в отношении *D*-арабинозы и *D*-ксилозы превышает фоновую в 2 раза, что может указывать на их использование в качестве субстратов, но значительно менее специфичных. Активность в отношении *D*-глюкозы и *D*-лихсозы не обнаружена.

Проверена активность обеих *TthPRPPS* в отношении 2'-дезоксид-АТФ, -ГТФ и 2'-дезоксид-ГТФ. Активность при использовании 2'-дезоксид-АТФ составила 80% от активности с АТФ. Активность в отношении ГТФ и 2'-дезоксид-ГТФ не обнаружена (данные не приведены). Можно предположить, что эти *TthPRPPS* относятся к ферментам первого типа [31]. Все реакции проводили в тех же условиях, в которых определяли активность, менялся лишь добавляемый субстрат. Оба фермента способны катализировать реакцию с *D*-арабинозо-5-фосфатом (рис. 6). При этом активность в отношении 2-дезоксид-*D*-рибозо-5-

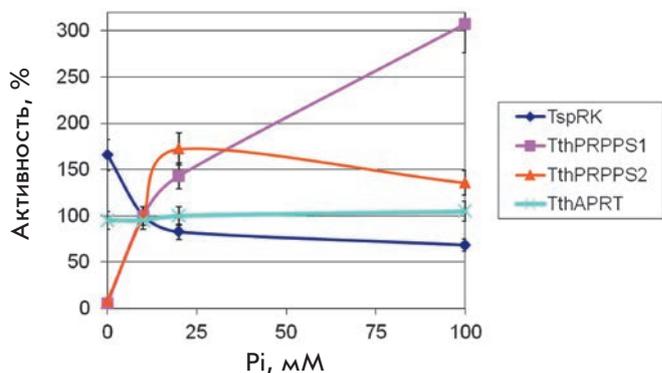


Рис. 4. Зависимость активности ферментов от концентрации неорганического фосфата. Активность при 10 мМ P_i принята за 100%. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, 5 мМ MgCl_2 , pH 8.0, от 0 до 100 мМ KH_2PO_4), содержащей: 1) 0.4 мМ АТФ, 1 мМ рибозы, 50 мМ КСl, 0.15 мкг *TspRK*; 2) 1 мМ АТФ, 1 мМ *D*-рибозо-5-фосфата, 0.75 мкг *TthPRPPS1* или *TthPRPPS2*; 3) 1 мМ аденина, 1 мМ PRPP, 0.125 мкг *TthAPRT*

фосфата не обнаружена, что говорит о важности гидроксильной группы по второму положению углевода для осуществления ферментативной реакции.

С целью определения возможности использования различных гетероциклических оснований для синтеза нуклеотидов проведено несколько реакций.

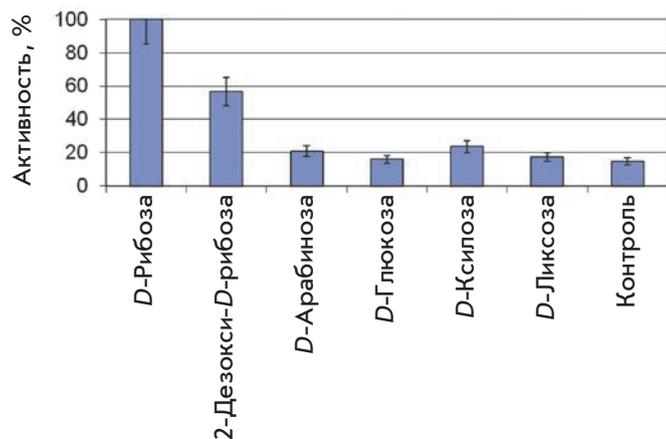


Рис. 5. Ферментативная активность рибокиназы в присутствии различных углеводов. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.05 мл (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0), содержащей 0.4 мМ АТФ, 1 мМ углевода (контрольная реакция без углевода), 1 мМ KH_2PO_4 , 5 мМ MgCl_2 , 50 мМ KCl , 0.15 мкг RK

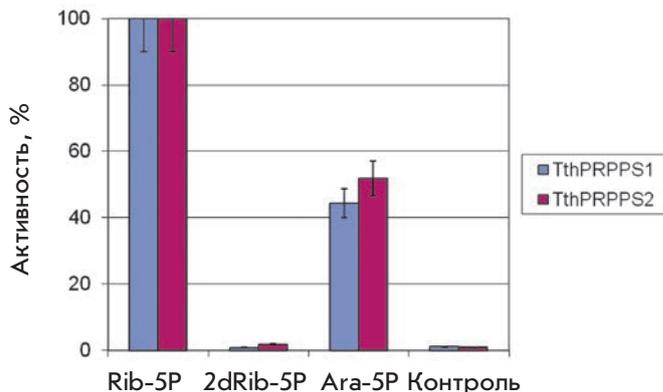


Рис. 6. Субстратная специфичность PRPP-синтетаз в отношении различных 5-фосфатов углеводов. Реакции проводили при температуре 75°C в смеси объемом 0.5 мл (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0), содержащей 1 мМ АТФ, 1 мМ 5-фосфата углевода (контрольная реакция без углевода), 5 мМ MgCl_2 , 10 мМ KH_2PO_4 , 0.75 мкг PRPPS. Rib – D-рибоза, 2dRib – 2-дезоксид-рибоза, Ara – D-арабиноза

Таблица 3. Субстраты APR-трансферазы

Основание	Конверсия за 24 ч, %	MS продукта, $[M+H]^+$
2,6-Диаминопурин	16.8	363.0786 (расч. 363.0813)
2-Хлораденин	97.6	382.0257 (расч. 382.0314)
2-Фтораденин	36.5	366.0564 (расч. 366.0611)
Аденин	50.0	348.0677 (расч. 348.0704)
2-Метоксиаденин	60.9	378.0812 (расч. 378.0809)
N1-Метиладенин	78.2	362.0843 (расч. 362.0800)
N6-Бензиладенин	1.9	438.1117 (расч. 438.1173)
2-Аминобензимидазол	0.1	346.0796 (расч. 346.0799)
1,2,4-Триазол-3-карбокси-N-метиламид	0	–
Гуанин	0	–
Гипоксантин	0	–
7-Дезаза-2,6-диаминопурин	0	–

Примечание. Условия реакций: реакционные смеси (0.5 мл; 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 75°C) содержали 0.4 мМ гетероциклического основания, 0.4 мМ PRPP, от 0 до 5 мМ MgCl_2 , 1.25 мкг *Tth*APRT.

Данные по синтезу нуклеотидов с помощью *Tth*APRT приведены в табл. 3.

Из приведенных в табл. 3 данных очевидно, что *Tth*APRT специфична в отношении 6-аминопуринов. Хорошими субстратами оказались 2-хлораденин, N1-метиладенин, 2-метоксиаденин. Не обнаружено ферментативной активности в реакциях с гипоксантином, гуанином, N6-бензиладенином, аминобензимидазолом и 1,2,4-триазол-3-карбокси-N-метиламидом. В реакциях с 2-хлораденином равновесие оказалось сильно смещено в сторону образования нуклеотида (98% через 1 сут). Реакцию

проводили при 75°C, что в случае 2-хлораденина предпочтительней, ввиду его плохой растворимости. 2,6-Диаминопурин также оказался субстратом, в то время как в реакции с его 7-дезазааналогом образования продукта не наблюдалось, что говорит о необходимости атома азота в седьмом положении пурина.

После определения субстратной специфичности *Tth*APRT осуществлен каскадный синтез 2Cl-AMP и 2F-AMP из соответствующих гетероциклических оснований и D-рибозы. Результаты представлены на рис. 7. Процесс каскадного синтеза нуклеотидов

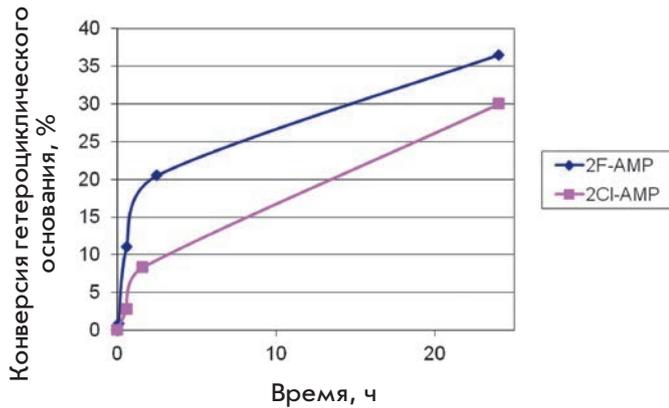


Рис. 7. Каскадный синтез 2Cl-AMP и 2F-AMP из соответствующих гетероциклических оснований и *D*-рибозы. Реакционные смеси объемом 250 мкл содержали: 0.5 мМ *D*-рибозы, 1 мМ АТФ, 0.4 мМ гетероциклического основания (2-хлор- или 2-фтор-аденина), 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ КСl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ КН₂РO₄, 75°С, 0.3 мкг *Tsp*РK, 1.1 мкг *Tth*РRРS1, 0.25 мкг *Tth*АРТ

контролировали с помощью хроматомасс-спектрометрического анализа реакционной смеси, пробы отбирали через 1, 2, 24 ч от начала процесса. На *рис. 8* приведены масс-спектры целевых продуктов.

Таким образом, на примере получения 2-хлор-(фтор)-аденозинмонофосфата (2Cl-AMP и 2F-AMP) показана возможность использования системы термофильных ферментов для получения биологически активных нуклеотидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования полиферментативного каскада термофильных ферментов нуклеинового обмена – рибокиназы, фосфорибозилпирофосфатсинтетазы и аденин-фосфорибозилтрансферазы для получения модифицированных нуклеотидов. Применение данного подхода создает предпосылки для замены химических методов получения нуклеотидов биокалалитическими. ●

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду (РНФ проект № 14-50-00131) за финансовую поддержку работы.

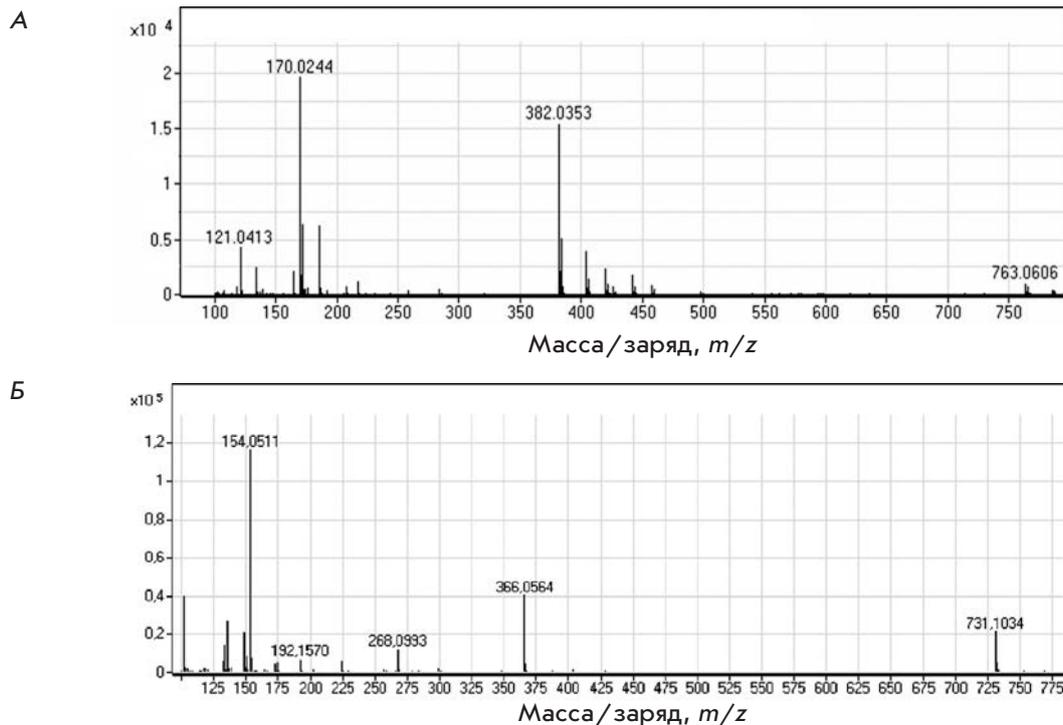


Рис. 8. Масс-спектр продукта каскадного синтеза нуклеотида – 2Cl-AMP, C₁₀H₁₃N₅O₇P₁Cl₁, [M + H]⁺ = 382.0328, [M-P-Rib]⁺ = 170.0230 (A) и 2F-AMP, C₁₀H₁₃N₅O₇P₁F₁, [M + H]⁺ = 366.0564, [M-P-Rib]⁺ = 154.0511 (B)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson D.L., Cox M.M. Nucleotides and Nucleic Acids. Lehniger Principles of Biochemistry, 3rd ed. N.Y.: Worth Publ., 2000. 1255 c.
2. Bruce A. Molecular Biology of the Cell. N. Y.: Garland Publ., 2000. 974 c.
3. Schärer O.D. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 2003. V. 42. № 26. P. 2946–2974.
4. Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontel C. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. № 6. P. 447–464.
5. De Clercq E. // *Rev. Med. Virol.* 2009. V. 19. № 5. P. 287–299.
6. Diop-Frimpong B., Prakash T.P., Rajeev K.G., Manoharan M., Egli M. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 16. P. 5297–5307.
7. Famulok M., Hartig J.S., Mayer G. // *J. Chem. Rev.* 2007. V. 107. № 9. P. 3715–3743.
8. Peng C.G., Damha M.J. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 15. P. 4977–4988.
9. Golden J., Motea E., Zhang X., Choi J.S., Feng Y., Xu Y., Lee I., Berdis A.J. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 11. P. 2452–2465.
10. Lakshman M.K. Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. 684 c.
11. De Clercq E. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011. V. 51. P. 1–24.
12. Cen Y., Sauve A.A. // *Nucleos. Nucleotides. Nucleic Acids* 2010. V. 29. № 2. P. 113–122.
13. Mikhailopulo I.A., Miroshnikov A.I. // *Mendeleev Commun.* 2011. V. 21. P. 57–68.
14. Vineyard D., Zhang X., Donnelly A., Lee I., Berdis A.J. // *Org. Biomol. Chem.* 2007. V. 5. № 22. P. 3623–3630.
15. Stein C.A., Cheng Y.C. // *Science.* 1993. V. 261. № 5124. P. 1004–1012.
16. Motea E.A., Lee I., Berdis A.J. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 5. P. 2357–2367.
17. Mikhailopulo I.A. // *Curr. Org. Chem.* 2007. V. 11. № 4. P. 317–335.
18. Wintersberger E. // *Biochem. Soc. Trans.* 1997. V. 25. № 1. P. 303–308.
19. Tesmer J.J., Klem T.J., Deras M.L., Davisson V.J., Smith J.L. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. № 1. P. 74–86.
20. Kim M.-J., Whitesides G.M. // *Appl. Biochem. Biotech.* 1987. V. 1. № 6. P. 95–108.
21. Scism R.A., Stec D.F., Bachmann B.O. // *Org. Lett.* 2007. V. 9. № 21. P. 4179–4182.
22. Scism R.A., Bachmann B.O. // *ChemBioChem.* 2010. V. 11. № 1. P. 67–70.
23. Nagy M., Ribet A.M. // *Eur. J. Biochem.* 1977. V. 77. № 1. P. 77–85.
24. Lee D., Moffatt B.A. // *Physiologia Plantarum.* 1993. V. 87. № 4. P. 483–492.
25. Zhou X., Mikhailopulo I.A., Cruz-Bournazou N., Neubauer P. // *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 2015. V. 115. P. 119–127.
26. Zhou X., Szeker K., Jiao L.-Y., Oestreich M., Mikhailopulo I.A., Neubauer P. // *Adv. Synthesis & Catalysis.* 2015. V. 357. № 6. P. 1237–1244.
27. Taran S.A., Verevkina K.N., Feofanov S.A., Miroshnikov A.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2009. V. 35. № 6. P. 739–745.
28. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
29. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
30. Park J., van Koeverden P., Singh B., Gupta R.S. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. № 17. P. 3211–3216.
31. Kadziola A., Jepsen C.H., Johansson E., McGuire J., Larsen S., Hove-Jensen B. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 354. № 4. P. 815–828.

УДК 576.32

Влияние модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов на активность клеток Пуркинье мозжечка крыс

Т. В. Карелина*, Ю. Д. Степаненко, П. А. Абушик, Д. А. Сибаров, С. М. Антонов
 Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44
 *E-mail: karelina_tanja@mail.ru
 Поступила в редакцию 20.01.2016
 Принята к печати 30.05.2016

РЕФЕРАТ Кальций-активируемые калиевые каналы малой проводимости (SK) широко распространены в тканях ЦНС, однако мало исследованы. Их участие в регулировании пейсмейкерной активности клеток Пуркинье (КП) мозжечка выявлено преимущественно в экспериментах *in vitro*. В опытах *in vivo* на крысах линии Вистар с помощью метода внеклеточной микроэлектродной регистрации нейронной активности мы впервые оценили возрастные особенности изменения частоты простых спайков КП мозжечка при активации SK-каналов веществами NS309 и СуРРА у взрослых (3–6 мес.) и старых (22–28 мес.) животных. Оба вещества вызывали статистически значимое уменьшение частоты простых спайков КП. Максимальная величина снижения частоты простых спайков не зависела от возраста, однако ее значимое отличие от контроля при действии положительных модуляторов SK-каналов достигалось быстрее у старых животных. Регистрация трансмембранных токов в нейронах мозжечка *in vitro* показала, что NS309 и СуРРА действуют непосредственно на SK-каналы клеток Пуркинье, идентифицированных по экспрессии маркера КП – белка кальбиндина, вызывают дополнительный выход калия из КП и усиливают следовую гиперполяризацию потенциала действия. Применение активаторов SK-каналов, возможно, позволит компенсировать возрастные изменения авторитмических функций мозжечка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА клетки Пуркинье, мозжечок, SK-каналы, старение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ КП – клетки Пуркинье; кальбиндин – кальбиндин-D28k; СуРРА – N-циклогексил-N-[2-(3,5-диметилпиразол-1-ил)-6-метил-4-пиримидинамин]; NS309 – 6,7-дихлор-1H-индол-2,3-дикетон-3-оксим; SK-каналы – Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы малой проводимости; VGCC – потенциал-чувствительные кальциевые каналы.

ВВЕДЕНИЕ

Мозжечок является важным отделом ЦНС в силу многообразия выполняемых им функций. Осуществляя мониторинг всех двигательных актов и минимизируя ошибку между задуманным и совершенным действием, мозжечок играет ключевую роль в моторной активности [1]. Одно из проявлений дисфункции мозжечка – спиналомозжечковая атаксия – нарушение точности и координации произвольных движений, развитие которой часто связано с гибелью или дисфункцией клеток Пуркинье (КП). При этом дисфункция, выражающаяся в изменении паттерна активности КП, может наступать раньше нарушений двигательной активности. Например, у мышей с генетически обусловленной наследственной спиналомозжечковой атаксией типа 2 двигательная активность начинала ухудшаться с 8 недели, число

КП уменьшалось с 12 недели, тогда как снижение частоты разряда КП было зафиксировано уже на 6 неделе постнатального развития [2]. В исследованиях, выполненных на срезах мозжечка мышей и крыс, установлено, что при таких нейродегенеративных заболеваниях, как спиналомозжечковые атаксии типа 2 и 3, а также при эпизодической атаксии типа 2 изменяется пейсмейкерная активность КП [3–5].

Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы экспрессируются многими нейронами ЦНС и представлены тремя типами – каналами большой (BK), малой (SK) и промежуточной (IK) проводимости [6]. SK-каналы – потенциал-независимые каналы, которые напрямую активируются только субмикромольными концентрациями Ca²⁺ [7], усиливая в нейронах следовую гиперполяризацию [6]. КП характеризуются выраженной экспрессией Ca²⁺-активируемых K⁺-каналов

малой проводимости подтипа SK2 [8]. Блокирование SK2-каналов апамином в КП, обладающих тримодальным паттерном активности, вызывает укорочение его циклов, а в клетках с тоническим типом разряда приводит к увеличению частоты и появлению взрывного типа разряда [9].

Ранее нами было установлено, что при нормальном старении в КП возрастает частота простых спайков и укорачивается время депрессии после сложного спайка [10, 11]. Аналогичное возрастное увеличение частоты разрядов КП показано в исследовании Kasumi и соавт. у мутантных мышей с моделью спинозжечковой атаксии типа 2 [12].

Практически все работы по изучению SK-каналов в КП мозжечка выполнены в условиях *in vitro*. Однако в этом случае нарушается целостность самой структуры мозжечка, а также афферентных и межнейронных связей. Многочисленные работы, посвященные генетически предопределенным патологиям мозжечка, выполнены, главным образом, на молодых и взрослых животных. Сведения же об изменениях функций КП у старых животных при нормальном старении крайне бедны. Поэтому важным представляется сравнительное изучение особенностей функционирования КП *in vivo* в позднем онтогенезе. Учитывая непосредственное участие SK-каналов в регулировании паттерна активности КП мозжечка и его изменении в ходе старения, а также вклад SK-каналов в развитие различных нейродегенеративных заболеваний, цель данной работы состояла в сравнительном изучении вклада SK-каналов в паттерн активности КП у взрослых и старых крыс.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Внеклеточная регистрация активности КП мозжечка *in vivo*

Исследование проводили на самцах и самках крыс линии Вистар. При проведении эксперимента животные были разделены на две группы: взрослые (от 3 до 6 мес.) и старые (от 21 до 24 мес.). Для наркотизации животных использовали уретан, который вводили внутривентриально из расчета 1300 и 1000 мг/кг веса взрослых и старых крыс соответственно. КП регистрировали и идентифицировали по ранее описанной методике [13]. У наркотизированного животного удаляли скальп, снимали мышечный слой и сверлили отверстие диаметром 1 мм в затылочной кости над червем мозжечка. Затем животное закрепляли в стереотаксической установке. Для регистрации внеклеточной активности КП использовали стеклянные микроэлектроды из боросиликатного стекла (внешний диаметр 1.5 мм, внутренний – 1.10 мм, Sutter Instrument, США), заполненные

раствором 2.5 М NaCl. Микроэлектрод погружали в ткань мозжечка с помощью автоматического манипулятора с шагом погружения 5 мкм на глубину до 5 мм. КП идентифицировали по характерному для них паттерну активности: наличию простых и сложных спайков, а также тормозной паузы после сложного спайка перед серией простых. Сигнал от регистрируемой клетки усиливали (AC/DC Differential Amplifier, model 3000, A-M Systems, Inc, США) и оцифровывали с частотой дискретизации 10000 изм./с (АЦП L-791, ЗАО «Л-КАРД», Россия) в оригинальной программе Bioactivity Recorder v.5.3, разработанной Д.А. Сибаровым [http://sibarov.ru/index.php?slab=software] для последующего анализа частоты простых спайков в программе Clampfit 10.2 (Molecular Devices Corp., США). Действующие вещества подавали согласно стандартной методике [14] путем их аппликации на обнаженную поверхность мозжечка в области введения микроэлектрода. Сначала была проведена контрольная серия опытов, в которой осуществляли аппликацию физиологического раствора (0.9% NaCl). Затем, в следующих сериях опытов, использовали позитивный модулятор SK- и IK-каналов – NS309 (Tocris, США), а также селективный активатор кальций-активируемых калиевых каналов малой проводимости подтипов SK2 и SK3 – СуРРА (Tocris, США) (рис. 1). Концентрации действующих веществ, подобранные в зависимости от глубины погружения микроэлектрода, составляли 100–200 мкМ для NS309 и 1–2 мМ для СуРРА. Растворы действующих веществ готовили на 0.9% NaCl. Запись активности КП осуществляли в течение 30 с до аппликации вещества, а затем периодами такой же длительности через 5, 15, 30, 45 и 60 мин после аппликации.

С целью сравнения контрольных данных с экспериментальными определяли частоту простых спайков в каждой клетке в течение 30 с по всем указанным временным отметкам. Затем высчитывали

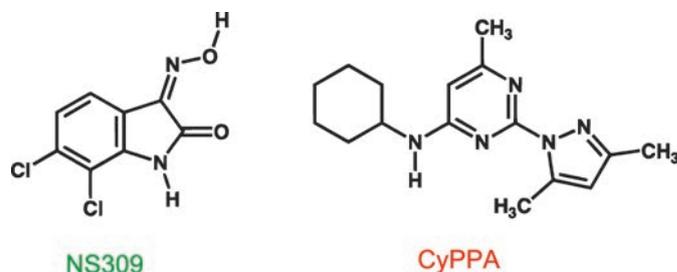


Рис. 1. Химическая структура активаторов или аллостерических модуляторов SK-каналов, увеличивающих их чувствительность к кальцию

относительные частоты для каждой временной отметки, приняв за единицу частоту спайков до аппликации. Для каждой временной отметки рассчитывали среднее значение частоты и стандартную ошибку среднего (SEM). При оценке статистической значимости различий контрольных данных с экспериментальными, т.е. при действии положительных модуляторов, использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с применением пост-теста Бонферрони. В контрольных сериях экспериментов для сравнения исходной частоты со средними значениями в каждой временной точке использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA).

Приготовление первичной культуры нейронов мозжечка

В первичной культуре нейронов, выделенных из различных отделов эмбрионального мозга, в частности коры больших полушарий [15] и мозжечка [16], происходит дифференцировка основных типов нейронов, характерных для этих отделов во взрослом мозге. Например, первичную культуру нейронов мозжечка ранее успешно применяли для изучения свойств клеток Пуркинью [17]. Первичную культуру получали из мозжечков эмбрионов на 20–21 день пренатального развития (E20–E21). С целью получения суспензии клеток мозжечка выделенную ткань помещали в раствор трипсина (0.04 мг/мл), а затем клетки обрабатывали раствором ДНКазы (0.04 мг/мл), ингибитором трипсина и фетальной сывороткой крупного рогатого скота. После центрифугирования производили диссоциацию клеток путем пипетирования в питательной среде. Диспергированные клетки культивировали на обработанных поли-*D*-лизином 7-мм стеклах в среде Neurobasal (Gibco, США) с добавлением B27 (Gibco, США), *L*-глутамин (Gibco, США) и 20 мМ KCl для увеличения выживаемости нейронов мозжечка, в том числе клеток Пуркинью и зернистых нейронов [18].

Регистрация нейронных токов методом локальной фиксации потенциала

Непосредственное действие модуляторов SK-каналов на нейроны в первичной культуре нейронов мозжечка подтверждали с использованием метода локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» в режиме фиксации тока для записи формы потенциала действия и в режиме фиксации напряжения для получения вольт-амперных характеристик SK-каналов.

Эксперименты на клетках культуры мозжечка проводили на 7–8 день *in vitro* (DIV 7–8). В опытах использовали внеклеточный физиологический рас-

твор следующего состава: 140 мМ NaCl, 2.8 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 10 мМ HEPES. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода имел следующий состав (мМ): 9 NaCl, 17.5 KCl, 121.5 К-глюконат, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 MgATP, 0.5 NaGTP. Для регистрации токов применяли усилитель MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Частота дискретизации составляла 20000 изм./с. Исходный регистрируемый сигнал подвергали предварительной аналоговой фильтрации (эквивалент ВЧ-фильтра Бесселя 8-го порядка) с частотой среза 200 Гц. Для аппликации тестовых веществ (100 мкМ СуРРА или 10 мкМ NS309) использовали систему быстрой смены растворов на базе BPS-4 (Ala Scientific Instruments, США) с многоканальным перфузионным капилляром, кончик которого располагали в 200–300 мкм от регистрируемой клетки. КП идентифицировали по размеру сомы, существенно большему, чем у нейронов других типов (приблизительно в 4 раза), и ритмической генерации потенциалов действия.

Вольт-амперные характеристики каналов, активируемых СуРРА и NS309, определяли из разности токов нейрона, записанных при приложении «рампа» – плавного изменения потенциала от –100 до +60 мВ за 5 с до и после аппликации веществ. Статистическую значимость изменений следовой гиперполяризации спайков при действии положительных модуляторов SK- и IK-каналов оценивали с использованием непарного *t*-критерия Стьюдента.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Пуркинью

Присутствие КП в первичной культуре клеток мозжечка крыс дополнительно контролировали с помощью иммуноцитохимического анализа экспрессии белка кальбиндина, маркера нейронов данного типа [19]. При подготовке к иммуноцитохимическому окрашиванию стекла с клетками фиксировали 4% раствором формальдегида, после чего обрабатывали хлористым аммонием (0.535 мг/мл), Тритоном X-100 (0.2% раствор) и глицином (15 мг/мл). Неспецифическое связывание антител блокировали, обрабатывая стекла с клетками 2% раствором бычьего сывороточного альбумина. Все растворы готовили на фосфатно-солевом буфере. Для идентификации кальбиндина КП использовали первичные моноклональные антитела мышей к этому белку (Calbindin-D28k, Abcam, ab82812). Иммунопозитивную реакцию визуализировали с использованием вторичных антител, конъюгированных с флуорохромом Alexa 633 (Molecular Probes A21052, Life Technologies, США). Во избежание быстрого выгорания флуорес-

центных красителей стекла, обработанные антителими, фиксировали на предметных стеклах клеем, содержащим соединение Mowiol (Sigma-Aldrich, Германия). Флуоресценцию иммунопозитивных нейронов регистрировали на конфокальном сканирующем микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems Inc., Германия), оснащенном иммерсионным объективом $\times 63$ (HCX APO CS $63\times/1.4$; Leica Microsystems, Inc., Германия). Возбуждение красителя Alexa 633 проводили аргоновым лазером с длиной волны 633 нм. Диапазон эмиссии красителя составлял 640–700 нм. Обработку изображений проводили с помощью программного обеспечения Leica LAS AF (Leica Microsystems Inc., Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние положительных модуляторов SK-каналов на частоту простых спайков КП у старых крыс

В нашей работе при регистрации потенциалов действия КП *in vivo*, в отличие от экспериментов, выполненных на срезах, сохранялись все афферентные связи КП, что обуславливало нерегулярность межимпульсных интервалов. Примеры характерной активности КП у старых животных показаны в контроле и при действии NS309, а также в контроле и при действии СуРРА (рис. 2А). Аппликация физиологического раствора не вызывала значимых изменений частоты простых спайков КП у старых животных в течение 60 мин (от 15 до 43 Гц в начале и от 16 до 48 Гц в конце, $p > 0.95$, $n = 7$, ANOVA). Повышение среднего значения относительной частоты простых спайков в отдельные периоды регистрации составило 0–3% и было наибольшим через 30 мин после аппликации (рис. 2Б). Эти результаты отчетливо показывают, что процедура аппликации не влияла на картину разряда КП.

NS309 вызывал постепенное снижение частоты простых спайков в разряде КП. Через 15 мин после аппликации выявлены значимые отличия в частоте от контроля в соответствующей временной точке ($p < 0.05$, $n = 10$, ANOVA, пост-тест Бонферрони), которые сохранялись до конца периода регистрации. Наименьшее значение частота простых спайков достигала через 60 мин от начала аппликации и была в среднем на 29% ниже контрольного значения в это же время (рис. 2Б).

При действии СуРРА статистически значимое снижение частоты простых спайков в разряде КП ($p < 0.001$, $n = 11$, ANOVA, пост-тест Бонферрони) наступало через 30 мин после начала регистрации, т.е. позднее, чем в случае NS309, а максимальное снижение в конце регистрации составило в среднем 21% (рис. 2Б).

Влияние положительных модуляторов SK-каналов на частоту простых спайков КП у взрослых крыс

На рис. 2В показаны примеры характерной активности КП взрослых животных в контроле и при действии NS309, а также в контроле и при действии СуРРА. В этой возрастной группе при аппликации физиологического раствора наблюдалась тенденция некоторого повышения частоты простых спайков, однако эти изменения не были статистически значимыми ($p > 0.10$, $n = 8$, ANOVA).

У взрослых животных снижение частоты простых спайков в разряде КП достигалось через 45 мин после начала аппликации NS309 ($p < 0.001$, $n = 9$, ANOVA, пост-тест Бонферрони), т.е. позднее, чем у старых. Максимальное снижение, в среднем на 33%, происходило к концу 60 мин регистрации (рис. 2Г).

При аппликации СуРРА, как и NS309, статистически значимое снижение частоты простых спайков в разряде КП достигалось через 45 мин после начала ($p < 0.001$, $n = 8$, ANOVA, пост-тест Бонферрони). Максимальным снижением было через 60 мин (в среднем на 36%) (рис. 2Г).

Несмотря на то что значимое уменьшение частоты простых спайков при действии обоих положительных модуляторов SK-каналов по сравнению с контролем у старых крыс достигалось раньше, максимальный эффект СуРРА ($n = 11$) и NS309 ($n = 10$) не различался у животных разных возрастов. Кроме того, не удалось выявить статистически значимых отличий эффектов СуРРА и NS309 у старых и взрослых крыс ($p > 0.8$, ANOVA).

Электрическая активность нейронов мозжечка в культуре при действии модуляторов SK-каналов

Клетки мозжечка в первичной культуре на 7 день культивирования образовывали нейронную сеть, в которой иммуногистохимическое окрашивание на кальбиндин-D28k подтвердило присутствие клеток Пуркинью, выделяющихся крупными размерами сомы (рис. 3). При электрофизиологическом исследовании часть «крупных» нейронов характеризовалась спонтанной периодической генерацией потенциала действия (ПД), типичной для клеток Пуркинью.

Из экспериментов *in vivo* невозможно однозначно заключить, действуют ли исследуемые модуляторы непосредственно на КП, или их эффект опосредован сетевыми взаимодействиями через влияние на вставочные нейроны. С целью проверки предположения о непосредственном действии СуРРА и NS309 на нейроны мозжечка изучили их влияние на генерацию спайков нейронами в первичной культуре, используя локальную перфузию. В нейронах со спонтанной генерацией ПД (рис. 4А) аппликация 10 мкМ

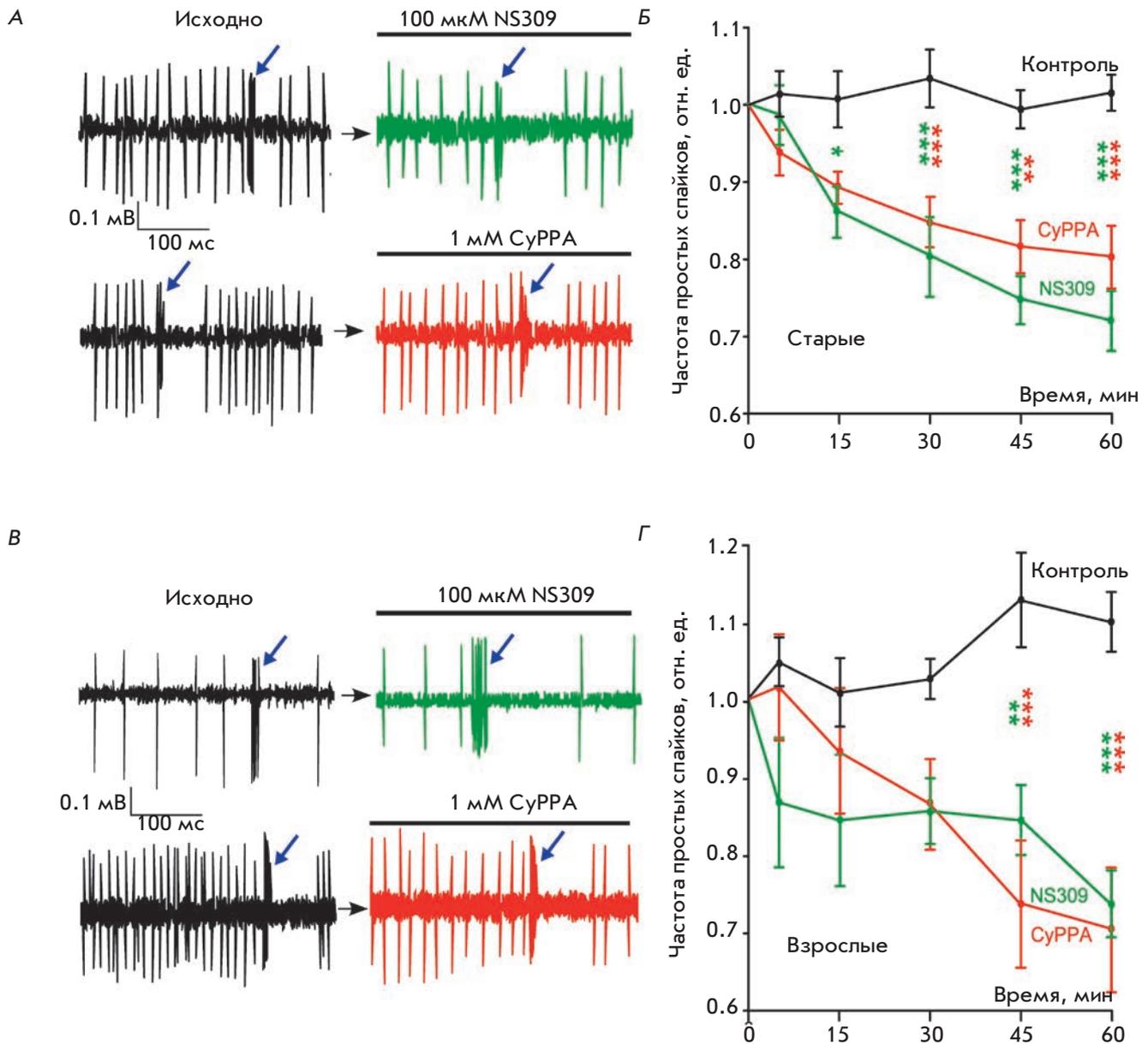


Рис. 2. Активность клеток Пуркинье мозжечка крыс под влиянием положительных модуляторов кальций-активируемых калиевых каналов. **А** – старые крысы. Фрагменты записи активности отдельных КП до и после аппликации NS309 или CyPPA. Стрелками обозначены эпизоды появления сложных спайков. **Б** – старые крысы. Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч после аппликации физиологического раствора или активаторов SK-каналов. **В** – взрослые крысы. Фрагменты записи активности отдельных КП до и после аппликации NS309 или CyPPA. **Г** – взрослые крысы. Изменение средней частоты простых спайков КП мозжечка в течение 1 ч после аппликации физиологического раствора или активаторов SK-каналов. Зелеными звездочками показано статистически значимое отличие от контрольных значений частоты в соответствующие моменты времени при аппликации NS309, красными – CyPPA (ANOVA, пост-тест Бонферрони * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$)

CyPPA вызывала кратковременную деполяризацию с последующей гиперполяризацией, сопровождающейся затуханием спонтанной генерации ПД ($n = 5$). На нейронах, не обладающих спонтанной активностью, генерация спайков, вызываемая инъекцией

тока пороговой амплитуды, эффективно подавлялась аппликацией как 100 мкМ CyPPA, так и 10 мкМ NS309 ($n = 18$, рис. 4Б). Оба вещества вызывали гиперполяризацию, но эффект NS309 был более выражен. Сравнение формы ПД спонтанно активных

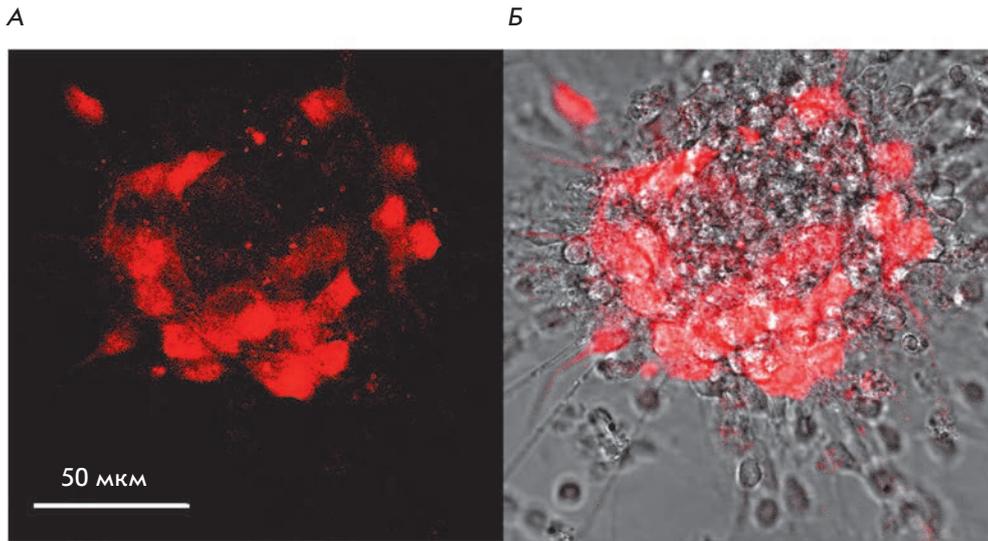


Рис. 3. Клетки Пуркинье в первичной культуре нейронов мозжечка крыс DIV 7. А – флуоресцентное изображение иммунопозитивной реакции на белок кальбиндин, экспрессирующийся только в клетках Пуркинье. Б – результат совмещения изображения в проходящем свете и флуоресценции белка кальбиндин-D28k, полученной с помощью иммунного маркирования соответствующего белка антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa 633

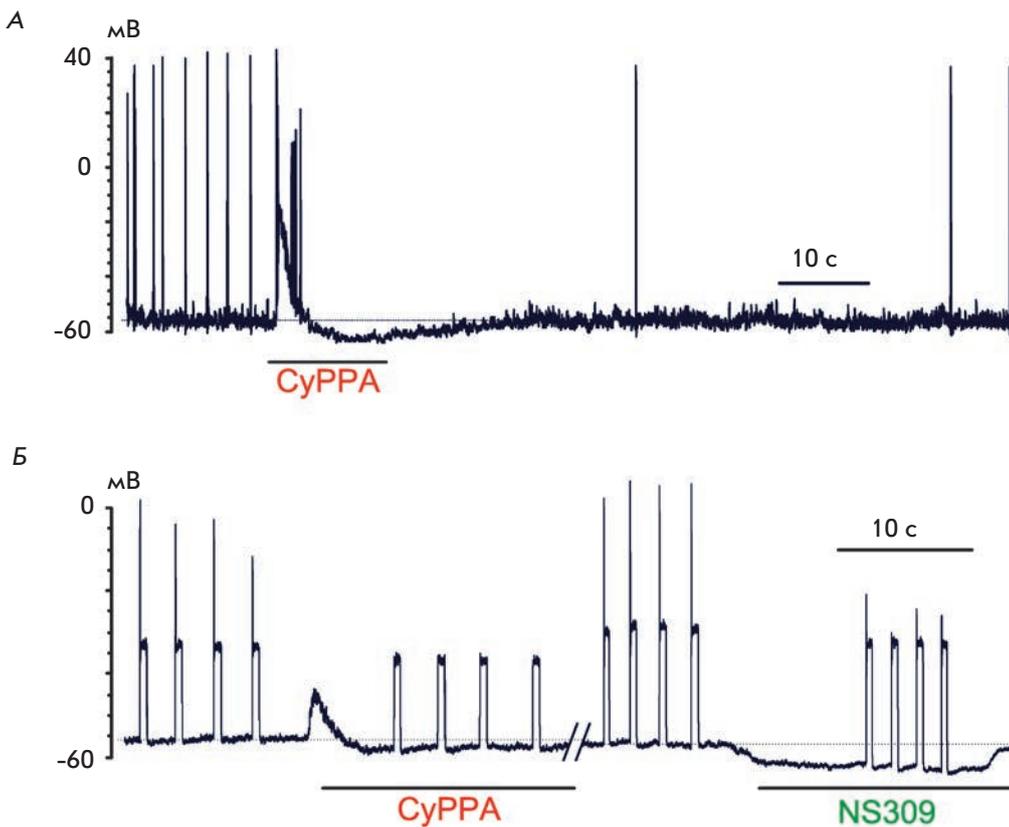


Рис. 4. Примеры влияния CyPPA и NS309 на спонтанную генерацию (А) и вызванные деполяризующим стимулом (Б) потенциалы действия в нейронах мозжечка. Внутриклеточная регистрация мембранного потенциала при фиксации тока нейрона. Потенциалы действия вызывали инъекцией тока (1.1 пороговой величины) через регистрирующий электрод

нейронов до и после аппликации активаторов калиевых каналов показало, что оба вещества усиливают следовую гиперполяризацию ПД (рис. 5А). Подобная феноменология типична для активации SK-каналов. При этом следовая гиперполяризация в точке минимума усиливалась на 3.1 ± 0.3 мВ при действии CyPPA и на 6.1 ± 0.3 мВ при действии NS309. Эффект NS309 был значимо больше, чем у CyPPA ($n = 140$;

$p < 0.01$, непарный t -критерий Стьюдента). Вольтамперные характеристики каналов, активируемых CyPPA и NS309, представленные на рис. 5Б, также типичны для SK-каналов [20].

Таким образом, CyPPA и NS309 сходным образом подавляют генерацию ПД клетками Пуркинье как *in vivo*, при аппликации на поверхность мозжечка, так и *in vitro*, в первичной культуре нейронов.

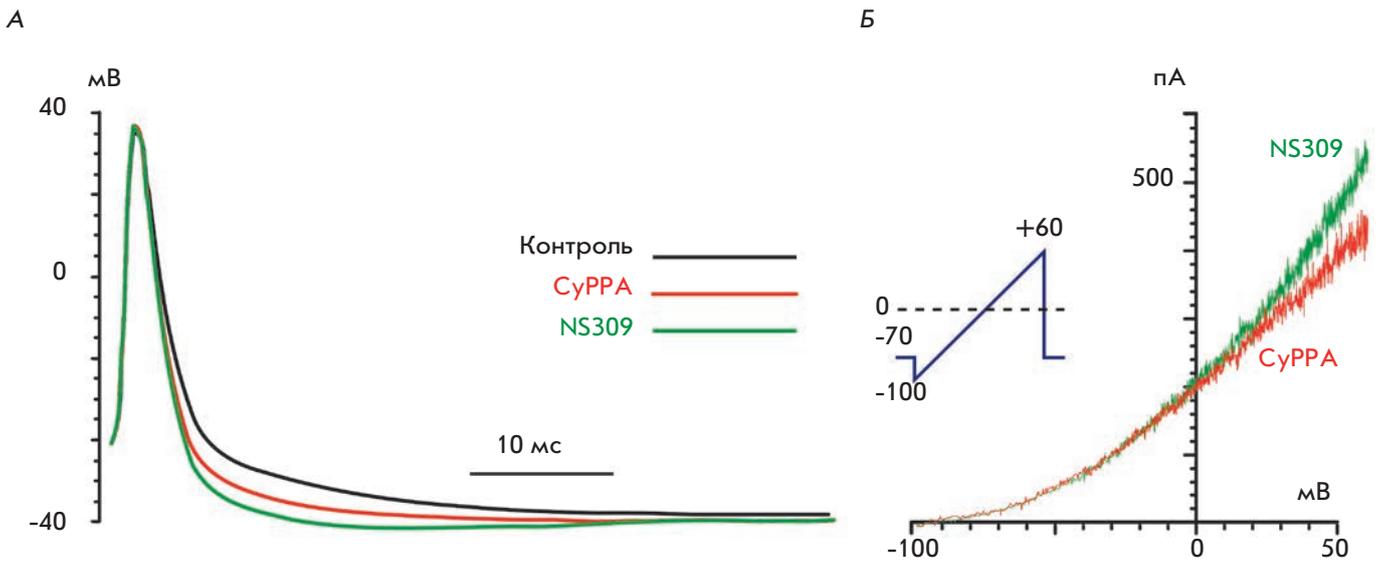


Рис. 5. Влияние CyPPA и NS309 на следовую гиперполяризацию в нейронах мозжечка. А – усредненные потенциалы действия в контроле и в присутствии 100 мкМ CyPPA или 10 мкМ NS309 (для каждого из условий усреднено не менее 140 ПД), зарегистрированные при фиксации тока нейрона. Б – вольт-амперные характеристики каналов, активируемых CyPPA и NS309 в нейронах мозжечка, зарегистрированные при фиксации потенциала нейрона. Вставка иллюстрирует протокол «рампа», использованный для измерения вольт-амперных характеристик SK-каналов

ОБСУЖДЕНИЕ

Существуют данные, указывающие на то, что NS309 и CyPPA, положительные модуляторы SK-каналов, изменяют паттерн активности нейронов. В опытах, выполненных на срезах мозжечка, показано снижение частоты разряда КП после подачи NS309 в ванночку с омывающим раствором [3]. Сходные результаты получены в опытах *in vivo*, которые показали, что применение NS309 и CyPPA вызывает снижение частоты разряда дофаминергических нейронов черной субстанции [21, 22]. В наших экспериментах, проведенных *in vitro* на первичной культуре нейронов мозжечка, CyPPA и NS309 также эффективно подавляли генерацию спонтанных и вызванных спайков (рис. 4А,Б) за счет усиления следовой гиперполяризации (рис. 5А), вызываемой активацией SK-каналов (рис. 5Б) непосредственно на исследованных нейронах. CyPPA является селективным активатором SK2- и SK3-каналов, при этом в позднем пренатальном и постнатальном периоде в коре мозжечка лишь клетки Пуркинью характеризуются высокой экспрессией SK2 [8], что делает именно эти клетки основной мишенью действия активаторов SK-каналов. В силу анатомической структуры мозжечка активаторы SK-каналов при аппликации на поверхность, в первую очередь, проникают в молекулярный слой, где могут взаимодействовать с дендритным деревом КП и, по мере диффузии, с соматами КП (рис. 6А). Роли

дендритных и соматических SK-каналов различны. У молодых крыс (10–90 дней) блок соматических SK-каналов увеличивает частоту авторитмической активности КП, в то время как блок дендритных SK-каналов не только увеличивает частоту простых спайков, но и снижает ток утечки и улучшает передачу в синаптических входах на КП [9]. При этом блок SK-каналов только дендритов имел существенно меньший эффект, чем блок SK-каналов дендритов и сомы [9]. Вероятно, в наших экспериментах постепенная диффузия NS309 или CyPPA со стороны дендритов КП в сторону сомы определяет плавное усиление эффекта этих активаторов SK-каналов со временем. В проведенных нами экспериментах *in vivo* активация SK-каналов с помощью положительных модуляторов CyPPA и NS309 приводила к изменению паттерна активности КП. В группе как взрослых, так и старых крыс частота простых спайков была статистически значимо снижена по сравнению с контрольной серией. Несмотря на то что снижение частоты простых спайков, вызванное модуляторами SK-каналов, было практически одинаковым в группах взрослых и старых крыс, снижение частоты простых спайков у старых крыс в сопоставлении с контролем наступало раньше – через 30 мин после аппликации CyPPA и через 15 мин после аппликации NS309. У взрослых крыс снижение частоты простых спайков под влиянием обоих веществ наблюдалось через 45 мин.

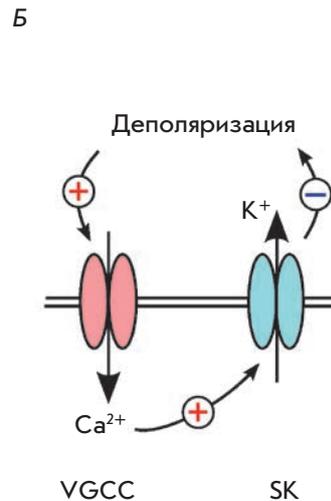
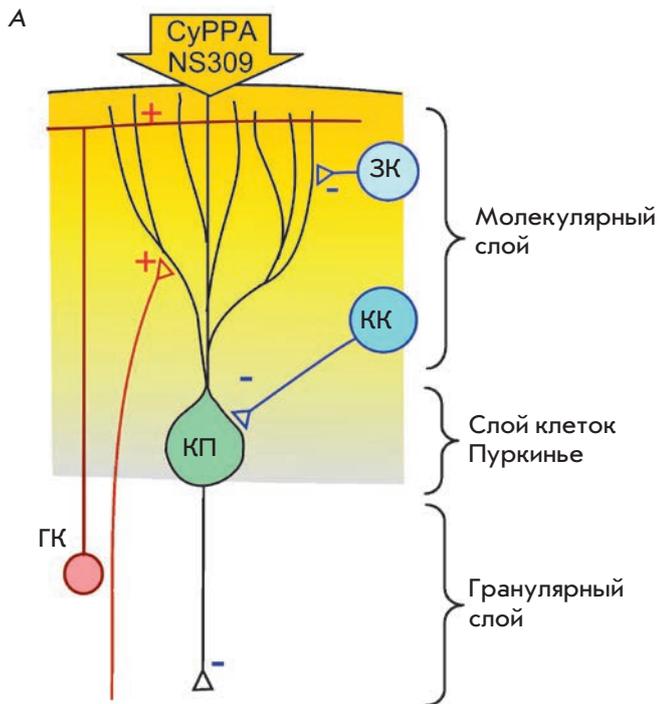


Рис. 6. Схема воздействия модуляторов SK-каналов на клетки Пуркинье (КП) при аппликации на поверхность мозжечка. А – упрощенная схема нервных связей КП в коре мозжечка. (+) – возбуждающие и (-) – тормозные синаптические связи, КП – клетка Пуркинье, ЗК – звездчатая клетка, КК – корзинчатая клетка, ГК – гранулярная клетка. Б – взаимоотношения ключевых ионных каналов КП, регулирующих их авторитмическую активность

CyPPA и NS309 в насыщающих концентрациях многократно увеличивают чувствительность SK-каналов к внутриклеточному кальцию, в результате чего максимальная активация этих каналов реализуется при любой физиологической концентрации внутриклеточного кальция [23]. В наших экспериментах активаторы SK-каналов достигали насыщающих концентраций вблизи КП постепенно по мере диффузии, поэтому скорость наступления эффекта могла зависеть от возрастных особенностей динамики внутриклеточного кальция. Активация SK-каналов в КП определяется входом кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы (VGCC) (рис. 6Б). У старых животных наблюдается снижение экспрессии Cav2.1 (VGCC P/Q-типа) и почти полное исчезновение Cav1.3 (VGCC L-типа) в молекулярном слое мозжечка [24]. Cav1.3 активируются при самых низких значениях мембранного потенциала, т.е. наиболее чувствительны к деполяризации [25]. Дефицит же Cav2.1 может приводить к атакии 2-го типа [26–28], поскольку в КП большая доля кальция, поступающего через VGCC, приходится на Cav2.1 [29]. В условиях возрастной потери части VGCC и связанного с ними кальциевого сигнала может страдать нормальная активация SK-каналов. Кроме того, осцилляции примембранного внутриклеточного кальция модулируют активность и других типов рецепторов, в частности десенситизацию рецепторов глутамата, обеспечивающих глутаматергическую синаптическую передачу [30].

В работе, выполненной *in vivo* на взрослых мышках, показано, что частота простых спайков в разряде КП при аппликации NS309 снижается гораздо сильнее, чем при аппликации CyPPA [13]. Результаты, представленные в данной работе, показывают сходное снижение частоты простых спайков под влиянием позитивных модуляторов SK-каналов, NS309 и CyPPA, у взрослых крыс. В группе старых животных наблюдалась тенденция к более выраженному снижению частоты простых спайков под влиянием NS309, чем CyPPA. При этом снижение частоты простых спайков после аппликации CyPPA было сопоставимым с ранее полученными данными на мышках, а NS309 оказывал более сильное влияние на активность КП мозжечка мышей, чем крыс. Известно, что CyPPA – избирательный модулятор SK-каналов, в то время как NS309 является также активатором IK-каналов [31], экспрессированных в дендритах КП, где они модулируют временную суммацию синаптических входов [32]. Так, в наших экспериментах *in vitro* NS309 усиливал следовую гиперполяризацию КП сильнее, чем CyPPA. Вероятно, поэтому снижение частоты простых спайков в КП при действии NS309 более выражено, чем при действии CyPPA, активирующего только SK2-каналы в КП. Различия в эффективности влияния NS309 на частоту простых спайков в разряде КП мозжечка мышей и крыс, возможно, обусловлено видовыми отличиями в экспрессии и функционировании IK-каналов в мозжечке или особенностями диффузионных барьеров при ис-

пользуемом способе аппликации веществ у этих животных.

Применение положительных модуляторов SK-каналов на животных, служащих моделями некоторых видов спинальных атаксий, приводит к восстановлению нарушенного паттерна активности КП, а в некоторых случаях и к исчезновению симптомов атаксии [4, 5, 8, 9], что предполагает наличие у них терапевтического эффекта. Кроме того, применение активаторов SK-каналов позволяет компенсировать возрастные изменения авторитмических функций КП мозжечка. Причины возрастных отли-

чий в эффектах активаторов SK-каналов требуют дальнейшего изучения, поскольку могут быть связаны с дефицитом функций потенциал-чувствительных кальциевых каналов КП. ●

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 15-04-08283 и 16-04-00653 (эксперименты in vivo) и Российского научного фонда № 16-15-10192 (дополнительные эксперименты с использованием методов patch-clamp и иммуноцитохимии). Иммуноцитохимические исследования выполнены на базе ЦКП ИЭФБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ito M. // Brain Res. 2000. V. 886. № 1–2. P. 237–245.
- Hansen S.T., Meera P., Otis T.S., Pulst S.M. // Hum. Mol. Genet. 2013. V. 22. № 2. P. 271–283.
- Kasumu A.W., Hougaard C., Rode F., Jacobsen T.A., Sabatier J.M., Eriksen B.L., Strøbæk D., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., et al. // Chem. Biol. 2012. V. 19. № 10. P. 1340–1353.
- Shakkottai V.G., do Carmo Costa M., Dell’Orco J.M., Sankaranarayanan A., Wulff H., Paulson H.L. // J. Neurosci. 2011. V. 31. № 36. P. 13002–13014.
- Walter J.T., Alvina K., Womack M.D., Chevez C., Khodakhah K. // Nat. Neurosci. 2006. V. 9. № 3. P. 389–397.
- Faber E.S., Sah P. // Neuroscientist. 2003. V. 9. № 3. P. 181–194.
- Adelman J.P., Maylie J., Sah P. // Ann. Rev. Physiol. 2012. № 74. P. 245–269.
- Gymnopoulos M., Cingolani L.A., Pedarzani P., Stocker M. // J. Comp. Neurol. 2014. V. 522. № 5. P. 1072–1101.
- Womack M.D., Khodakhah K. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 7. P. 2600–2607.
- Карелина Т.В., Григорьян Р.А. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2010. Т. 46. № 3. С. 218–224.
- Карелина Т.В. Возрастные особенности синаптической активации клеток Пуркинье мозжечка системой лазающих и мшистых волокон. Автореф. дис. СПб.: ИЭФБ РАН, 2010.
- Kasumu A.W., Liang X., Egorova P., Vorontsova D., Bezprozvanny I. // J. Neurosci. 2012. V. 32. № 37. P. 12786–12796.
- Егорова П.А., Карелина Т.В., Власова О.Л., Антонов С.М., Безprozvanny И.Б. // Журн. эвол. биохим. физиол. 2014. Т. 50. № 2. С. 102–108.
- Gao Z., Todorov B., Barrett C.F., van Dorp S., Ferrari M.D., van den Maagdenberg A.M., De Zeeuw C.I., Hoebeek F.E. // J. Neurosci. 2012. V. 32. № 44. P. 15533–15546.
- Abushik P.A., Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. // Cell Calcium. 2013. V. 54. № 2. P. 95–104.
- Weber A., Schachner M. // Brain Res. 1984. V. 311. P. 119–130.
- Hirano T., Ohmori H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 1945–1949.
- Hockberger P.E., Tseng H.Y., Connor J.A. // J. Neurosci. 1989. V. 9. № 7. P. 2258–2271.
- Bartschat S., Fieguth A., Könemann J., Schmidt A., Bode-Jänisch S. // Forensic Sci. Int. 2012. V. 223. № 1–3. P. 165–170.
- Nie L., Song H., Chen M.F., Chiamvimonvat N., Beisel K.W., Yamoah E.N., Vázquez A.E. // J. Neurophysiol. 2004. V. 91. P. 1536–1544.
- Herrick K.F., Christophersen P., Shepard P.D. // J. Neurophysiol. 2010. V. 104. № 3. P. 1726–1735.
- Herrick K.F., Redrobe J.P., Holst D., Hougaard C., Sandager-Nielsen K., Nielsen A.N., Ji H., Holst N.M., Rasmussen H.B., Nielsen E.O., et al. // Front. Pharmacol. 2012. № 3. P. 11.
- Hougaard C., Eriksen B.L., Jorgensen S., Johansen T.H., Dyhring T., Madsen L.S., Strobaek D., Christophersen P. // Br. J. Pharmacol. 2007. V. 151. P. 655–665.
- Chung Y.H., Shin C.M., Kim M.J., Shin D.H., Yoo Y.B., Cha C.I. // Brain Res. 2001. V. 903. № 1–2. P. 247–252.
- Tuckwell H.C. // Progr. Neurobiol. 2012. V. 96. № 1. P. 1–31.
- Ophoff R.A., Terwindt G.M., Vergouwe M.N., van Eijk R., Oefner P.J., Hoffman S.M., Lamerdin J.E., Mohrenweiser H.W., Bulman D.E., Ferrari M., et al. // Cell. 1996. V. 87. P. 543–552.
- Rose S.J., Kriener L.H., Heinzer A.K., Fan X., Raikie R.S., van den Maagdenberg A.M.J.M., Hess E.J. // Exp. Neurol. 2014. V. 261. P. 553–562.
- Salvi J., Bertaso F., Mausset-Bonnefont A.L., Metz A., Lemmers C., Anjo F., Fagni L., Lory P., Mezghrani A. // Neurobiol. Dis. 2014. V. 68. P. 47–56.
- Ovsepian S.V., Friel D.D. // Eur. J. Neurosci. 2008. V. 27. № 1. P. 93–103.
- Sibarov D.A., Abushik P.A., Poguzhelskaya E.E., Bolshakov K.V., Antonov S.M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. V. 355. P. 484–495.
- Strobaek D., Teuber L., Jorgensen T.D., Ahring P.K., Kjaer K., Hansen R.S., Olesen S.P., Christophersen P., Skaaning-Jensen B. // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1665. P. 1–5.
- Engbers J.D., Anderson D., Asmara H., Rehak R., Me-haffey W.H., Hameed S., McKay B.E., Kruskic M., Zamponi G.W., Turner R.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. V. 109. P. 2601–2606.

УДК 616.155.392.2; 616-006.446

Эволюция опухолевых клонов при остром лимфобластном лейкозе взрослых

С. Ю. Смирнова¹, Ю. В. Сидорова¹, Н. В. Рыжикова¹, К. А. Сычевская², Е. Н. Паровичникова¹, А. Б. Судариков^{1*}

¹Гематологический научный центр Министерства здравоохранения РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 31, корп. 5

*E-mail: dusha@blood.ru

Поступила в редакцию 10.02.2016

Принята к печати 01.04.2016

РЕФЕРАТ Нестабильность клонального состава популяции опухолевых клеток при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ) усложняет процесс контроля минимальной остаточной болезни (МОБ) и эффективности терапии по установленным в дебюте заболевания мишеням, специфичным для данного пациента. Основные работы, в которых изучали эволюцию опухолевых клеток со сменой клональных реаранжировок генов *TCR* и *IG* в рецидиве заболевания, выполнены на детских ОЛЛ. Данные для взрослых больных ОЛЛ ограничены, тогда как ОЛЛ у взрослых и детей имеют различия в особенностях биологии и прогноза заболевания. Цель нашей работы состояла в изучении клональных реаранжировок генов *IG* и *TCR* и их стабильности у взрослых больных с ОЛЛ. Реаранжировки выявляли методом ПЦР по протоколу BIOMED-2 с последующим анализом фрагментов. У 83% пациентов выявили несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания. Клональная эволюция может быть одним из механизмов опухолевой прогрессии. Не исключена изначальная неоднородность состава опухолевых клеток, и в то время как одни клоны исчезают под воздействием терапии, другие, не распознанные из-за недостаточной чувствительности метода, приобретают способность к пролиферации. Кроме того, в течение заболевания реаранжировки могут меняться благодаря сохраняющейся активности рекомбиназного комплекса, что приводит к появлению опухолевых клонов *de novo*. Изучение механизмов клональной эволюции, способности терапии влиять на процессы клональной эволюции позволит выделить новые прогностические факторы, разработать тактику диагностики МОБ, расширит современные представления о механизмах онкогенеза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА острый лимфобластный лейкоз, рецидив, ПЦР, реаранжировки генов *IG*, реаранжировки генов *TCR*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МОБ – минимальная остаточная болезнь; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени; *TCR* – Т-клеточный рецептор; *TCRG*, *TCRB*, *TCRD* – Т-клеточные рецепторы γ , β и δ соответственно; *IG* – иммуноглобулин; *IGH* – тяжелая цепь иммуноглобулина; *IGK* – легкая цепь иммуноглобулина.

ВВЕДЕНИЕ

Острые лейкозы представляют собой гетерогенную группу опухолевых заболеваний кроветворной ткани, характеризующихся поражением костного мозга морфологически незрелыми (бластными) кроветворными клетками. В зависимости от принадлежности опухолевых клеток к той или иной линии гемопоэза, острые лейкозы принято разделять на острые лимфобластные и острые миелобластные лейкозы. Без терапии течение заболевания быстро прогрессирующее и всегда заканчивается смертью больного.

Наиболее часто причиной смерти являются тяжелые инфекционные и геморрагические осложнения, обусловленные замещением нормальной кроветворной ткани бластными клетками.

Основная цель терапии любых форм лейкозов – эрадикация опухолевого клона, восстановление нормального кроветворения и достижение длительной безрецидивной выживаемости больных. Введение в клиническую практику цитостатических препаратов в конце 60-х годов позволило достичь полной ремиссии у 85–95% детей с ОЛЛ [1]. При этом важным

прогностическим фактором является возраст, бессобытийная выживаемость детей варьирует в разных возрастных группах от 83–97% (1–5 лет) до 49–66% (10–15 лет). На сегодняшний день Российской исследовательской группой по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL) показано, что в группах взрослых больных моложе 30 лет 5-летняя безрецидивная выживаемость составила 71.5%, в то время как у больных 30–55 лет этот показатель был ниже – 61.8% [2]. Показано, что взрослые и дети, больные ОЛЛ, отличаются не только выживаемостью, но также биологическими свойствами и прогнозом заболевания [3, 4]. В частности, к группе благоприятного прогноза у взрослых относят Т-клеточный вариант заболевания, в то время как у детей этот вариант считается прогностически неблагоприятным. Кроме того, у взрослых чаще выявляют прогностически неблагоприятные хромосомные aberrации (t(9;22), t(4;11)), миелоидные антигены на мембране опухолевых клеток, в дебюте заболевания чаще определяют гиперлейкоцитоз, чаще диагностируют Т-клеточный иммунофенотип [3, 4].

Другой важный прогностический фактор при ОЛЛ – остаточное количество опухолевых клеток в костном мозге, или минимальная остаточная болезнь (МОБ). Оценка МОБ рассматривается не только как независимый фактор прогноза, но и как критерий разделения пациентов на группы риска развития рецидива [5–7]. Для оценки МОБ наиболее пригодны количественные методики с максимальным уровнем чувствительности (10^{-4} – 10^{-5}), такие, как ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием праймеров, специфичных для данного пациента, и многоцветная проточная цитофлуориметрия. Оценка МОБ у пациентов с ОЛЛ методом ПЦР основана на определении клональных реаранжировок генов Т-клеточных рецепторов (TCR) и иммуноглобулинов (IG) в опухолевых клетках и подборе пациент-специфичных праймеров к CDR3-области этих генов [8].

Клональные реаранжировки генов IG и TCR находят у 98% пациентов с В-ОЛЛ и у 95% больных с Т-ОЛЛ [9]. Поскольку в опухолевых клетках, полученных от разных больных, обнаруживают различные хромосомные aberrации, только перестроенные гены IG и TCR считаются универсальными маркерами, позволяющими отслеживать опухолевые клоны практически у всех больных в течение болезни/терапии. Само по себе выявление клональности не является критерием для постановки диагноза ОЛЛ. Клональные реаранжировки иногда обнаруживают и при реактивных (неопухолевых) процессах воспалительного, инфекционного или аутоиммунного генеза. Как правило, в этих случаях

клональный продукт определяется на поликлональном фоне. Дифференциальная диагностика опухолевой и неопухолевой лимфопрлиферации представляет определенную сложность при некоторых лимфомах, грибковидном микозе, синдроме Сезари, однако, исследование клональности при ОЛЛ, когда в периферической крови большинство лимфоцитов (> 20%) представлены опухолевыми клетками, таких затруднений не вызывает.

ПЦР-РВ с пациент-специфичными праймерами, подобранными к уникальной по нуклеотидной последовательности V-D-J-области клонально перестроенных генов IG или TCR, позволяет с высокой чувствительностью (10^{-4} – 10^{-5}) оценить остаточное количество опухолевых клеток у пациентов с ОЛЛ [10]. Однако данные, полученные при изучении клональных перестроек в дебюте и рецидиве ОЛЛ у детей, свидетельствуют о том, что реаранжировки генов IG и TCR могут изменяться в течение заболевания, т.е. в рецидиве заболевания часть выявленных клональных реаранжировок исчезает и/или появляются новые реаранжировки. Необходимо отметить, что речь идет именно о частичной смене клональных реаранжировок, так как полная смена генных реаранжировок IG и TCR в рецидиве указывает на возникновение вторичного ОЛЛ [11, 12]. Частичные различия клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве наблюдаются у 67–70% детей с В-ОЛЛ и 45–50% детей с Т-ОЛЛ [13–15]. Данные об эволюции опухолевых клонов у взрослых с ОЛЛ весьма ограничены [11]. У Szczepanski и соавт. приведены результаты оценки генов TCR у 9 взрослых с Т-ОЛЛ [11]. Показано, что в целом стабильность генов TCR при взрослом Т-ОЛЛ выше (97%), чем при детском Т-ОЛЛ (86%) [11]. При этом реаранжировки генов IG в дебюте и рецидиве заболевания не изучали.

Смена клональных реаранжировок, т.е. клональная эволюция опухоли, может приводить к потере мишени для исследования МОБ и ложноотрицательным результатам. Таким образом, приемлемость той или иной реаранжировки для изучения МОБ при ОЛЛ определяется не только частотой ее выявления, но и стабильностью. Основные данные изучения стабильности и частоты различных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ суммированы в табл. 1 [5–11, 15–19].

Перестройки генов δ -цепи TCR (TCRD) – самая ранняя из генных перестроек в Т-лимфоцитах. Клональные перестройки генов TCRD встречаются примерно в 55% случаев Т-ОЛЛ [20], генов γ -цепи TCR (TCRG) – у 95% пациентов [21], генов β -цепи TCR (TCRB) – у 92% пациентов. Стабильность реаранжировок TCRB при рецидивах Т-ОЛЛ у детей была ниже стабильности γ - и δ -цепей – 80 vs 86

Таблица 1. Стабильность и частота выявления клональных реаранжировок при В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ [7]

Ген	Реаранжировка	В-ОЛЛ				Т-ОЛЛ	
		Частота, %		Стабильность, %		Частота, %	Стабильность, %
		моно	олиго	моно	олиго		
IGH	VH-JH (полные)	93	30-40	88	47	5	НТ
	DH-JH (неполные)	20	50-60	57	38	23	НТ
	Все IGH	98	40	85	44	23	НТ
IGK	Vκ-Kde	45	5-10	95	40	0	НП
	Интрон RSS-Kde	25	5-10	86	0	0	НП
	Все Kde	50	5-10	95	40	0	НП
TCRB	VB-JB (полные)	21	10-15	89	60	77	79
	DB-JB (неполные)	14	10-15	67	0	55	80
	Все TCRB	33	10-15	81	43	92	80
TCRG	VG-JG	55	15	75		95	86
TCRD	VD-JD или DD-JD1	< 1	НП	НП	НП	50	100
	VD2-DD3 или DD2-DD3	40	20-25	86	26	55	100
	Все TCRD	40	20-25	86	26	55	100

Примечание. НТ – не тестировали, НП – неприменимо.

и 100% соответственно (см. табл. 1) [11]. Несмотря на высокую частоту обнаружения и высокую стабильность, моноклональные перестройки генов γ-цепи являются не самой удачной мишенью для контроля МОБ, поскольку имеют короткий фрагмент нуклеотидной вставки [22]. Согласно опубликованным данным, Т-ОЛЛ чаще, чем В-ОЛЛ, оказывается устойчивым к терапии и положительным по МОБ [23]. Выявлена высокая стабильность реаранжировок генов IGK (95%) при В-ОЛЛ у детей, завершенных V-D-J-реаранжировок генов IGH (88%), TCRB (89%) и TCRD (86%), относительно высокая стабильность реаранжировок генов TCRG (75%) и низкая стабильность неполных (D-J) перестроек генов IGH (57%) и неполных перестроек генов TCRB (67%) (табл. 1). Кроме того, в значительной части случаев детского В-ОЛЛ (26–30%) изначально определяется олигоклональный характер реаранжировок [13–15]. При ОЛЛ возможно присутствие клональных продуктов с незавершенной реаранжировкой генов и производных от них клональных продуктов с завершёнными реаранжировками, что объясняется действием V(D) J-рекомбиназ и «текущим» продолжающимся процессом реаранжировок генов иммуноглобулинов и TCR в ранних клетках-предшественниках [11, 15,

24]. Чаще других олигоклональность (наличие двух и более клонов) выявляют в генах IGH: полные реаранжировки – в 30–40% случаев, неполные – в 50–60%, гены δ-цепи TCR – в 20–25% случаев (табл. 1). Олигоклональные реаранжировки не рекомендовано использовать в качестве мишени для оценки МОБ: они нестабильны и часто дают ложноотрицательные результаты.

Эволюцию опухолевых клеток (смену клональных реаранжировок генов TCR и IGH) в рецидиве заболевания изучали в основном на детском ОЛЛ. Данные для взрослых больных ОЛЛ весьма ограничены. Учитывая то, что ОЛЛ у взрослых и детей имеют разные биологические свойства и прогноз заболевания, цель нашего исследования состояла в изучении характера клональных реаранжировок генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов и их стабильности у взрослых с В-ОЛЛ и Т-ОЛЛ, проходивших лечение в Гематологическом научном центре МЗ РФ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты и образцы

В исследование включено 63 больных ОЛЛ: 34 – с В-клеточным вариантом ОЛЛ, в том числе два

Таблица 2. Краткая характеристика пациентов с ОЛЛ

Возраст	19–59 (М 28)
Пол, м/ж	32/31
В-ОЛЛ/Т-ОЛЛ/бифенотипический вариант	34/28/1
Число рецидивов (В-ОЛЛ/Т-ОЛЛ)	6 (4/2)
Время до рецидива, мес.	5.4–11.6 (М 6.2)

Примечание. М – медиана возраста.

с Ph+ ОЛЛ; 28 – с Т-клеточным вариантом ОЛЛ и один с бифенотипическим вариантом ОЛЛ (табл. 2). Всем больным проводили стандартное цитогенетическое исследование, FISH-исследование клеток костного мозга с флуоресцентными зондами t(9;22) и t(4;11) (табл. 3). Нормальный кариотип имели 20 из 63 пациентов, у 17 из 63 не было митозов, у шести выявлены различные изменения хромосомы 9 и/или 22. Транслокация t(9;22) обнаружена методом FISH, а химерный транскрипт BCR/ABL (p190) идентифицирован молекулярно-генетическим методом (Ph+ В-ОЛЛ). У пяти больных методом FISH выявлена транслокация t(4;11), а с помощью ПЦР химерный транскрипт MLL-EP515. У семи больных найдены множественные хромосомные аномалии: у четверых – трисомия 21. Исследовали ДНК, полученную из всех 63 образцов костного мозга в дебюте заболевания. Возраст пациентов 19–59 лет (медиана – 28). У шести из 63 пациентов изучали клональные реаранжировки в дебюте и рецидиве заболевания. Время до рецидива составило от 5.4 до 11.6 месяцев. Больных наблюдали в отделении химиотерапии гемобластозов и депрессий кроветворения Гематологического научного центра (далее ГНЦ). Диагнозы устанавливали в соответствии с классификацией ВОЗ. Согласие на обработку данных получено от всех пациентов, включенных в исследование. Кровь здоровых доноров получена на станции переливания крови ГНЦ.

Анализ клональности по реаранжировкам генов IG/TCR

Лейкоциты и ДНК из периферической крови выделяли как описано ранее [25]. Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически. Образцы ДНК хранили при -20°C. В- и Т-клеточную клональность определяли с использованием мультиплексных систем праймеров BIOMED-2 для фрагментного анализа [26]. В-клеточную клональность оценивали по перестройкам генов тяжелых цепей IGH (VH–JH–

FR1/FR2/FR3/ DH–JH), легкой цепи κ IGK (Vk–Jk/Vk–KDE/IntronRSS–KDE). Т-клеточную клональность оценивали по перестройкам генов Т-клеточных рецепторов TCRG (VG–JG), TCRB (VB–JB/DB–JB), TCRD (VD–JD/DD2–JD/VD–DD3/DD2–DD3). Все локусы генов IG и TCR анализировали при помощи мультиплексных реакций с большим количеством праймеров, разделенных на несколько пробирок в соответствии с рекомендациями протокола BIOMED-2 (см. краткое описание в табл. 4). Для амплификации генов TCRB использовали коммерческий набор TCRB Gene Clonality Assay ABI Fluorescence Detection (Invivoscribe Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Смесь (25 мкл) для ПЦР генов IGH, IGK и TCRG, TCRD содержала 5 пмоль каждого праймера («Синтол», Россия), 100–200 нг ДНК и 12.5 мкл 2 ×PCRMasterMix (Promega, США). Амплификацию проводили на автоматическом термоциклере DNAEngine (BioRad, США). Условия ПЦР: 95°C (7 мин), затем 35 циклов – 95°C (45 с), 60°C (45 с), 72°C (45 с) и 72°C (10 мин). В качестве положительного (клонального) контроля использовали клеточные линии Jurkat и Daudi, в качестве поликлонального контроля – мононуклеары периферической крови здоровых доноров. Для фрагментного анализа ПЦР-продуктов использовали автоматический анализатор нуклеиновых кислот ABIPRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). С этой целью 2 мкл разведенного в 20 раз ПЦР-продукта смешивали с 10 мкл Hi-Di формамида (Applied Biosystems, США) и 0.04 мкл GeneScan 500-LIS Size Standard (Applied Biosystems, США). После денатурации при 95°C в течение 3 мин и последующего охлаждения 10 мкл смеси вносили в лунку 96-луночной плашки и проводили капиллярный электрофорез высокого разрешения на полимере POP-4 (Applied Biosystems, США). Флуоресценцию амплификатов и их профиль оценивали при помощи компьютерной программы GeneMapper v.4.0 (Applied Biosystems, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клональные реаранжировки изучены у 34 пациентов с В-клеточным вариантом ОЛЛ, 28 пациентов с Т-клеточным вариантом, одного с бифенотипическим вариантом заболевания. Частоты клональных реаранжировок генов γ -, β - и δ -цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ представлены в табл. 5. У пациента с бифенотипическим вариантом выявлена биаллельная реаранжировка (два пика) генов TCRG и олигоклональная (четыре пика) генов TCRD. У пациентов с В-клеточным вариантом ОЛЛ наиболее часто встречались реаранжировки генов тяжелой

Таблица 3. Результаты стандартного цитогенетического исследования (СЦИ) и FISH-анализа транслокаций t(4;11) и t(9;22) у пациентов с ОЛЛ

Пациент	Вариант ОЛЛ	СЦИ, FISH, ПЦР
1	В-II	Нет митозов
2	В-I	Нормальный кариотип
3	В-I	der(7)add(p22),-8?,der(9),i(q10),der(14),add(q32?),+mar der(9)?(17)cp/46, XX [3]
4	В-I	Добавочный материал на коротком плече хромосомы 10, трисомия хромосом X, 12 и 22, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
5	В-I	55XX, производное хромосом 3 и 11, делеция короткого плеча хромосомы 12 и длинного плеча хромосомы 13
6	В-I	Нормальный кариотип
7	В-I	Нормальный кариотип
8	В-I	Нет митозов, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
9	В-II	В 80% ядер выявлен дополнительный сигнал от локуса гена <i>IGH</i> (14q32) (трисомия хромосомы 14? другая транслокация с вовлечением локуса гена <i>IGH</i>)
10	В-II	Нормальный кариотип
11	В-II	Нет митозов
12	В-II	53XY?+X,+4,+6,+14,+21,+21,+mar [10]
13	В-II	Нормальный кариотип
14	В-II	Нет митозов
15	В-II	Нет митозов
16	В-II	В 15% по два дополнительных сигнала от локусов генов <i>ABL</i> (9q34) и <i>BCR</i> (22q11), тетрасомия хромосом 9 и 22?
17	В-II	Трисомия 21
18	В-II	Нормальный кариотип
19	В-II	Трисомия 21
20	В-II	Трисомия 21, моносомия 13
21	В-II	Нормальный кариотип
22	В-II	Нет митозов
23	В-II	Нормальный кариотип
24	В-II	Нормальный кариотип
25	В-II	Нормальный кариотип
26	В-III	Две клетки с del (11), FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
27	В-III	Нормальный кариотип
28	В-III	47XX +5 (5q31)
29	В-III	54X,?+X,Y,+4,+5,+6,?-7,+14,+21,+22,+?mar или r i(7)(q10) или i(8)(q10),+mar [19],46XY
30	В-III	+8+11+21
31	В-Ph+	Нет митозов, FISH t(9;22), выявлен <i>BCR-ABL</i> методом ПЦР
32	В-Ph+	Нормальный кариотип, FISH t(9;22), выявлен <i>BCR-ABL</i> методом ПЦР
33	В-II	Нет митозов
34	В-II	Нет митозов
35	T-I	46XY[2]/90-92,XXYY,=mar [10]
36	T-I	Нет митозов
37	T-I	11q23 перестроен, FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
38	T-I	Нормальный кариотип
39	T-I	del9(p13)
40	T-I	Нет митозов
41	T-I	Нормальный кариотип
42	T-I	15.5% трисомия, в 45% тетрасомия в локусе гена <i>PMLL\11q23</i> , FISH t(4;11), выявлен MLL-EPS15 методом ПЦР
43	T-I	Нормальный кариотип
44	T-II	Нормальный кариотип
45	T-II	Нормальный кариотип
46	T-II	Нормальный кариотип
47	T-II	Нет митозов
48	T-II	Делеция длинного плеча хромосомы 5? или транслокация t(5;?), производные хромосом 2, 4, 5, 7, 22 и 17 (с вовлечением гена <i>p53</i>)
49	T-II	Трисомия хромосомы 8
50	T-II	(47, XY,+8 (20))
51	T-II	Нормальный кариотип
52	T-II	Нет митозов
53	T-III	Нормальный кариотип
54	T-III	47, XY+mar [20]
55	T-III	der (1)add(p36)?dup(p31p36)?{20}; моносомия 9 или делеция локуса 9q34
56	T-III	Нет митозов
57	T-III	Производное хромосомы 11, делеция длинного плеча хромосомы 6
58	T-III	Нет митозов
59	T-III	Нет митозов
60	T-III	Нет митозов
61	T-IV	t(6;17) +20
62	T-I	del 11q23
63	Бифенотипический вариант заболевания	47, XY, der(2)add(p24-25),+5, del(7)(q22),del(13)(q11-q34),+14[6]/46, XY [4]

Примечание: **жирным шрифтом** выделены пациенты, у которых констатирован рецидив заболевания, выявляли реаранжировки генов Т-клеточных рецепторов и иммуноглобулинов в дебюте и рецидиве заболевания.

Таблица 4. Описание мультиплексных реакций и ПЦР-праймеров по протоколу BIOMED-2

Ген	Набор праймеров	Прямые праймеры	Обратные праймеры (меченые)	Длина продуктов, п.н.
IGH	A	VH1-7 (FR1)	JHcons FAM	310–360
	B	VH1-7 (FR2)	JHcons FAM	250–295
	C	VH1-7 (FR3)	JHcons FAM	100–170
	E	DH1-6	JHcons TAMRA	110–290 и 390–420
	D	DH7	JHcons TAMRA	100–130
IGK	A	Vκ1/6-7	Jκ1-4, Jκ5 FAM	120–300
	B	Vκ1/6-7, INTR	KDE-FAM	210–390
TCRD	D1	Dδ2,Vδ1-Vδ6	Jδ1FAM, Jδ2R6G, Jδ3TAMRA, Jδ4ROX	120–280
	D2	Dδ2,Vδ1-Vδ6	Dδ3FAM	130–280
TCRG	GA	Vγ1f, Vγ10	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	145–255
	GB	Vγ9, Vγ11	Jγ1/2FAM, Jp1/2 R6G	80–220
TCRB	A	Vβ2-Vβ24	Jβ1.1, Jβ1.6HEX, Jβ2.2, Jβ2.6, Jβ2.7FAM	240–285
	B	Vβ2-Vβ24	Jβ2.1, Jβ2.3, Jβ2.4, Jβ2.5 FAM	240–285
	C	Dβ1, Dβ2	Jβ1.1, Jβ1.6HEX, Jβ2.1, Jβ2.7FAM	170–210 285–325

Таблица 5. Частота (%) выявления клональных реаранжировок генов γ-, β- и δ-цепей TCR и генов тяжелой и легкой цепей IG при В- и Т-вариантах ОЛЛ

Реаранжировки		В-ОЛЛ (n = 34)	Т-ОЛЛ (n = 28)
TCRG	VG–JG	76.5 (n = 26)	89.3 (n = 25)
TCRB	VB–JB (полные)	26.5 (n = 9)	50 (n = 14)
	DB–JB (неполные)	23.5 (n = 8)	46.4 (n = 13)
	Все TCRB	38.2 (n = 13)	60.7 (n = 17)
TCRD	VD–JD/DD2–JD	17.6 (n = 6)	53.6 (n = 15)
	VD–DD3/DD2–DD3	47.1 (n = 16)	32.1 (n = 9)
	Все TCRD	55.9 (n = 19)	64.3 (n = 18)
IGH	VH–JHFR1/FR2/FR3 (полные)	73.5 (n = 25)	7.1 (n = 2)
	DH–JH (неполные)	26.5 (n = 9)	25 (n = 7)
	Все IGH	82.4 (n = 28)	28.6 (n = 8)
IGK	Vκ–Jκ	26.5 (n = 9)	0 (n = 0)
	Vκ–KDE/IntronRSS–KDE	26.5 (n = 9)	3.6 (n = 1)
	Все IGK	38.2 (n = 13)	3.6 (n = 1)

цепи IG (82.4%) и γ-цепи TCR (76.5%), реаранжировки генов β-цепи TCR и генов κ-цепи IG обнаружены в 38.2% случаев, генов δ-цепи TCR – в 55.9%. У 89.3% пациентов с Т-клеточным вариантом ОЛЛ выявлены перестройки генов γ-цепи TCR. Перестройки генов δ-цепи выявлены в 64.3% случаев, генов β-цепи – в 60.7% случаев. Реже остальных при Т-ОЛЛ встречались перестройки IGH – 28.6%. Перестройка генов легкой κ-цепи иммуноглобулина Vκ/KDE найдена в одном случае Т-ОЛЛ. Наши данные по частоте клональных генных реаранжировок IG и TCR несколько отличаются от данных международных исследований, что мы связываем с небольшим размером вы-

борки. Олигоклональные реаранжировки (три и более клональных пика) наблюдались как при В-ОЛЛ (IGH у 12% (4 из 34) пациентов, TCRD у 18% (6 из 34) пациентов), так и при Т-ОЛЛ (TCRD у 32% (9 из 28) пациентов).

У шести пациентов клональные реаранжировки исследовали в дебюте и рецидиве заболевания. Всего в дебюте заболевания выявлено 17 клональных реаранжировок генов TCR и 5 клональных реаранжировок генов IG. В рецидиве заболевания выявлено шесть клональных реаранжировок генов TCR и три клональные реаранжировки генов IG, которые отличались от выявленных в дебюте (табл. 6).

Таблица 6. Клональные продукты, выявленные в дебюте и рецидиве у шести пациентов с диагнозом ОЛЛ

Пациент / диагноз	№ 1 Т-ОЛЛ		№ 2 Т-ОЛЛ		№ 3 В-ОЛЛ		№ 4 В-ОЛЛ		№ 5 В-ОЛЛ		№ 6 В-ОЛЛ	
	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р	Д	Р
TCRG-GA	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
TCRG-GB	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
TCRB-A	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
TCRB-B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TCRB-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCRD-D1	+	+	+	+1	+	+	+	+	+	+	-	-
TCRD-D2	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
IGH-A/ IGH-B/ IGH-C	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+1	+	+
VK-A	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
VK-B	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Примечание. «+» – моноклональная реаранжировка, «-» – поликлональная реаранжировка, «+1» – изначальная клональная реаранжировка выявляется с дополнительной, отличной от выявленной в дебюте заболевания, Д – дебют заболевания, Р – рецидив заболевания.

У двух пациентов с В-клеточным вариантом заболевания отмечена потеря одной из клональных реаранжировок, выявленных в дебюте, при одновременном появлении новых реаранжировок (пациенты № 5 на рис. 1 и № 6 в табл. 6). У одной пациентки с диагнозом раннего Т-ОЛЛ клональные реаранжировки генов γ -, β - и δ -цепей TCR, выявленные в дебюте заболевания, полностью совпадали с клональными реаранжировками в рецидиве (№ 1). У одного пациента с диагнозом Т-ОЛЛ, при полном сохранении клональных перестроек, выявленных в дебюте, отмечено появление новых реаранжировок (№ 2). У одного пациента в рецидиве заболевания сохранились только две из семи реаранжировок, выявленных в дебюте (рис. 2, № 4). У одного пациента в дебюте В-ОЛЛ выявлена только одна клональная реаранжировка генов δ -цепи TCR, которая сохранилась в рецидиве, но появились несколько новых, в том числе клональные реаранжировки генов IGH и генов легкой κ -цепи IG.

Нами показано, что у всех пациентов в рецидиве ОЛЛ сохранился хотя бы один клональный продукт из выявленных в дебюте (табл. 6). Это подтверждает данные, согласно которым даже при развитии позднего рецидива ОЛЛ у детей (более чем через 5 лет с момента констатации ремиссии) сохраняется хотя бы один исходный клональный продукт [27]. В нашей работе у пяти из шести (83%) пациентов отмечено несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания. Даже при столь

небольшой выборке мы наблюдали клональную эволюцию в рецидиве заболевания, что делает актуальным вопрос о первоначальном выборе мишени для количественного определения МОБ. Для минимизации риска ложноположительных результатов принято использовать как минимум две независимые мишени с высокой стабильностью. Однако на практике не ко всем мишеням удается подобрать пациент-специфичный праймер, который обладает нужной специфичностью и чувствительностью. Прежде всего, это касается незавершенных реаранжировок или генных реаранжировок, где отсутствует D-сегмент, например TCRG ($V\gamma$ - $J\gamma$). Нами обнаружена потеря пациент-специфичных мишеней, выявленных у трех пациентов в дебюте заболевания. Для того чтобы зафиксировать минорные субклоны в дебюте заболевания и оценить их поведение на фоне проводимой терапии, мы решили повысить первоначальную чувствительность метода. При помощи праймеров, специфичных к семействам V и J, мы повторно исследовали первоначальный материал на предмет наличия клонов, возникших в рецидиве. Использование таких праймеров увеличивает чувствительность определения опухолевых клеток с 10^{-1} до 10^{-2} – 10^{-3} . Однако даже при такой чувствительности субклоны не были обнаружены в дебюте, что свидетельствует о малом размере субклонов и подтверждает данные других исследований. Так, в 77% (35 из 45) случаев детского В-ОЛЛ клоны с но-

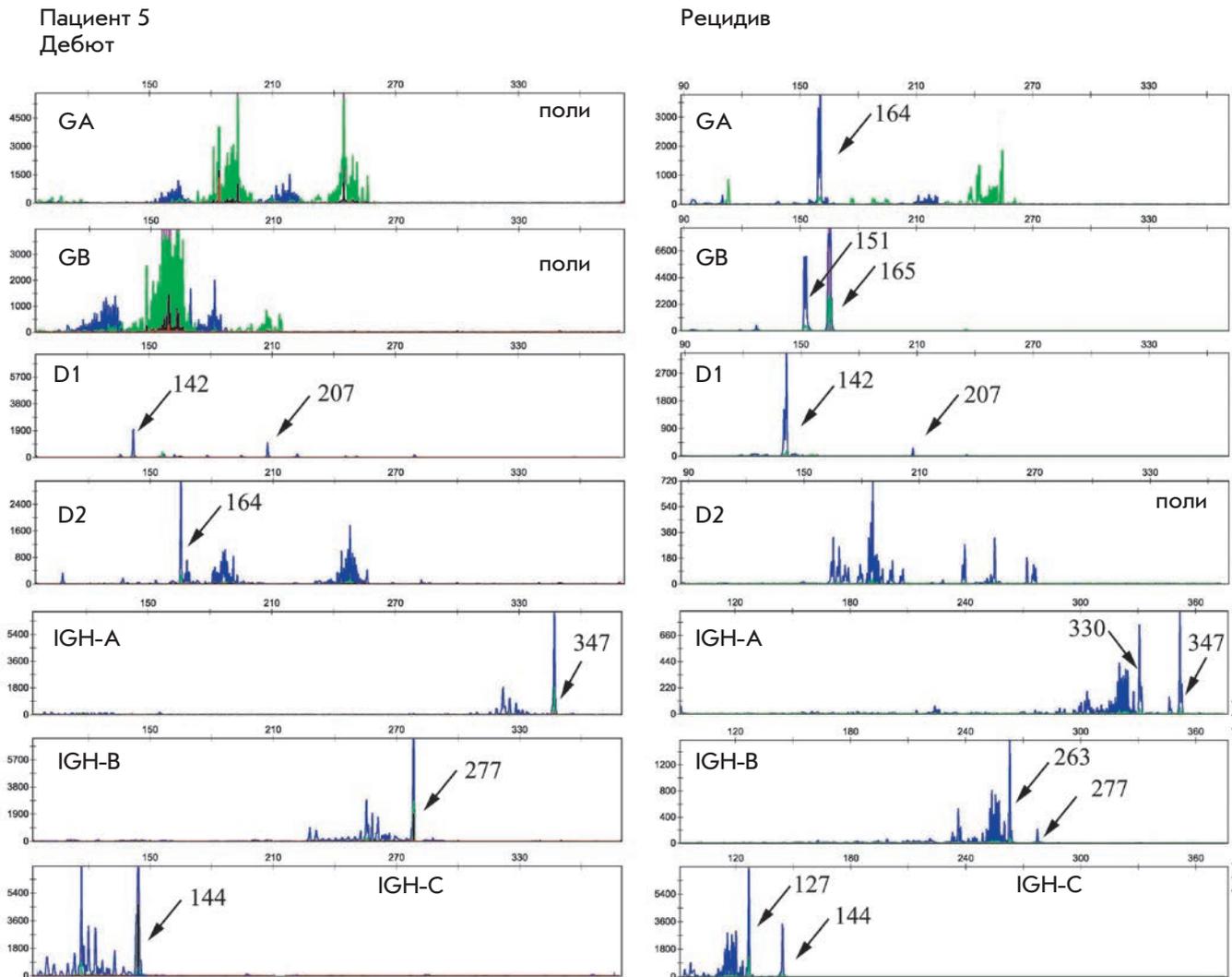


Рис. 1. Данные фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGH* пациента № 5 в дебюте и рецидиве заболевания. В дебюте выявлено два клональных продукта длиной 142 и 207 п.н. (указаны стрелками) реаранжировки генов *TCRD*, клональный продукт 347 п.н. реаранжировки генов *IGH*. В рецидиве заболевания у данного пациента сохранились исходные клональные реаранжировки генов *TCRD* и тяжелой цепи *IGH*, при этом появились новые клональные реаранжировки генов γ -цепи TCR (*TCRGA* – 164 п.н., *TCRGB* – 151, 165 п.н.), тяжелой цепи *IG* (*IGHA* – 330 п.н., *IGHB* – 263 п.н., *IGHC* – 127 п.н.)

выми реаранжировками в рецидиве присутствовали лишь в минимальных количествах при дебюте заболевания [28]. Размер таких резистентных субклонов варьировал от 10^{-2} до 10^{-5} клеток, и чем меньше было количество клеток, тем больше времени проходило до рецидива [29].

В последние годы показано, что острые лимфобластные лейкозы имеют сложный и генетически неоднородный состав опухолевых клеток в пределах одного заболевания [30, 31]. В большинстве случаев ОЛЛ клональная эволюция обусловлена реактива-

цией одного из минорных субклонов, резистентного к проводимой терапии [14, 29, 32]. Клональное разнообразие является механизмом опухолевой прогрессии. Часть клональных клеток, вероятно, имеет отличные от остальных клеток свойства (генетические мутации, скорость деления, иммунологическую зрелость), что придает им устойчивость к воздействию химиотерапии. Причины поздней реактивации первоначального опухолевого клона до сих пор неизвестны. Возможно, происходит ослабление иммунологического надзора и механизмов противоопухоле-

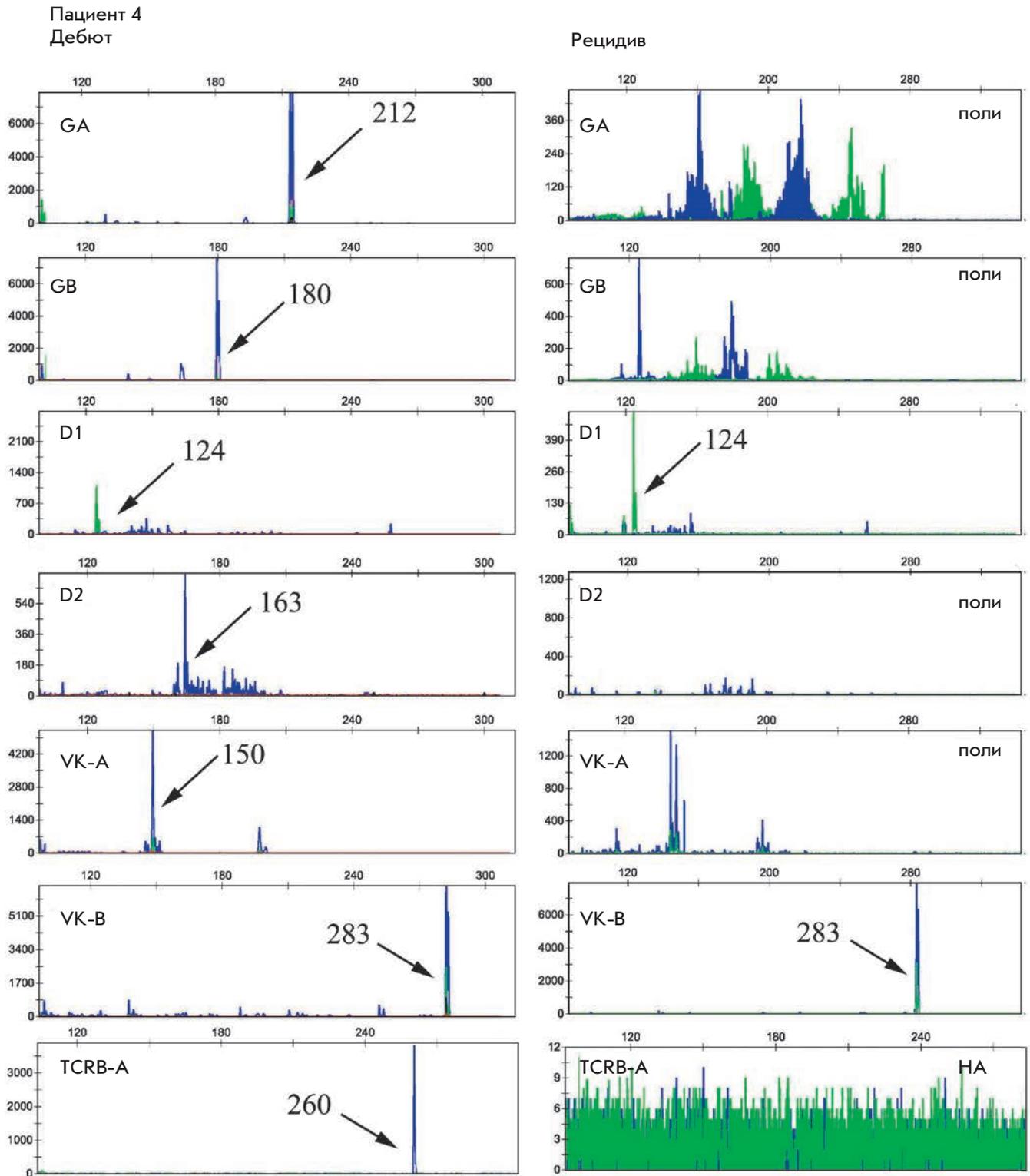


Рис. 2. Данные фрагментного анализа продуктов амплификации генов *TCRG*, *TCRD*, *IGK*, *TCRB* пациента № 4 в дебюте и рецидиве заболевания. В дебюте выявлено семь клональных продуктов (указаны стрелками). В рецидиве у данного пациента сохранились только два клональных продукта из семи исходных – реаранжировка генов *TCRD* (в реакции D1 – 124 п.н.) и легкой κ -цепи *IG* (в реакции VK-B – 283 п.н.)

вого иммунитета или появление новых генетических мутаций в опухолевых клетках с их последующей реактивацией. Применение количественных методов оценки МОБ является независимым фактором прогноза и критерием разделения пациентов на группы риска развития рецидива. В течение заболевания спектр клональных реаранжировок может изменяться. Такой процесс может происходить в течение раннего индукционного курса терапии, что дает ложноотрицательные результаты определения МОБ и препятствует стратификации больных на группы риска. Успешный контроль минимальной остаточной болезни можно обеспечить только при подборе пациент-специфичных праймеров для каждой клональной мишени, выявленной в дебюте заболевания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пяти из шести (83%) пациентов отмечено несоответствие клональных реаранжировок в дебюте и рецидиве заболевания, что говорит о клональной нестабильности на фоне проводимой полихимиотерапии. Опухолевые клетки при ОЛЛ изначально имеют сложный генетически неоднородный состав,

и в то время как одни клоны исчезают под воздействием полихимиотерапии, другие, не распознанные из-за недостаточной чувствительности метода, приобретают способность к пролиферации. Клональная эволюция служит одним из механизмов опухолевой прогрессии и является серьезной помехой для количественной оценки МОБ методом ПЦР. Нами показано, что отсутствие амплификации с пациент-специфичными праймерами, подобранными к мишеням, секвенированным в дебюте заболевания, не может полностью гарантировать отсутствие остаточного заболевания, так как мы показываем, что в ряде случаев при остром лейкозе опухолевые клоны нестабильны. Таким образом, в сомнительных случаях при подозрении на рецидив и отсутствии амплификации с пациент-специфичными праймерами необходимо повторное исследование клональности. Изучение механизмов клональной эволюции, способности полихимиотерапии влиять на процессы клональной эволюции, возможно, будет способствовать разработке новых прогностических факторов и терапевтических подходов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Felix C. Acute lymphoblastic leukemia in infants. Washington: Education Program Book of hematology, American society of hematology, 2015. P. 285–302.
2. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н., Ахмерзаева З.Х., Кузьмина Л.А., Менделеева Л.П., Клясова Г.А., Кравченко С.К., Грибанова Е.О., Бондаренко С.Н. и др. // Онкогематология. 2014. № 3. С. 6–15.
3. Campana D., Pui C. // Blood. 1995. V. 85. № 6. P. 1416–1434.
4. Copelan E., McGuire E. // Blood. 1995. V. 85. № 5. P. 1151–1168.
5. Flohr T., Schrauder A., Cazzaniga G., Panzer-Grümayer R., van der Velden V., Fischer S., Stanulla M., Basso G., Niggli F.K., Schäfer B.W. // Leukemia. 2008. V. 22. № 4. P. 771–782.
6. Brüggemann M., Raff T., Flohr T., Gökbuget N., Nakao M., Droese J., Lüschen S., Pott C., Ritgen M., Scheuring U., et al. // Blood. 2006. V. 107. № 3. P. 1116–1123.
7. van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. // Blood. 2015. V. 125. № 26. P. 3996–4009.
8. van der Velden V.H., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen J.J. // Leukemia. 2003. V. 17. P. 1013–1034.
9. van Dongen J.J., Langerak A.W., Brüggemann M., Evans P.A.S., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuurink E., García-Sanz R. // Leukemia. 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
10. Pongerse-Willems M.J., Seriu T., Stolz F., d'Aniello E., Gameiro P., Pisa P., Gonzalez M., Bartram C.R., Panzer-Grümayer E.R., Biondi A. // Leukemia. 1999. V. 13. P. 110–118.
11. Szczepanski T., van der Velden V.H., Raff T., Jacobs D.C., van Wering E.R., Brüggemann M., Kneba M., van Dongen J.J. // Leukemia. 2003. V. 17. № 11. P. 2149–2156.
12. Szczepanski T., van der Velden V.H., Waanders E., Kuiper R.P., van Vlierberghe P., Gruhn B., Eckert C., Panzer-Grümayer R., Basso G., Cavé H., et al. // ClinOncol. 2011. V. 29. № 12. P. 1643–1649.
13. Beishuizen A., Verhoeven M.A., van Wering E.R., Hahlen K., Hooijkaas H., van Dongen J.J. // Blood. 1994. V. 83. № 8. P. 2238–2247.
14. Li A., Zhou J., Zuckerman D., Rue M., Dalton V., Lyons C., Silverman L.B., Sallan S.E., Gribben J.G. // Blood. 2003. V. 102. № 13. P. 4520–4526.
15. Szczepanski T., Willems M.J., Brinkhof B., van Wering E.R., van der Burg M., van Dongen J.J. // Blood. 2002. V. 99. № 7. P. 2315–2323.
16. van der Velden V.H., Szczepanski T., Wijkhuijs J.M., Wijkhuijs J.M., Hart P.G., Hoogeveen P.G., Hop W.C.J., van Wering E.R., van Dongen J.J.M. // Leukemia. 2003. V. 17. № 9. P. 1834–1844.
17. Beishuizen A., Hahlen K., Hagemeyer A., Verhoeven M.A., Hooijkaas H., Adriaansen H.J., Wolvers-Tettero I.L., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 1991. V. 5. № 8. P. 657–667.
18. Beishuizen A., de Bruijn M.A., Pongers-Willems M.J., Verhoeven M.-A.J., van Wering E.R., Hählen K., Breit T.M., de Bruin-Versteeg S., Hooijkaas H., van Dongen J.J.M. // Leukemia. 1997. V. 11. № 12. P. 2200–2207.
19. Brüggemann M., van der Velden V.H., Raff T., Droese J., Ritgen M., Pott C., Wijkhuijs A.J., Gökbuget N., Hoelzer D., van Wering E.R. // Leukemia. 2004. V. 18. № 4. P. 709–719.
20. Breit T.M., Wolvers-Tettero I.L., Beishuizen A., Verhoeven M.A., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Blood. 1993. V. 82. № 10. P. 3063–3074.
21. Szczepanski T., Langerak A.W., Willems M.J., Wolvers-Tettero I.L., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 2000. V. 14. № 7. P. 1208–1214.
22. van der Velden V.H., Wijkhuijs J.M., Jacobs D.C., van Wering E.R., van Dongen J.J. // Leukemia. 2002. V. 16. № 7. P. 1372–1380.
23. Willems M.J., Seriu T., Hettinger K., d'Aniello E., Hop W.C., Panzer-Grümayer E.R., Biondi A., Schrappe M., Kamps W.A., Masera G., et al. // Blood. 2002. V. 99. № 12. P. 4386–4393.
24. Germano G., del Giudice L., Palatron S., Giarin E., Cazzaniga

- G., Biondi A., Basso G. // *Leukemia*. 2003. V. 17. № 8. P. 1573–1582.
25. Сидорова Ю.В., Сорокина Т.В., Бидерман Б.В., Никулина Е.Е., Кисиличина Д.Г., Наумова Е.В., Почтарь М.Е., Луговская С.А., Иванова В.Л., Ковалева Л.Г. и др. // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011. № 12. С. 22–35.
26. Dongen J.J., Langerak A.W., Bruggemann M., Evans P.A., Hummel M., Lavender F.L., Delabesse E., Davi F., Schuur-
ing E., Garcia-Sanz R., et al. // *Leukemia*. 2003. V. 17. № 12. P. 2257–2317.
27. Lo Nigro L., Cazzaniga G., Di Cataldo A., Pannunzio A., D'Aniello E., Masera G., Schiliró G., Biondi A. // *Leukemia*. 1999. V. 13. P. 190–195.
28. Eckert C., Flohr T., Koehler R., Hagedorn N., Moericke A., Stanulla M., Kirschner-Schwabe R., Cario G., Stackelberg A., Bartram C.R., et al. // *Leukemia*. 2011. V. 25. № 8. P. 1305–1313.
29. Choi S., Henderson M.J., Kwan E., Beesley A.H., Sutton R., Bahar A.Y., Giles J., Venn N.C., Pozza L.D., Baker D.L., et al. // *Blood*. 2007. V. 110. № 2. P. 632–639.
30. Mullighan C.G., Zhang J., Kasper L.H., Lerach S., Payne-Turner D., Phillips L.A., Heatley S.L., Holmfeldt L., Collins-Underwood J.R., Ma J., et al. // *Nature*. 2011. V. 471. № 7337. P. 235–239.
31. Gawad C., Pepin F., Carlton V.E., Klinger M., Logan A.C., Miklos D.B., Faham M., Dahl G., Lacayo N. // *Blood*. 2012. V. 120. № 22. P. 4407–4417.
32. de Haas V., Verhagen O.J., von dem Borne A.E., Kroes W., van den Berg H., van der Schoot C.E. // *Leukemia*. 2001. V. 15. № 1. P. 134–140.

УДК 578.821

Индуцированный адьювантом артрит у морских свинок

О. С. Таранов, С. Н. Якубицкий, Т. С. Непомнящих, А. Е. Нестеров, С. Н. Щелкунов*

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

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

Поступила в редакцию 28.03.2016

Принята в печать 30.05.2016

РЕФЕРАТ Предложена модель ревматоидного артрита, индуцируемого у беспородных морских свинок однократной инъекцией полного адьюванта Фрейнда подкожно в стопу задней конечности. В этой модели гистологически выявляются характерные для ревматоидного артрита в острой фазе отложения фибрина на поверхности синовиальной оболочки, лейкоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки и окружающих тканей, разрастания грануляционной ткани и появление участков ангиоматоза. Клеточная реакция выражается увеличением количества плазмоцитов и образованием фолликулоподобных лимфоидных инфильтратов, эрозивным поражением суставной поверхности хряща, нередко с его глубокой деструкцией на больших участках, и поражением эпифизов костей. Показана высокая воспроизводимость индукции артрита в данной модели. Сделано заключение о перспективности использования этой модели для оценки противоартритных препаратов и схем их применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адьювант-индуцированный артрит, морская свинка, ревматоидный артрит.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АИА – адьювант-индуцированный артрит; РА – ревматоидный артрит; СФА – полный адьювант Фрейнда.

ВВЕДЕНИЕ

Ревматоидный артрит (РА) – гетерогенное аутоиммунное заболевание, характеризующееся системным воспалением соединительной ткани. Морфологически при РА наблюдаются воспалительные явления в тканях суставной сумки, пролиферация и гиперплазия клеток синовиальной оболочки, формирование паннуса, структурное разрушение хряща и субхондральной кости. РА характеризуется неуклонно прогрессирующим поражением суставов и внутренних органов, приводящим к ранней потере трудоспособности и сокращению продолжительности жизни. РА болеют около 70 млн жителей земного шара, чаще всего болезнь поражает людей старшего возраста. Причины, обуславливающие развитие артрита, до сих пор четко не определены, возможно, вследствие их множественности [1–4].

Для изучения патогенеза РА и разработки лекарственных средств, эффективных при данном заболевании, используют различные животные модели. При этом подавляющее большинство исследований по индукции и терапии РА выполняют на определенных линиях мышей и крыс [1, 2, 5, 6]. Это обусловлено, в первую очередь, хорошей генетической изученностью и гомогенностью данных линий животных и большим числом имеющихся иммунологических

реагентов и тест-систем. Однако ни одна из моделей не отражает полностью всех аспектов развития РА человека [1, 5, 7], поэтому доклинические исследования потенциальных противоартритных препаратов необходимо проводить одновременно на разных животных моделях.

Генетическая гетерогенность людей и вероятная множественность механизмов индукции развития артрита делают актуальным использование в качестве моделей РА лабораторных животных, приближенных по своим физиологическим и иммунологическим свойствам к человеку. Считается, что морские свинки представляют более адекватную модель для изучения и разработки методов терапии различных воспалительных и инфекционных заболеваний человека, чем мыши и крысы [8–10].

Целью нашей работы было создание воспроизводимой модели адьювант-индуцированного артрита (АИА) у беспородных морских свинок.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Животные

Использовали самок беспородных морских свинок массой 200–250 г (возраст 3–4 недели), полученных из питомника животных ГНЦ ВБ «Вектор».

Животных содержали при естественном световом режиме и постоянном доступе к воде и пище.

Индукция артрита адьювантом Фрейнда

Животным в стопу задней левой лапы подкожно вводили раствор полного адьюванта Фрейнда (CFA) в объеме 50, 100 или 200 мкл, формируя группы «50», «100» и «200» соответственно. Морским свинкам контрольной группы («К») вводили 200 мкл натрий-фосфатного буфера (PBS). В контрольной группе и группе «50» было по 9 морских свинок, в группе «100» – 14, в группе «200» – 10 животных.

Через 1 сут после инъекции CFA, а затем каждые 3–4 сут измеряли ширину дистального района плюсны обеих задних лап. По 2–3 особи групп «К», «50» и «200» выводили из эксперимента под эфирным наркозом согласно правилам использования животных с соблюдением принципов гуманности, изложенным в Директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации в сроки 16, 28, 42 и 56 сут. Патологические изменения, вызванные введением CFA, оценивали путем гистологического исследования тканей обеих задних конечностей опытных и контрольных животных. Всех животных группы «100» вывели из эксперимента на 28 сут после инъекции CFA.

Гистологический анализ

Задние конечности морских свинок фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина для гистологических исследований («БиоВитрум», Россия) в течение 48 ч. Затем образцы, содержащие кость, декальцинировали препаратом BioDec R (Bio Optica Milano, Италия) в течение 48–72 ч. После декальцинации для приготовления гистологических препаратов задние стопы животных рассекали в сагиттальном направлении как описано в [2]. Дальнейшую обработку материала проводили по общепринятой для гистологических препаратов методике: последовательно обезжировали в спиртах возрастающей концентрации, пропитывали в смеси ксиллолпарафин и заливали в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Для дифференцированного окрашивания соединительной ткани применяли окраску по Ван Гизон. Светооптическое исследование и микрофотосъемку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенном цифровой камерой высокого разрешения HRC (Carl Zeiss, Германия) с использованием пакета программ AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

Для статистической обработки результатов гистологического анализа образцов животных группы

«100» применяли балльную оценку степени патологических проявлений заболевания в разных группах. Тяжесть заболевания оценивали по четырем признакам: наличие воспалительной реакции в тканях суставной сумки, степень выраженности синовита (образование паннуса), эрозия хрящевой ткани и деструкция суставной поверхности кости.

Воспалительную реакцию оценивали в 1 балл при инфильтрации единичными лимфоцитами и гранулоцитами тканей, окружающих сустав; 2 балла – при выраженной инфильтрации, образовании небольших лимфоцитарно-гистиоцитарных узелков, умеренно выраженном отеке околосуставных тканей. При выраженной диффузной инфильтрации мягких тканей клетками макрофагального ряда, лимфоцитами, гранулоцитами и плазматическими клетками, образовании плотного инфильтрата, выраженном отеке степень воспалительной реакции считали равной 3 баллам.

Степень развития синовита оценивали следующим образом: 1 балл – отмечаются признаки набухания синовиальной оболочки и пролиферация синовиоцитов; 2 балла – в местах соприкосновения синовиальной оболочки и хряща, образующего суставную поверхность, активно пролиферирующая грануляционная ткань формирует паннус; 3 балла – паннус «наползает» на суставной хрящ и разрушает его.

Разрушение хряща оценивали по глубине повреждения: 1 балл – эрозия поверхностного слоя (суставной поверхности) либо появление полостей, лишенных клеток; 2 балла – повреждения распространяются на половину толщины хряща; 3 балла – деструкция захватывает весь хрящ.

Степень деструкции кости: 1 балл – появление небольших участков резорбции в эпифизарных участках костей, образующих сустав; 2 балла – локальные повреждения кортикального слоя в области эпифиза; 3 балла – обширное повреждение кортикального слоя, разрушение трабекул губчатого вещества, деформация кости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические проявления артрита при инъекции CFA морским свинкам

Беспорядным морским свинкам подкожно в стопу задней левой лапы вводили CFA в объеме 50, 100 или 200 мкл. Измерения ширины дистального района плюсны обеих задних лап показали, что размер задней конечности, в которую вводили адьювант, увеличивается в результате развития воспалительной реакции (рис. 1). Реакция (отек и воспаление) на инъекцию CFA проявлялась уже в первые сутки после инъекции, отек обработанной лапы активно увели-

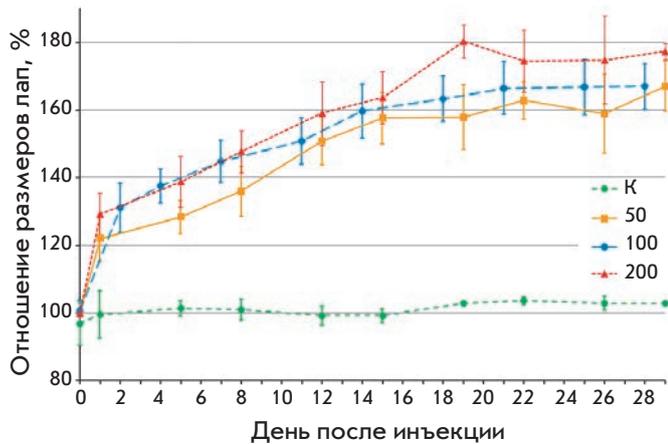


Рис. 1. Развитие воспалительной реакции в левой задней лапе морских свинок после инъекции полного адьюванта Фрейнда объемом 50 (группа «50»), 100 («100») или 200 («200») мкл. Приведено процентное соотношение ширины опытной левой лапы и необработанной правой. Данные представлены как среднее арифметическое в группе ± стандартное отклонение. К – контрольная группа животных, в левую лапу которых ввели 100 мкл PBS

чивался в первые 2 недели, затем этот показатель практически выходил на плато. При этом в группе «200» отек был сильнее и охватывал почти всю лапу (рис. 2).

Гистологический анализ задних лап морских свинок с АИА, группа «200»

Патоморфологические проявления артрита были однотипными во всех группах животных с АИА. Наиболее интенсивные изменения выявлены в задней левой лапе (на стороне инъекции индуцирующего препарата CFA) в группе «200», поэтому дальнейшее описание в данном разделе касается именно этой группы.

К 16 сут эксперимента на фоне неизменных поверхностных слоев кожи в сетчатом слое дермы, в подкожной жировой клетчатке и между волокнами мышечной ткани обнаруживали диффузную плотную клеточную инфильтрацию. В составе инфильтрата преобладали гранулоциты (преимущественно нейтрофилы), макрофаги и небольшое количество плазматических клеток. В центральной части особенно крупных областей инфильтрации иногда обнаруживали зоны некротического распада. В области суставов наблюдали выраженный отек, воспалительно-клеточную инфильтрацию (рис. 3B), гемодинамические расстройства в виде резкого полнокровия сосудов мелкого и среднего калибра, стаза и тромбо-

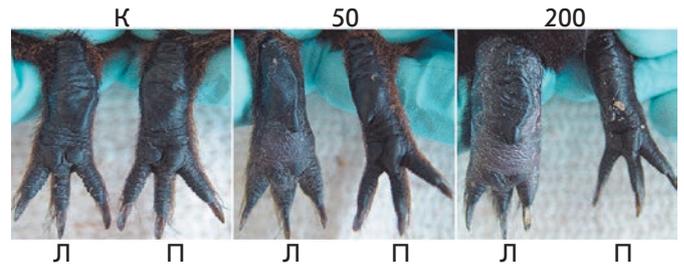


Рис. 2. Внешний вид задних конечностей морских свинок контрольной группы (К) и групп «50» и «200» через 37 сут после инъекции CFA. Л, П – левая и правая лапы

за мелких сосудов венозного русла. Синовиальная оболочка была набухшей и резко утолщенной за счет пролиферации клеток. В краевой зоне синовиальной оболочки, в месте, где она прилежит к хрящу, наблюдали развитие грануляционной ткани и распространение ее на суставную поверхность хряща (рис. 3Г). Повреждения хряща ограничивались различной величины эрозиями, трещинами и образованием в хряще бесклеточных зон (рис. 4B). Изменений субхондральной костной ткани на этом сроке эксперимента не обнаружено (рис. 4Г).

К 28 сут нарастали явления отека и воспалительно-клеточной инфильтрации в мягких тканях, окружающих сустав (рис. 3Д). Поражения суставов прогрессировали. Воспалительный процесс преимущественно затрагивал крупные суставы: голеностопный и таранно-ладьевидный. Мелкие суставы предплюсны и плюсны были повреждены в меньшей степени. Наблюдали резкое утолщение синовиальной оболочки, покрывающей ворсины, пролиферирующие синовиальные клетки располагались в несколько слоев. В некоторых случаях синовиальные клетки слущивались в полость сустава (рис. 3E). В подэпителиальном слое пространство вокруг сосудов было расширено, наблюдался выраженный периваскулярный отек, отек и расслоение мышечной оболочки сосудов, отек и утолщение эндотелия, маргинация и адгезия нейтрофилов на эндотелиоцитах. По краям суставного хряща обнаруживали разрастание грануляционной ткани, которая в виде паннуса «наползала» на хрящ (рис. 4Д). Хрящевая ткань повреждалась в разной степени, как правило, выявляли довольно обширные поля эрозии поверхностного слоя и участки деструкции, иногда распространявшиеся на всю толщину хряща. Обнаруживали истончение субхондральной костной пластинки и появление довольно обширных зон деструкции кортикального слоя (рис. 4E).

Через 42 сут после введения CFA на стороне введения обнаруживали массивную инфильтрацию мяг-

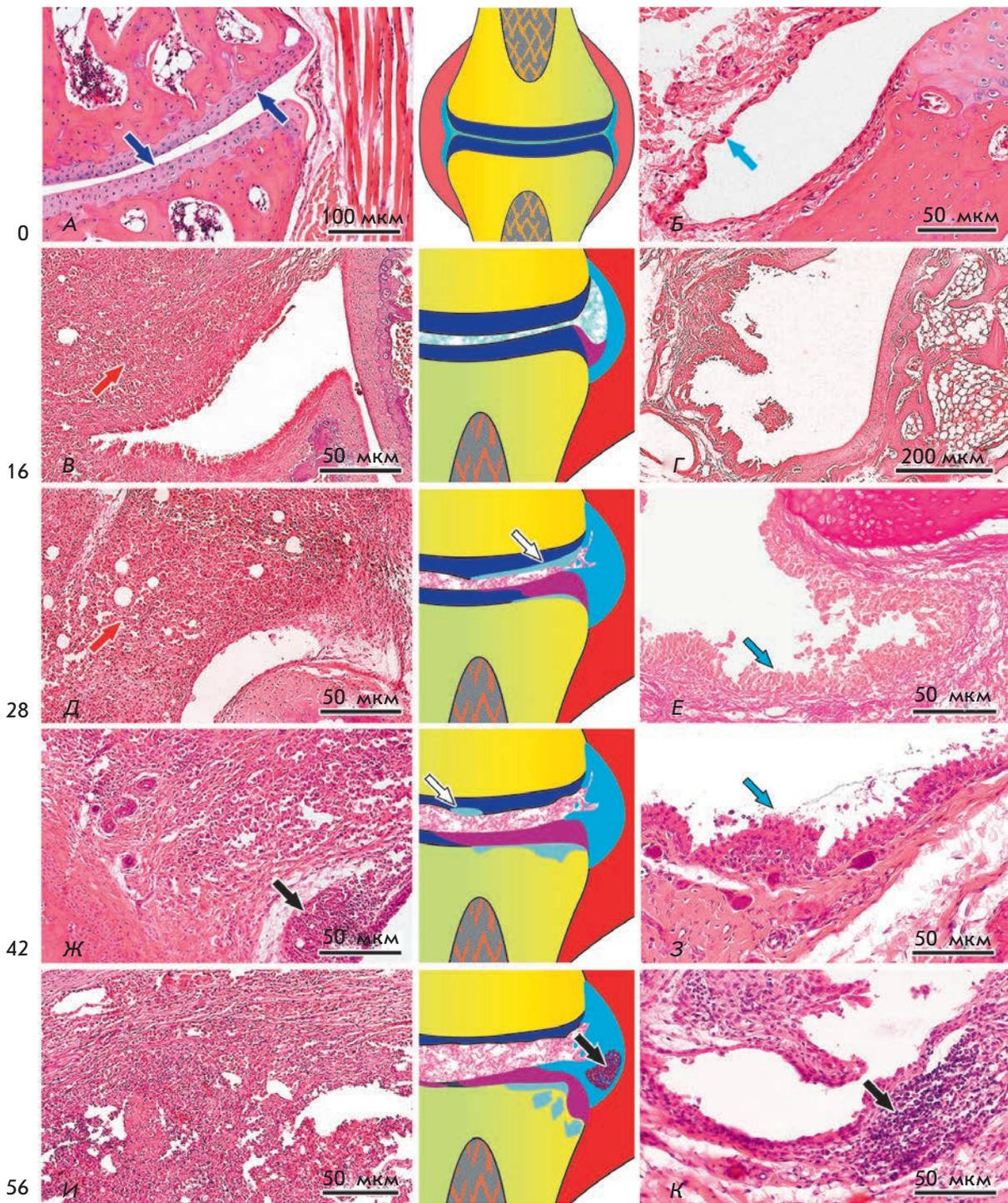


Рис. 3. Динамика воспалительных проявлений в околосуставных тканях (левая колонка) и синовиальной оболочке (правая колонка) (см. пояснения в тексте).

Окраска гематоксилином и эозином (снимок *Е* – препарат окрашен по Ван Гизон). На схемах (центральная колонка) основные элементы сустава и патологические проявления артрита обозначены цветом: костная ткань – желтым, хрящ – синим, суставная сумка (воспаление) – красным, синовиальная оболочка – голубым. Пурпурным цветом выделен паннус, серым – повреждения костных трабекул губчатого вещества кости. Соответствующие структуры указаны стрелками на микрофотографиях. Цвета стрелок соответствуют цветам на схеме. Белыми стрелками указаны эрозивные поражения поверхности суставного хряща, черными – гранулема под синовиальной оболочкой

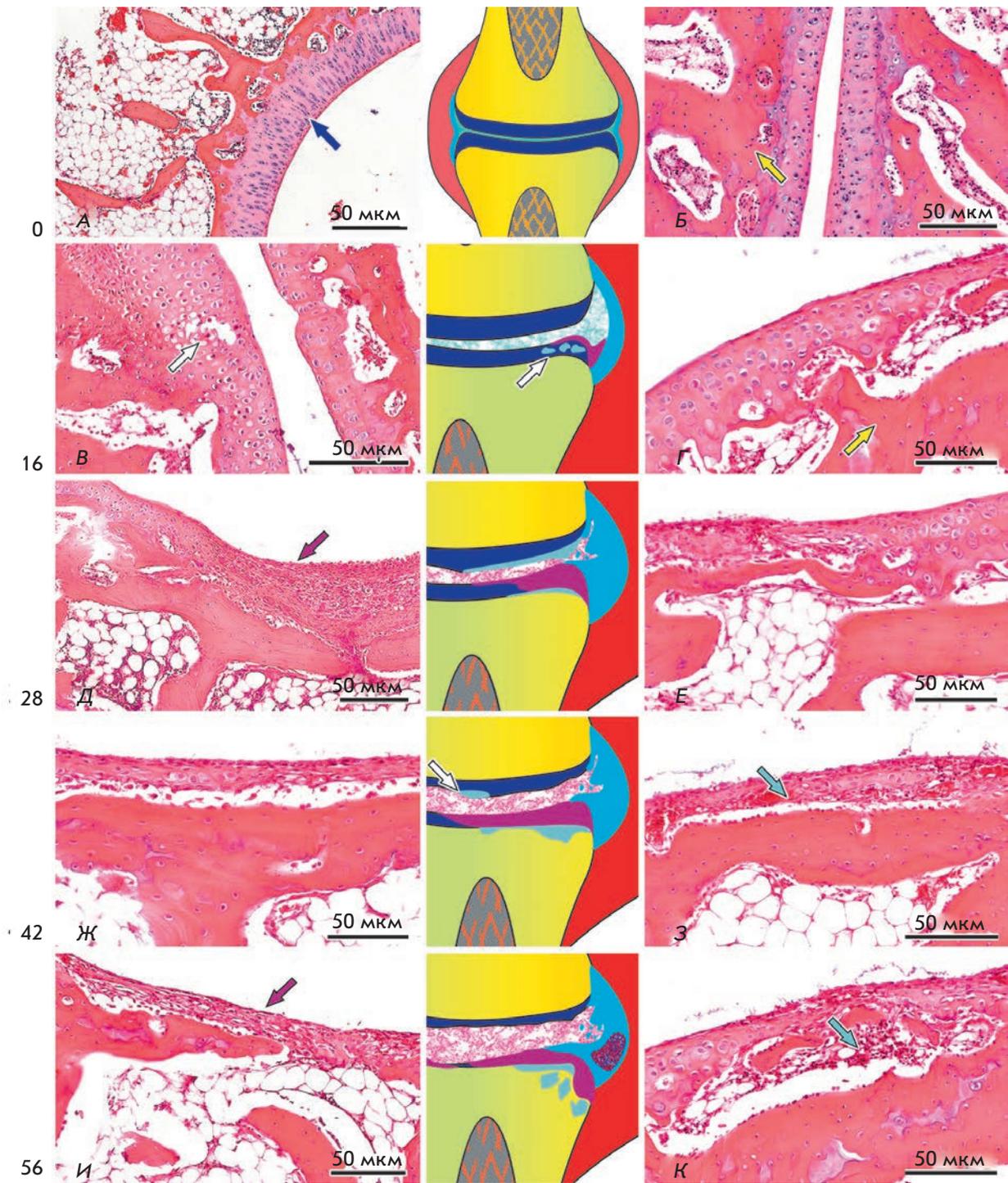


Рис. 4. Динамика поражения суставного хряща (левая колонка) и подлежащей кости (правая колонка) (см. пояснения в тексте). Окраска гематоксилином и эозином. На схемах (центральная колонка) цветовые обозначения те же, что и на рис. 3

ких тканей стопы с участками некроза в центральной части инфильтрата. По периферии очагов инфильтрации наблюдали ангиоматоз, полнокровие, большое количество фибробластов, что свидетельствовало о начале активного процесса репарации тканей суставной сумки (рис. 3Ж). Синовиальная оболочка была резко отеочной, ее гипертрофированные ворсины глубоко вдавались в полость сустава. Под оболочкой и в ворсинах наблюдали активный процесс новообразования сосудов и регенерации соединительной ткани (рис. 3З). Поражения хряща и кости были множественными и захватывали как крупные суставы, так и мелкие суставы плюсны. Степень деградации также была различной – от маргинальной деформации хряща (рис. 4Ж) до полной потери хряща на значительной площади суставной поверхности и локального разрушения костных трабекул губчатого вещества кости (рис. 4З).

На 56 сут эксперимента наблюдали некоторое снижение активности воспалительного процесса и при этом усиление склероза тканей, окружающих воспалительный инфильтрат (рис. 3И). В некоторых случаях соединительная ткань прорастала в инфильтрат, образуя более мелкие клеточно-фиброзные гранулемы, окруженные фиброзной капсулой. Несмотря на снижение воспалительной реакции в окружающих тканях, воспалительный процесс в синовиальной оболочке оставался активным. Проявления синовита различной степени выраженности наблюдали у всех животных. Под синовиальной оболочкой, кроме диффузной инфильтрации, нередко обнаруживали небольшие грануломатозные узелки (рис. 3К). Наблюдали глубокую деструкцию суставного хряща (рис. 4И) и прорастание грануляционной ткани в губчатое вещество кости (рис. 4К).

В правых задних необработанных конечностях воспаление проявлялось в виде небольших очагов воспалительно-клеточной инфильтрации, в основном по ходу сосудов небольшого калибра. Тем не менее проявления синовита, хотя и в гораздо меньшей степени, чем на стороне инъекции СФА, обнаруживали через 42 и 56 сут после введения адъюванта. Кроме того, через 56 сут в этих конечностях выявляли эрозивные поражения суставного хряща.

Гистологический анализ задних лап морских свинок с АИА, группа «50»

Патологические изменения в задних конечностях морских свинок группы «50» отличались от изменений в группе «200» в основном степенью их проявлений. В группе «50» воспалительные явления в околосуставной сумке и окружающих тканях достигали максимума через 28 сут после инъекции СФА, в то время как в группе «200» активный воспа-

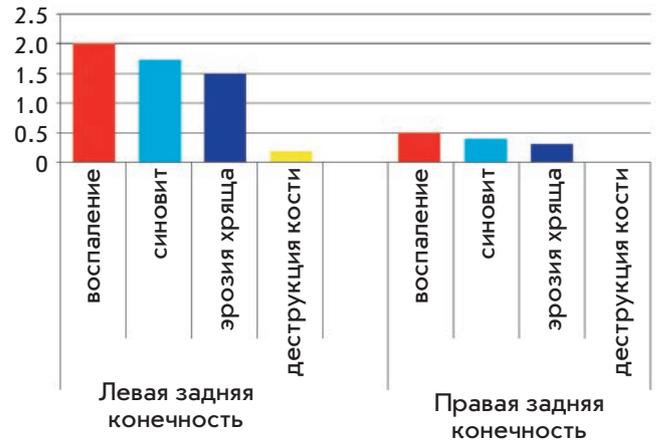


Рис. 5. Сравнительная характеристика степени поражения параартикулярных и суставных тканей в задних конечностях морских свинок: на стороне инъекции СФА (левая) и в симметричной интактной конечности (правая). Приведены средние значения каждого показателя для всей группы «100»

лительный процесс продолжался и на протяжении 42 сут эксперимента. К 28 сут в обеих группах появлялись первые признаки регенерации вокруг очага воспаления в виде пролиферации сосудов и разрастания рыхлой неоформленной соединительной ткани. В суставе наблюдались глубокие эрозии хряща и деструктивные поражения кортикального слоя кости, усиливающиеся в более поздние сроки. Однако степень проявления этих признаков была значительно меньше, чем в группе «200». Кроме того, патологический процесс захватывал, как правило, один сустав, в то время как в группе «200» поражались два или даже три сустава задней конечности.

Воспроизводимость АИА у морских свинок, группа «100»

У всех 14 морских свинок группы «100», которую мы использовали для оценки воспроизводимости АИА, на стороне инъекции СФА (левая задняя лапа) развивалось характерное для ревматоидного артрита поражение синовиальной оболочки и суставного хряща. Кроме эрозии поверхности хряща, обнаруженной у всех животных этой группы, в половине случаев деструкция распространялась на половину толщины суставного хряща, а в двух случаях на отдельных участках хрящ был разрушен полностью, и наблюдалось повреждение подлежащей кости. У четырех животных, несмотря на довольно выраженное воспаление в тканях суставной сумки и в синовиальной оболочке, суставной хрящ голеностопного сустава

Таблица Оценка патологических изменений в тканях задних конечностей морских свинок, вызванных введением 100 мкл СГА (пояснения см. в тексте)

Животное, номер	На стороне инъекции СГА (левая лапа)				Интактная (правая лапа)			
	воспаление	синовит	эрозия хряща	деструкция кости	воспаление	синовит	эрозия хряща	деструкция кости
1	3	2	2	0	0	0	0	0
2	2	1	1	0	1	0	0	0
3	2	2	3	0	0	0	0	0
4	3	1	2	1	0	0	0	0
5	2	2	1	0	1	1	0	0
6	2	2	2	0	1	0	0	0
7	3	2	2	0	0	1	0	0
8	2	2	1	0	1	0	0	0
9	1	2	1	0	0	0	0	0
10	2	1	1	0	0	0	0	0
11	2	2	2	1	1	1	1	0
12	1	1	1	0	1	1	3	0
13	2	2	1	0	1	1	0	0
14	1	2	1	0	0	0	0	0

не был поражен. В то же время у этих животных наблюдалась деструкция хряща других суставов.

В симметричных месту введения СГА конечностях воспаление практически отсутствовало. Выявляли лишь небольшие очаги воспалительно-клеточной инфильтрации по ходу сосудов небольшого калибра. Тем не менее у половины животных отмечены умеренно выраженные проявления синовита, а у двух – эрозивные поражения суставного хряща. Причем в одном случае на ограниченном участке деструкция хрящевой ткани распространялась на всю толщину суставного хряща, что, однако, не укладывается в общую картину поражения в этой группе животных. Степень различных патологических проявлений у отдельных животных, оцененная по трехбалльной шкале (см. раздел «Экспериментальная часть»), приведена в *таблице*, а средние суммарные значения для всей группы «100» приведены на *рис. 5*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что РА – заболевание, для которого характерны различия как в молекулярных механизмах возникновения, так и в чувствительности отдельных индивидов к разным терапевтическим препаратам. Поэтому при тестировании потенциальных противовоспалительных препаратов рекомендуется использовать разные лабораторные модели [1–3, 5, 6, 11]. В настоящее время наиболее хорошо изучены модели индуцированного артрита, в которых используются некоторые линии мышей и крыс [1, 2, 5, 6]. Однако ни одна из этих моделей не отражает все особенности РА

у человека [5], поэтому поиск дополнительных экспериментальных моделей РА остается актуальным.

Мы оценили эффективность индукции артрита после инъекции СГА подкожно в стопу задней конечности беспородных морских свинок и воспроизводимое развитие у них АИА.

Показано, что в результате введения индуцирующего артрит препарата СГА на стороне инъекции развивается гранулематозное воспаление мягких тканей стопы, распространяющееся на суставные сумки крупных и мелких суставов. Активная фаза воспаления в околосуставных тканях стихает к 42 сут эксперимента. Через 28 сут появляются, а в дальнейшем усиливаются явления склероза, приводящие к инкапсуляции очага воспаления. В то же время патологический процесс в самом суставе, приводящий к глубокой деструкции суставного хряща и подлежащей кости, не прекращается и на последнем сроке наблюдения (56 сут), что может свидетельствовать о переходе артрита в хроническую форму. Несмотря на довольно выраженное воспаление в околосуставных тканях, патологические процессы развиваются не во всех суставах задней конечности. При этом частота и степень поражения суставов явно зависят от введенной дозы. В группе «200», где индуцирующая доза была самой высокой, отмечены наиболее тяжелые поражения суставов.

В данной модели присутствуют характерные для РА в острой фазе отложения фибрина на поверхности синовиальной оболочки, лейкоцитарная инфильтрация синовиальной оболочки и окружаю-

щих тканей, продуктивная реакция в виде разрастания грануляционной ткани и появление участков ангиоматоза. Клеточная реакция, выражающаяся увеличением количества плазмочитов и образованием фолликулоподобных лимфоидных инфильтратов, эрозивным поражением суставной поверхности хряща, нередко с его глубокой деструкцией на больших участках, и поражением эпифизов костей, дополняет картину системного заболевания.

Известно, что даже использование линейных мышцей или крыс обычно не приводит к индукции экспериментального артрита у всех исследуемых животных [1, 2]. Это снижает информативность данных, полученных при доклинических испытаниях новых методов терапии РА. Поэтому поиск хорошо воспроизводимых моделей индуцированного артрита остается важным направлением исследований [2, 11, 12]. Мы количественно оценили воспроизводимость АИА у морских свинок в группе «100». Показано (таблица), что введение СГА в дозе 100 мкл вызывало выраженное поражение тканей суставов (на стороне введения препарата), что свидетельствует о хорошей воспроизводимости индукции артрита в использованной модели РА и ее перспективности для оценки противоартритных препаратов и схем их применения. Следует отметить, что через 28 сут в правой (необработанной) задней лапе всех морских свинок группы «100», за исключением животного № 12 (та-

блица), патологические изменения отсутствовали либо были существенно менее выражены, чем в левой (обработанной) лапе.

По-видимому, дистрофические процессы в подлежащей костной ткани животных группы «100» к этому времени (28 сут) не успевают развиваться в полной мере, вследствие чего выраженность воспалительного процесса, довольно заметная в суставных тканях, не всегда коррелирует с поражением субхондральной кости. Однако в модели, которая будет использоваться для оценки эффективности перспективных препаратов, это скорее преимущество, чем недостаток, так как далеко зашедший деструктивный процесс в суставе труднее поддается воздействию терапевтических препаратов и соответственно затрудняет оценку результатов лечения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена лабораторная модель РА, основанная на подкожной инъекции СГА беспородным морским свинкам. Показана высокая эффективность и воспроизводимость АИА у этих животных. Разработанная модель расширит возможности доклинического тестирования противоартритных препаратов. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-15-00050).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Шелкунов С.Н. // Медицинская иммунология. 2015. Т. 17. С. 203–210.
2. Bolon B., Stolina M., King C., Middleton S., Gasser J., Zack D., Feige U. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. Article ID 569068.
3. Evans C.H., Ghivizzani S.C., Robbins P.D. // Transl. Res. 2013. V. 161. P. 205–216.
4. Chemin K., Klareskog L., Malmstrom V. // Curr. Opin. Rheumatol. 2016. V. 28. P. 181–188.
5. Vincent T.L., Williams R.O., Maciewicz R., Silman A., Garside P. // Rheumatology. 2012. V. 51. P. 1931–1941.
6. Bevaart L., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. // Arthritis Rheum. 2010. V. 62. P. 2192–2205.
7. Schurgers E., Billiau A., Matthys P. // J. Interferon Cytokine Res. 2011. V. 31. P. 917–926.
8. Padilla-Carlin D.J., McMurray D.N., Hickey A.J. // Comp. Med. 2008. V. 58. P. 324–340.
9. Fernandez M.L., Volek J. // Nutr. Metab. 2006. V. 3. P. 17.
10. Thangavel R.R., Bouvier N.M. // J. Immunol. Meth. 2014. V. 410. P. 60–79.
11. Hu Y., Cheng W., Cai W., Yue Y., Li J., Zhang P. // Clin. Rheumatol. 2013. V. 32. P. 161–165.
12. Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Зварцев Р.В., Чащина А.А., Чудаков Д.М., Тиллиб С.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. // Биохимия. 2014. Т. 79. С. 1648–1656.

УДК 577.33

Индукция фототоксичности флавопротеида miniSOG посредством биолюминесцентного резонансного переноса энергии

Е. И. Шрамова^{1*}, Г. М. Прошкина^{1*}, С. П. Чумаков¹, Ю. М. Ходарович¹, С. М. Деев^{1,2}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный исследовательский Томский политехнический университет, 634050, Томск, просп. Ленина, 30

*E-mail: shramova.e.i@gmail.com, gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 08.07.2016

Принята в печать 11.10.2016

РЕФЕРАТ Изучена возможность возбуждения фототоксичного флавопротеида miniSOG (фотосенсибилизатора) в раковых клетках в результате биолюминесценции, вызванной окислением субстрата фуримазина люциферазой NanoLuc, и оценена индуцированная фототоксичность *in vitro*. Показано, что в присутствии субстрата фуримазина люцифераза NanoLuc, введенная в составе генетической конструкции, содержащей miniSOG, в эукариотические клетки, вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность, и смертность клеток в стабильно трансфицированной линии составляет 48%.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биолюминесцентный резонансный перенос энергии, люцифераза NanoLuc, флавопротеид miniSOG, фотодинамическая терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФМН – флавиномононуклеотид; BRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии (bioluminescence resonance energy transfer).

ВВЕДЕНИЕ

Свойства света как терапевтического агента используются человечеством более 3000 лет [1]. За точку отсчета современного подхода к изучению явления фотосенсибилизации принято считать работу Оскара Рааба, опубликованную в 1900 г. [2]. Рааб установил, что сочетание света и определенных химических веществ индуцирует гибель живых клеток: в солнечный день краситель акридиновый оранжевый вызывал гибель инфузорий, а в пасмурный день – нет [2]. Именно с установления этого факта начинается современная фотодинамическая терапия (ФДТ).

Фотодинамическая терапия в современном виде представляет собой трехкомпонентную систему, состоящую из фотосенсибилизатора, света определенной длины волны и молекулярного кислорода. Эти три ключевых компонента, нетоксичные каждый по отдельности, соединяясь вместе, продуцируют активные формы кислорода (АФК) и тем самым индуцируют кислородзависимую гибель клеток.

ФДТ – перспективный метод терапии злокачественных образований человека, поскольку позволяет воздействовать на опухоль селективно и локально.

В силу того, что для фотодинамической терапии необходим внешний источник света, в клинической практике этот метод используется только в терапии опухолей кожи и сетчатки, а также эпителиальных поверхностей органов, доступных для катетеров и эндоскопов. Так, в настоящее время применение ФДТ одобрено при карциномах головы и шеи [3], рака легкого [4], верхних отделов пищеварительного тракта [5], а также злокачественных новообразований [6].

Главная проблема фотодинамической терапии сопряжена с потерей оптической активности (интенсивности) возбуждающего света в результате рефракции, отражения, поглощения и рассеяния квантов света в биологических тканях. Благодаря способности тканей поглощать и рассеивать свет проникающая способность видимого света в тканях составляет не более 10 мм. Кроме того, поглощение излучения определяется биологическими хромофорами ткани:

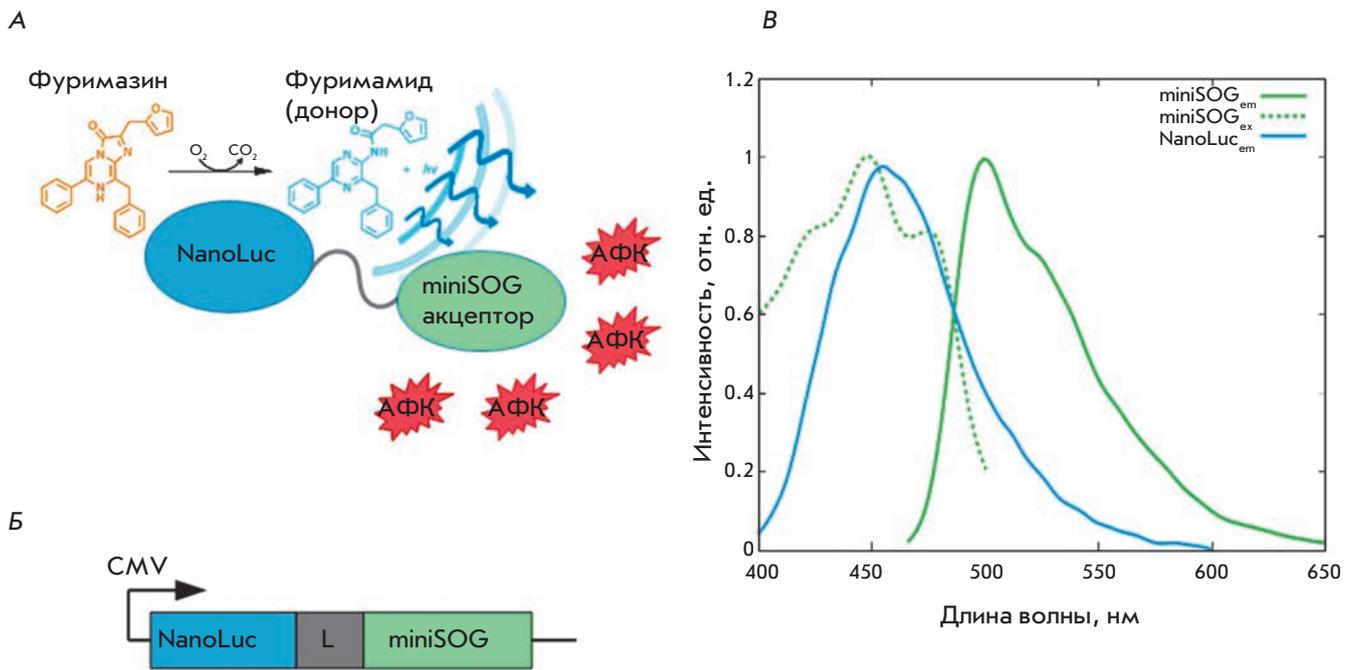


Рис. 1. Принцип работы системы «люцифераза–фуримазин–miniSOG». **А** – принцип биолюминесцентного резонансного переноса энергии. **Б** – схема конструкции, содержащей в одной рамке считывания ген люциферазы NanoLuc, пептидный линкер GGGGS (L) и цитотоксический модуль miniSOG под контролем CMV-промотора. **В** – нормированные спектры испускания фуримамида (NanoLuc_{em}), спектры возбуждения (miniSOG_{ex}) и флуоресценции (miniSOG_{em}) miniSOG

в ультрафиолетовой области спектра целевыми хромофорами являются почти все белки, от 400 до 600 нм поглощают оксигемоглобин, дезоксигемоглобин и меланин, от 1200 до 2000 нм – вода. Таким образом, «окно прозрачности» биологических тканей для ФДТ находится в диапазоне 650–1200 нм [7].

С началом процесса метастазирования становится трудным или невозможным доставить свет непосредственно ко всем очагам опухолевого роста. Если создать внутренние источники излучения, то свет можно доставить к любому участку тела на любую глубину, что могло бы значительно расширить область применения фотодинамической терапии [8].

В современной молекулярной и клеточной биологии для изучения внутриклеточных процессов *in vivo* и *in vitro*, а также для биоимиджинга широко используется явление биолюминесцентного резонансного переноса энергии, BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) [9–11], в основе которого лежит Фёрстеровский резонансный перенос энергии между двумя хромофорами. При этом донором служит субстрат люциферазы, который при окислении в присутствии кислорода испускает фотоны в видимой области спектра, а акцептором – флуоресцентный белок (рис. 1А).

С помощью генно-терапевтических подходов ген, кодирующий люциферазу, можно селективно экспрессировать в раковых клетках с использованием опухолеспецифичных промоторов [12, 13] либо селективно доставлять его к опухолевым клеткам с применением таких носителей, как псевдотипированные вирусные конструкции [14], адресные полиэтилениминные комплексы и т.д. [15]. Таким образом, использование биолюминесценции в качестве внутриклеточного источника излучения для возбуждения фотосенсибилизатора в раковой клетке может стать решением проблемы доставки света вглубь тканей.

Возможность применения этого явления в терапии была впервые показана в 1994 г. [16]: фотосенсибилизатор гиперидин, возбуждаемый биолюминесценцией люциферина, приводил к инактивации вируса анемии лошадей *in vitro*.

Однако возможность использования BRET для фотодинамической терапии рака показали только в 2003 г. [17]. Фотосенсибилизатор бенгальский красный, находясь в цитозоле в присутствии люциферина, вызывал гибель 90% популяции фибробластов NIH 3T3 мыши, стабильно экспрессирующих ген люциферазы.

Согласно [18], люминесцентная молекула люминол также может использоваться в качестве внутриклеточного источника света для возбуждения фотосенсибилизатора. Жизнеспособность клеток HeLa, подвергнутых обработке люминолом в присутствии фотосенсибилизатора, составляла менее 10%. Проведение противоопухолевой терапии *in vivo* привело к снижению роста опухоли у мышей опытной группы на 55% по сравнению с контрольной. При этом люминол и фотосенсибилизатор вводили непосредственно в опухоль опытных животных.

В 2015 г. была показана возможность BRET-опосредованной фотодинамической терапии глубоких опухолей и метастазов на мышинной модели [19]. В этой работе в качестве внутриклеточного источника для фотодинамической терапии использовали квантовые точки, покрытые люциферазой. В присутствии субстрата люциферазы квантовые точки возбуждали фотосенсибилизатор хлорин е6, приводя к регрессии первичного опухолевого очага и метастазов в лимфоузлах.

Отметим, что во всех рассмотренных работах использованы химические фотосенсибилизаторы, которые вводили в организм интратуморально или системно.

Ранее в нашей лаборатории на основе фототоксичного флавопротеида miniSOG были получены адресные генетически кодируемые белковые фотосенсибилизаторы, обладающие высокой цитотоксической активностью *in vitro* в отношении HER2-положительных клеток аденокарциномы молочной железы [20–23]. Возбуждение miniSOG происходит в синей области спектра ($\lambda_{\max} = 448$ нм) [24], что накладывает ряд ограничений на использование данных фотосенсибилизаторов *in vivo*.

Для решения проблемы доставки синего света *in vivo* мы предлагаем систему, в которой фотосенсибилизатор miniSOG возбуждается в ходе реакции окисления субстрата (фуримазина) люциферазой NanoLuc (Promega). Мы показали, что люцифераза NanoLuc, экспрессируемая в эукариотических клетках в составе единой генетической конструкции с miniSOG, в присутствии субстрата фуримазина вызывает возбуждение фототоксичного флавопротеида miniSOG. При этом miniSOG проявляет фотоиндуцированную цитотоксичность и вызывает гибель 48% трансфицированных клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры эукариотических клеток

В работе использовали клетки аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3. Клетки растили в средах McCoys 5A (HyClone, Бельгия) или RPMI

1640 без фенолового красного (Gibco, Германия), содержащих 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, Бельгия) и антибиотика (пенициллин 50 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, «ПанЭко», Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и повышенной влажности. При культивировании клеток, экспрессирующих miniSOG, в качестве источника кофактора ФМН в среду добавляли рибофлавин («Фармстандарт-УфаВита», Россия) до конечной концентрации 150 мкМ.

Получение конструкции NanoLuc–miniSOG

Кодирующую последовательность гена фотоактивируемого цитотоксичного белка miniSOG клонировали в плазмиду pNL1.1.CMV (Promega), содержащую ген люциферазы NanoLuc под контролем CMV-промотора, используя стандартные методы генной инженерии. Кодирующую последовательность гена miniSOG амплифицировали с плазмиды pDAR-miniSOG [22] с использованием специфических праймеров oGP13 (5'-GCGGGTGGCGGAGGGAGCATGGAAAAGAGCTTTGTGATTACC-3', подчеркнута линкерная последовательность) и oGP14 (5'-GGTCTAGAATTAGCCATCCAGCTGC-3', подчеркнут сайт эндонуклеазы XbaI). Кодирующую область гена люциферазы NanoLuc амплифицировали с использованием специфических праймеров oGP11 (5'-CAGTTTGTTCAGAAATCTCGGGG-3', подчеркнут сайт эндонуклеазы AvaI) и oGP12 (5'-CCATGCTCCCTCCGCCACCCGCCAGATGCGTTCGCACAG-3', подчеркнута линкерная последовательность). Подчеркнутая в структуре праймеров последовательность кодирует пептидный линкер GGGGS, предусмотренный для того, чтобы два функциональных домена (люцифераза NanoLuc и фототоксин miniSOG), входящие в состав гибридного белка, не испытывали стерических затруднений в пространстве и сохраняли свои функциональные свойства. ПЦР-продукты, кодирующие NanoLuc и miniSOG, объединяли в эквимольном соотношении, нагревали до 90°C и медленно понижали температуру до 24°C с тем, чтобы комплементарные участки линкерной последовательности могли взаимодействовать друг с другом. После этого проводили ПЦР с использованием праймеров oGP11 и oGP14 для получения полноразмерной гибридной конструкции NanoLuc–miniSOG. Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции AvaI и XbaI и клонировали в вектор pNL1.1.CMV, расщепленный этими же рестриктазами. В результате была получена плаزمиды pNanoLuc–miniSOG, содержащая в одной рамке считывания кодирующие последовательности генов NanoLuc и miniSOG, соединенные линкерным участком, под контролем конститутивно-

го промотора CMV. Правильность конструкции подтверждали секвенированием. Схема генетической конструкции представлена на *рис. 1Б*.

Получение плазмиды pNanoLuc-miniSOG-puro

Для получения клеточных линий, стабильно экспрессирующих гибридный ген *NanoLuc-mSOG*, в плазмиду NanoLuc-miniSOG был введен ген устойчивости к пурамицину. Этот ген, включая промотор NP гена *p53* человека и сигнал полиаденилирования, амплифицировали с плазмиды pLCMV-puro (любезно предоставлена П.М. Чумаковым) с использованием специфических праймеров 5'-AAGGAAAAAAGC-GGCCGCTGTGAAGGAAGCCAACCA-3' (подчеркнут сайт эндонуклеазы NotI) и 5'-AAAАCTGCA-CTTCCGGCTCGTATGTTGTGT-3' (подчеркнут сайт эндонуклеазы PstI). Полученный фрагмент обрабатывали эндонуклеазами рестрикции PstI и NotI и лигировали с плазмидой pNanoLuc-mSOG, предварительно обработанной этими же рестриктазами.

Трансфекция клеток SK-BR-3

Для проведения трансфекций использовали плазмидную ДНК, выделенную из бактериальных клеток с помощью набора PureLink™ (Invitrogen), согласно инструкции производителя. Трансфекцию проводили с помощью реагента FuGENE® HD (Promega) согласно рекомендациям производителя (<http://www.promega.com/techserv/tools/FugeneHdTool/>). За 1 сут до трансфекции клетки рассеивали с плотностью 10^5 клеток/мл в полной ростовой среде без антибиотиков. Использовали FuGENE® HD и ДНК в соотношении 3 : 1, при этом концентрация плазмидной ДНК при образовании комплексов составляла 0.02 мкг/мкл. Объем добавляемой к клеткам среды, содержащей комплексы FuGENE® HD и ДНК, составлял 1/20 общего объема ростовой среды. Комплексы готовили в среде, не содержащей сыворотку и антибиотики, культивировали при комнатной температуре в течение 5–10 мин и добавляли к клеткам. При работе с плазмидами, содержащими *miniSOG*, через 6 ч после трансфекции к клеткам добавляли рибофлавин (кофактор ФМН). Оптимальные условия трансфекции определяли в предварительных опытах, оценивая флуоресценцию *miniSOG* через 24–48 ч после трансфекции с помощью флуоресцентного микроскопа.

Отбор трансфицированных клеток

Клетки, экспрессирующие NanoLuc-miniSOG, отбирали спустя 48 ч после трансфекции с помощью сортера BD FACS Vantage (BD, США). Для отбора выделяли область ярко светящихся клеток на диаграмме FL1-FL2 так, чтобы она не захватывала клетки,

флуоресцирующие из-за присутствия в среде ФМН (фоновая флуоресценция ФМН). Отобранные клетки рассеивали с плотностью 10^5 клеток/мл на лунки 96-луночного планшета в 100 мкл полной ростовой среде, содержащей пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл) (все антибиотики производства фирмы «ПанЭко», Россия).

Получение стабильных клеточных линий

Концентрация пурамицина (Sigma, США), вызывающая гибель 100% клеток в течение 14 дней, – 0.25 мкг/мл для клеток SK-BR-3, была подобрана в предварительных опытах. Через 48 ч после трансфекции плазмидой pNanoLuc-miniSOG-puro среду в планшетах с культивируемыми клетками заменяли свежей, добавляя ФМН и пурамицин. Клоны стабильно трансфицированных клеток сформировались к 14–15 дню, после чего клетки пассировали в присутствии пурамицина в течение 3 мес.

Детекция люминесценции люциферазы NanoLuc

Люминесценцию люциферазы NanoLuc и гибридного белка NanoLuc-miniSOG оценивали спустя 48–72 ч после проведения трансфекции на приборе Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Измерения проводили на живых клетках в полной среде RPMI, не содержащей фенолового красного, в 96-луночных планшетах с черными стенками (для каждой точки выполняли по три повтора). Субстрат люциферазы фуримазин (Promega) в концентрации 30, 43 и 75 мкМ добавляли в режиме инъекции на приборе Infinite M1000 Pro (Tecan, Швейцария). Задержка после инъекции до момента анализа составляла 10 с. Для каждой опытной точки снимали спектры люминесценции в диапазоне длин волн от 400 до 600 нм с шагом 4 нм и временем детекции 100 мс. Полученные данные обрабатывали с помощью программы OpenOffice, версия 4.1.2. Для построения графиков спектров применяли математическую обработку данных (сглаживание кубическими сплайнами).

Оценка цитотоксического действия NanoLuc-miniSOG *in vitro*

Цитотоксичность NanoLuc-miniSOG в присутствии фуримазина определяли с помощью МТТ-теста [25]. Клетки SK-BR-3, стабильно экспрессирующие ген *NanoLuc-miniSOG*, в количестве 10^5 клеток/мл среды рассеивали в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл суспензии на лунку и культивировали в течение ночи. Затем к клеткам добавляли фуримазин и инкубировали в течение 48 ч. Среду удаляли, в лунки вносили по 100 мкл раствора бромиды

3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ, «ПанЭко») (0.5 мг/мл), приготовленного на среде McCoу's 5А, и инкубировали в течение 1 ч при 37°С в атмосфере с 5% CO₂. После этого раствор МТТ удаляли, к содержимому лунок добавляли по 100 мкл ДМСО, планшет встряхивали на шейкере до полного растворения кристаллов формазана. Оптическое поглощение содержимого каждой лунки измеряли на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Tecan, Швейцария) на двух длинах волн: 570 (рабочая) и 650 нм (сравнение). Эксперименты выполняли в трех повторах. Выживание клеток после инкубации с фуримазином оценивали по количеству формазана, образовавшегося в результате восстановления клетками раствора МТТ и растворенного в диметилсульфоксиде (количество формазана пропорционально числу живых клеток). Данные обрабатывали с помощью программы OpenOffice, версия 4.1.2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для эффективного прямого переноса энергии от окисленной формы субстрата к акцептору (Фёрстеровский резонансный перенос энергии) требуется выполнение ряда условий. Во-первых, спектр испускания донора должен максимально совпадать со спектром возбуждения акцептора. Во-вторых, донор и акцептор должны находиться друг от друга на расстоянии, не превышающем 10 нм [26].

Проведя анализ опубликованных данных, мы обнаружили, что в результате реакции окисления фуримазина люциферазой NanoLuc глубоководной креветки *Oplophorus gracilirostris* происходит выделение света в видимой области спектра с максимумом испускания при 460 нм [27]. Максимум поглощения фототоксичного флавопротеида miniSOG составляет 448 нм [24]. Таким образом, окисленная форма фуримазина (фуримамид) и miniSOG представляют собой хорошую пару донор–акцептор для биолюминесцентного резонансного переноса энергии. Наложение спектров испускания фуримамида и возбуждения miniSOG представлено на рис. 1В.

Чтобы сблизить в пространстве донор и акцептор, мы получили конструкцию, в которой в одной рамке считывания под контролем конститутивного CMV-промотора находились гены люциферазы NanoLuc и фототоксина miniSOG, соединенные коротким линкером из 15 нуклеотидов (рис. 1В).

Эффективность работы данной системы *in vitro* оценили, используя трансфекцию клеток линии SK-BR-3 полученной конструкцией. Анализ спектров испускания трансфицированных клеток в присутствии фуримазина показал наличие пика при 460 нм, соответствующего максимуму испускания окисленной формы фуримазина (рис. 2).

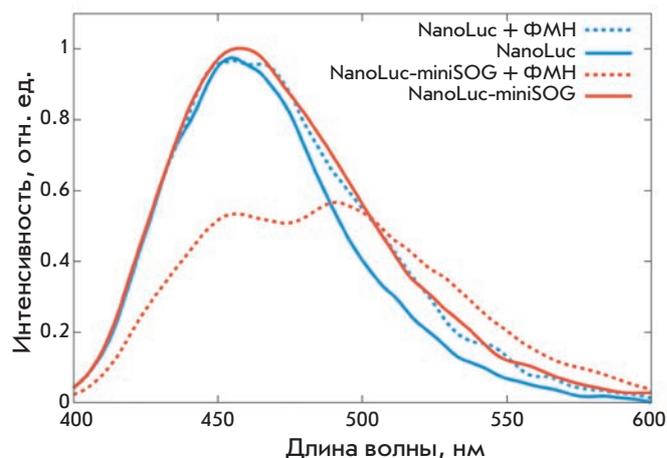


Рис. 2. Спектры испускания биолюминесцентных систем NanoLuc–фуримазин (на графике обозначена NanoLuc) и NanoLuc–фуримазин–miniSOG (обозначена NanoLuc-miniSOG) в зависимости от кофактора ФМН

Известно, что кофактором всех фототропинов (и флавопротеида miniSOG в том числе) является ФМН. Фототоксичность miniSOG прямо зависит от его насыщенности кофактором: под действием кванта синего света ФМН переходит в возбужденное состояние, и вся энергия возбужденного состояния ФМН идет на генерацию активных форм кислорода [24]. Поэтому к клеткам, трансфицированным плазмидой pNanoLuc-miniSOG, добавляли рибофлавин в концентрации 150 мкМ, который, проникая через клеточную мембрану, превращается в ФМН в результате фосфорилирования рибофлавин-киназой. Добавление рибофлавина к клеткам, трансфицированным pNanoLuc-miniSOG, в присутствии фуримазина приводило к уменьшению интенсивности пика при 460 нм и к появлению пика при 500 нм (максимум испускания miniSOG), что свидетельствует о переносе энергии от фуримамида к miniSOG. Отметим, что добавление ФМН к клеткам, трансфицированным плазмидой с геном люциферазы NanoLuc (без miniSOG), не приводит к появлению пика при 500 нм (рис. 2).

Для оценки цитотоксического эффекта, вызываемого системой NanoLuc–фуримазин–miniSOG, клетки SK-BR-3, трансфицированные плазмидой pNanoLuc-miniSOG, через 48 ч после трансфекции отбирали с помощью сортера BD FACS Vantage (BD). Отобранные клетки высевали на 96-луночный планшет для оценки цитотоксичности конструкции NanoLuc-miniSOG в присутствии фуримазина. Однако клетки, пропущенные через сортер и, таким образом, подвергнутые облучению лазером с длиной

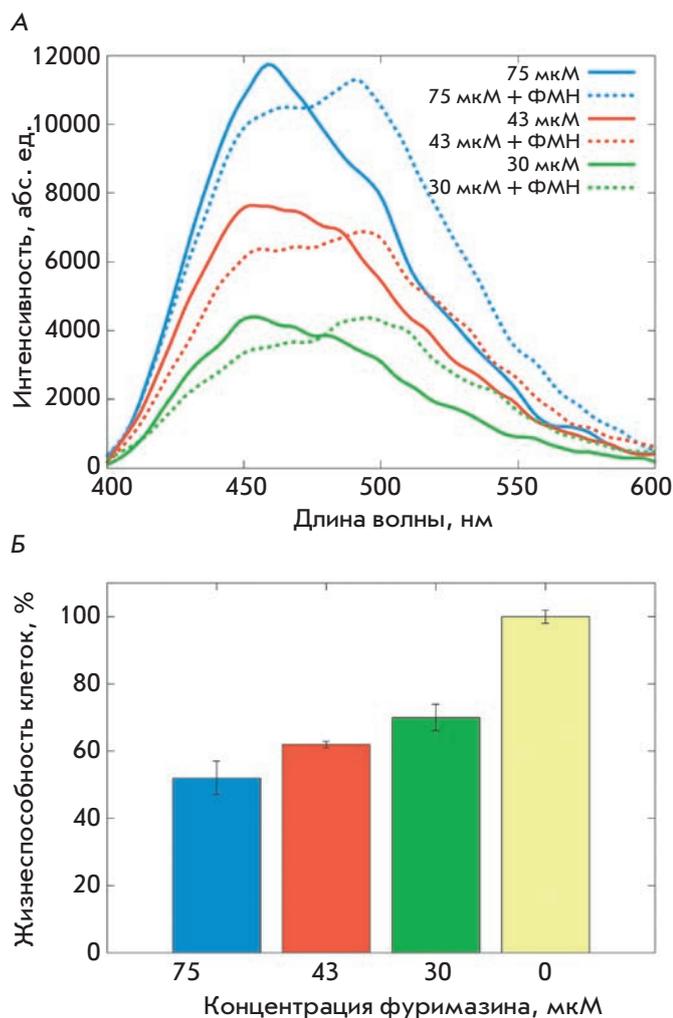


Рис. 3. Функциональная характеристика биолюминесцентной системы NanoLuc–фуримазин–miniSOG. А – изменение профиля спектров испускания гибридного белка NanoLuc–miniSOG в зависимости от концентрации фуримазина и наличия ФМН. Б – зависимость цитотоксического действия гибридного белка NanoLuc–miniSOG от концентрации фуримазина

волны 473 нм, оказались нежизнеспособными. Мы полагаем, что короткого времени экспозиции синим светом (пролет клетки через луч лазера) было достаточно для возбуждения miniSOG и проявлению его фотоиндуцируемой цитотоксичности.

Чтобы обойти эту проблему, мы получили клеточную линию SK-BR-3, стабильно экспрессирующую конструкцию NanoLuc–miniSOG. Отбор трансфектантов проводили в присутствии антибиотика пурамицина как описано в разделе «Экспериментальная часть».

Анализ спектров испускания клеток, содержащих гибридный белок NanoLuc–miniSOG, в присутствии различных концентраций фуримазина выявил пик при 460 нм, интенсивность которого коррелирует с концентрацией субстрата (рис. 3А). Добавление ФМН к клеткам приводит к появлению пика при 500 нм, характерного для максимума испускания miniSOG (рис. 3А).

Для изучения цитотоксического действия системы «люцифераза NanoLuc–фуримазин–фототоксин miniSOG» клетки SK-BR-3, стабильно экспрессирующие гибридную конструкцию NanoLuc–miniSOG, рассеивали в 96-луночный планшет и растили в присутствии ФМН в течение 24 ч. После этого к клеткам добавляли различные концентрации фуримазина и инкубировали при 37°C в атмосфере CO₂ в течение 48 ч. Цитотоксический эффект при максимальной концентрации фуримазина составил 48% (рис. 3Б).

Известно, что miniSOG в митохондриальной или примембранной локализации вызывает гибель почти 100% клеток HeLaKyoto при облучении синим светом (55 мВт/см²) [28]. Кроме того, ненасыщенные жирные кислоты, содержащиеся в большом количестве в плазматической мембране, являются главной мишенью активных форм кислорода [29]. Дополнительным фактором, вносящим вклад в фотоиндуцированное повреждение липидов, является молекулярный кислород, хорошо растворимый в липидах. Таким образом, в липидном окружении фотосенсибилизатор имеет больше шансов встретиться с молекулярным кислородом и выработать АФК, чем в водном.

Принимая во внимание данные работ [28, 29], мы полагаем, что цитотоксический эффект, выявленный нами в ходе работы, вероятно, можно усилить, используя гибридные конструкции NanoLuc–miniSOG с сигналами различной внутриклеточной локализации (митохондриальной, примембранной, лизосомной). Системы, основанные на BRET-опосредованной активации фотосенсибилизатора, позволят существенно расширить возможности применения ФДТ, преодолев проблему «окна прозрачности» биологических тканей.

Нами доказана возможность возбуждения цитотоксического флавопротеида miniSOG светом, испускаемым окисленной формой субстрата люциферазы, показана возможность использования данной системы для фотоиндуцированной гибели клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показана возможность использования биолюминесцентного резонансного переноса энергии для возбуждения генетически кодируемого фотосенсибилизатора. Испускаемый

окисленной формой люциферазного субстрата свет переводит фототоксичный белок miniSOG, входящий в состав гибрида с люциферазой, в возбужденное состояние, необходимое для генерации активных форм кислорода и индукции клеточной гибели. Использование биолюминесценции в качестве внутриклеточного источника излучения для возбужде-

ния фотосенсибилизатора в раковой клетке может стать решением проблемы доставки света вглубь тканей и расширить возможности фотодинамической терапии опухолей глубоких тканей и метастазов. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 16-14-10321).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ackroyd R., Kelyt C., Brown N., Reed M. // Photochem. Photobiol. 2001. V. 74. № 5. P. 656–669.
- Raab O. // Zeitung Biol. 1900. V. 39. P. 524–526.
- Schweitzer V.G. // Otolaryngol. Head Neck Surg. 1990. V. 103. № 6. P. 981–985.
- Hayata Y., Kato H., Konaka C., Ono J., Takizawa N. // Chest. 1982. V. 81. № 3. P. 269–277.
- Hayata Y., Kato H., Okitsu H., Kawaguchi M., Konaka C. // Semin. Surg. Oncol. 1985. V. 1. № 1. P. 1–11.
- Ward B.G., Forbes I.J., Cowled P.A., McEvoy M.M., Cox L.W. // Am. J. Obstet Gynecol. 1982. V. 142. № 3. P. 356–357.
- Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. // Lasers Med. Sci. 2009. V. 24. № 2. P. 259–268.
- Grebenik E.A., Deyev S.M. // Russ. Chem. Rev. 2016. V. 85. № 12. DOI: 10.1070/RCR4663
- Pfleger K.D., Eidne K.A. // Nat. Methods. 2006. V. 3. № 3. P. 165–174.
- Baumes J.M., Gassensmith J.J., Giblin J., Lee J.J., White A.G., Culligan W.J., Leevy W.M., Kuno M., Smith B.D. // Nat. Chem. 2010. V. 2. № 12. P. 1025–1030.
- Takai A., Nakano M., Saito K., Haruno R., Watanabe T.M., Ohyanagi T., Jin T., Okada Y., Nagai T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 14. P. 4352–4356.
- Iyer M., Wu L., Carey M., Wang Y., Smallwood A., Gambhir S.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 25. P. 14595–14600.
- Sieger S., Jiang S., Kleinschmidt J., Eskerski H., Schönsiegel F., Altmann A., Mier W., Haberkorn U. // Cancer Gene Ther. 2004. V. 11. № 1. P. 41–51.
- Adams J.Y., Johnson M., Sato M., Berger F., Gambhir S.S., Carey M., Iruela-Arispe M.L., Wu L. // Nat. Med. 2002. V. 8. № 8. P. 891–897.
- Hildebrandt I.J., Iyer M., Wagner E., Gambhir S.S. // Gene Ther. 2003. V. 10. № 9. P. 758–764.
- Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
- Theodossiou T., Hothersall J.S., Woods E.A., Okkenhaug K., Jacobson J., MacRobert A.J. // Cancer Res. 2003. V. 63. № 8. P. 1818–1821.
- Yuan H., Chong H., Wang B., Zhu C., Liu L., Yang Q., Lv F., Wang S. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. № 32. P. 13184–13187.
- Kim Y.R., Kim S., Choi J.W., Choi S.Y., Lee S.H., Kim H., Hahn S.K., Koh G.Y., Yun S.H. // Theranostics. 2015. V. 5. № 8. P. 805–817.
- Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // Theranostics. 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
- Прошкина Г.М., Миронова К.Е., Деев С.М., Петров П.В. // ДАН. 2015. Т. 460. № 2. С. 228–231.
- Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // Biochimie. 2015. V. 118. P. 116–122.
- Шилова О.Н., Прошкина Г.М., Рябова А.В., Деев С.М. // Вестн. Моск. университета. Серия 16: Биология. 2016. Т. 71. № 1. С. 17–22.
- Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // PLoS Biol. 2011. V. 9. № 4. e1001041.
- Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
- Carpenter S., Fehr M.J., Kraus G.A., Petrich J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 25. P. 12273–12277.
- Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // ACS Chem. Biol. 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
- Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
- Girotti A.W. // J. Photochem. Photobiol. 2001. V. 63. № 1–3. P. 103–113.

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 следующие электронные адреса: vera.knorre@gmail.com, actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.

РОССИЙСКИЕ НАНО ТЕХНОЛОГИИ



Что нового в области нанотехнологий?

узнай всего за 9600 рублей

9600 РУБЛЕЙ – ЦЕНА ГОДОВОЙ ПОДПИСКИ, ВКЛЮЧАЯ НДС

Подписка в редакции:

119234, Москва, Ленинские горы,
Научный парк МГУ, владение 1,
строение 75Б, офис 321

Телефон/ факс: +7 (495) 930 87 07

E-mail: nsoboleva@strf.ru

Web-site: www.nanoru.ru, www.nanorf.ru

Альтернативные агентства:

Урал-пресс www.ural-press.ru,
Информнаука www.informnauka.com

На электронную версию журнала можно
подписаться через Научную электронную
библиотеку: elibrary.ru

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

Научный журнал выходит 6 раз в год

Доступно для загрузки
из App Store



Теперь на iPad

Наше приложение доступно в «Кiosке» AppleStore в разделе «Наука».

